



Röntgenkristallstrukturaufklärung der
Hämoglobine des Breitmaulnashorns
Ceratotherium simum und des
Krallenfroschs *Xenopus laevis*

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

von

JULIANE SCHMIDT
geb. 23.05.1988, Lahnstein

Mainz, 2017

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Datum der mündlichen Prüfung: 17.08.2017

„Iucundi acti labores“
- Cicero

Zusammenfassung

Es wurden die Kristallstrukturen der Hämoglobine des Breitmaulnashorns *Ceratotherium simum* (HbCs) und des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (HbXl) aufgeklärt. Beim Krallenfrosch handelt es sich um einen Modellorganismus in biologischer und medizinischer Forschung.

Die Kristallstruktur des HbCs besitzt eine Auflösung von 2,1 Å, befindet sich in der met-Form und liegt im R2-Zustand vor. Die Kristallisation des Proteins im R2-Zustand ist unter den genutzten Kristallisationsbedingungen ungewöhnlich und konnte auf eine Salzbrücke zwischen β His69 und β Glu20 zurückgeführt werden, welche den R2-Zustand fixiert. Des Weiteren liefert die Kristallstruktur Einblicke in die 2,3-BPG-Bindestelle und die Veränderung der bindungsbeteiligten Aminosäure β Glu2, welche vermutlich für die hohe Sauerstoffaffinität des Proteins verantwortlich ist. Erste Vergleiche mit den Hämoglobinen anderer großer Säugetiere zeigen, dass auch dort Mutationen in der 2,3-BPG-Bindestelle vorliegen. Man kann daher mutmaßen, dass die oft gezeigte Korrelation zwischen Körpergröße und Sauerstoffaffinität in direktem Zusammenhang mit der Mutation der 2,3-BPG-Bindestelle dieser Hämoglobine steht.

Die Kristallstruktur des HbXl besitzt eine Auflösung von 2,7 Å und es handelt sich dabei um die erste und bisher einzige Kristallstruktur eines Hämoglobins aus einer Amphibie. Das Hämoglobin liegt in seiner met-Form vor und ist im R-Zustand kristallisiert. Obwohl das HbXl nur eine ca. 50%ige Gesamtsequenzidentität zu anderen Hämoglobinen aufweist, zeigt es trotz allem die typische Globinfaltung und die tetramere Struktur der Hämoglobine. Eine ungewöhnlich niedrige Haltbarkeit des Proteins wurde auf eine intermolekulare Disulfidbrücke zurückgeführt, die zu einer Verkettung der Hämoglobine führen kann. Es wurden außerdem Strukturbesonderheiten diskutiert, die in Verbindung mit der Sauerstoffaffinität des Proteins sowie dem Root-Effekt der marinen Knochenfische stehen. Das HbXl besitzt Sauerstoffbindungseigenschaften die als „rudimentärer Root-Effekt“ bezeichnet werden können und anhand der Struktur war es möglich einen strukturellen Mechanismus zu konstruieren, welcher diese speziellen Sauerstoffbindungseigenschaften des HbXl erklärt. Sequenzvergleiche mit den „wahren“ Root-Effekt-Hämoglobinen der Knochenfische zeigen, dass der in dieser Arbeit vorgestellte „Schaltermechanismus“ auch bei den Knochenfischen eine Rolle bei der Ausprägung des Root-Effekts spielen könnte.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Die Globin-Familie	7
1.2 Hämoglobin	7
1.2.1 Sauerstoffbindung	8
1.2.2 Kooperativität und der allosterische Effektor 2,3-BPG	10
1.2.3 Die verschiedenen Konformationszustände des Hämoglobins	12
1.2.4 Bohr-Effekt	15
1.2.5 Root-Effekt	15
1.3 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methode	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Puffer und Lösungen	18
2.3 Versuchstiere	19
2.3.1 Das Breitmaulnashorn <i>Ceratotherium simum</i>	19
2.3.2 Der gewöhnliche Krallenfrosch <i>Xenopus laevis</i>	20
2.4 Gewinnung der Hämoglobine aus den Erythrozyten	21
2.5 UV/Vis Absorptionsspektroskopie	22
2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.6.1 SDS-PAGE	24
2.6.2 Native PAGE	24
2.6.3 Coomassiefärbung nach Kang	25
2.7 Röntgenstrukturaufklärung	25
2.7.1 Kristallisation	26
2.7.2 Kristallsymmetrie	29
2.7.3 Millersche Indizes	30
2.7.4 Röntgenstreuung an Proteinkristallen - Die Braggsche Gleichung	31
2.7.5 Mathematische Konstrukte beschreiben die Position der Bragg- Reflexe	32
2.7.6 Berechnung der Elektronendichte und der Streuamplituden	32
2.7.7 Das Phasenproblem	34
2.7.8 Praktische Durchführung der Röntgenkristallstrukturbestimmung	35

2.7.9	Auswertung der röntgenkristallographischen Datensätze	37
2.7.10	Validierung	37
2.7.11	Refinement	39
2.7.12	Darstellung und Vermessung der Proteinstrukturen	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Aufreinigungsgrad der Hämoglobine	41
3.2	Kristallstruktur des <i>Ceratotherium simum</i> Hämoglobins (HbCs)	42
3.2.1	Kristallisation des HbCs	42
3.2.2	Primärdaten der Streuexperimente	44
3.2.3	Zellinhaltsanalyse	45
3.2.4	<i>Molecular Replacement</i> und Strukturverbesserung	46
3.2.5	Finale Kristallstruktur des HbCs	50
3.2.6	Salzbrücken des HbCs	55
3.3	Kristallstruktur des <i>Xenopus laevis</i> Hämoglobins (HbXI)	56
3.3.1	Kristallisation des HbXI	56
3.3.2	Primärdaten der Streuexperimente	59
3.3.3	Zellinhaltsanalyse	60
3.3.4	<i>Molecular Replacement</i> und Strukturverbesserung	61
3.3.5	Finale Kristallstruktur des HbXI	69
3.3.6	Salzbrücken	75
3.3.7	Die 2,3-BPG Bindestelle des HbXI	83
4	Diskussion - <i>Ceratotherium simum</i> Hämoglobin (HbCs)	84
4.1	Qualität des Datensatzes	84
4.2	Einfluss des Austauschs geladener Aminosäuren auf die Struktur des HbCs	86
4.3	Die 2,3 Biphosphoglycerat Bindestelle des HbCs	87
4.4	Vergleich der Aminosäure an Position $\beta 2$ im Hämoglobin verwandter Arten des Breitmaulnashorns und anderer großer Tiere.	89
4.4.1	Die Kristallisation des HbCs im R2-Zustand	90
4.5	Zusammenfassung	92
5	Diskussion - <i>Xenopus laevis</i> Hämoglobin (HbXI)	93
5.1	Qualität der Messdaten und der Kristallstruktur	93
5.2	Haltbarkeit des HbXI	96
5.2.1	Hydrophober Charakter des HbXI	96
5.2.2	Disulfidbrücke als Auslöser einer Polymerisation des HbXI	98
5.3	Die 2,3-BPG Bindestelle des HbXI und ihr Einfluss auf die O ₂ -Bindung	99

5.4	Die <i>Switch</i> -Region des HbXl	101
5.5	Unterschiede zwischen larvalem und adultem HbXl und der Einfluss der Aminosäure auf Position β 38 auf die Physiologie der Sauerstoffbindung .	104
5.6	Das HbXl und der Root Effekt	106
5.6.1	Die strukturellen Auslöser des Root-Effektes bei Knochenfischen im Vergleich mit der Struktur HbXl	108
5.6.2	Schaltermechanismus als Erklärung für den rudimentären Root-Effekt des HbXl	113
5.6.3	Der molekulare Schalter und die Isoformen des adulten HbXl . . .	116
5.6.4	Existenz des molekularen Schalters in den Root-Effekt Hbs der Knochenfische	117
5.7	Zusammenfassung	118
6	Quellenverzeichnis	119
7	Anhang	133
	Danksagung	143
	Lebenslauf	144
	Erklärung und Copyright	145

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (0,1 nm)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
BPG	(2,3)-Biphosphoglycerat
Da	Dalton = $1,66 \times 10^{-27}$ kg
dl	Deziliter
dm	Dezimeter
Hb	Hämoglobin
HbCs	Hämoglobin des Breitmaulnashorns <i>Ceratotherium simum</i>
HbCTn	Kathodisches Hämoglobin des Fisches <i>Trematomus newnesi</i>
HbEc	Hämoglobin des Pferdes <i>Equus caballus</i>
HbPb	Hämoglobin des Fisches <i>Pagothenia bernacchi</i>
HbXl	Hämoglobin des Krallenfroschs <i>Xenopus laevis</i>
HCL	Salzsäure
IPP	Inositolpentaphosphat
K	Kelvin
L	Liter
M	Molar
mM	Millimolar
Mb	Myoglobin
NaCl	Natriumchlorid
(NH₄)₂SO₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P50	Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Sättigung
pdb	Dateiformat der RCSB Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
RBK	Rote Blutkörperchen
RMSD	engl. root mean square deviation
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SB	Salzbrücke
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
Vis	Visible = sichtbarer Bereich des Lichtes
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Versorgung von Zellgewebe mit ausreichend Sauerstoff ist essentiell für alle komplexen, aerob lebenden, höheren Organismen. Zu Anfang der Evolution erfolgte der Gasaustausch zunächst über die Haut, welche den Sauerstoff aus der Atmosphäre oder dem Wasser über Diffusion aufnimmt. Bei Mikroorganismen wie Bakterien, Algen oder auch bei kleinen feuchtlebenden Tieren, wie dem Regenwurm, ist die Hautatmung ausreichend um den gesamten Körper mit Sauerstoff zu versorgen (PAUL, 2001). Bei Insekten entwickelte sich die Hautatmung zur Tracheenatmung weiter. Bei Tracheen handelt es sich um Einstülpungen sehr dünner Hautstellen, die in den Körper hineinragen und ein verzweigtes Röhrensystem bilden. Durch diese Vergrößerung der Körperoberfläche wird die Sauerstoffaufnahme erheblich verbessert. Tiere mit Tracheen weisen nur eine geringe Körpergröße auf, da die Effizienz dieses Gasaustauschs von der Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs begrenzt ist (WEST, 2012). Während sich bei Fischen die Kiemenatmung etablierte, hat sich dagegen bei Amphibien, Reptilien, Vögeln und den Säugetieren die Lungenatmung entwickelt und immer weiter spezialisiert. Lungen-, Kiemen- und Tracheenatmung wurden entscheidend unterstützt durch die Entwicklung von respiratorischen Proteinen, welche den Sauerstoff reversibel binden und im Blutkreislauf durch den Körper transportieren (DECKER & VAN HOLDE, 2011). Während bei der Tracheenatmung die Existenz von Atmungsproteinen nicht unbedingt erforderlich ist, sind sie essentiell für die Atmung über die Lunge.

Zu den bekanntesten Proteinen dieser Art gehören Hämoglobin und Myoglobin. Hämoglobine regeln den Sauerstofftransport bei Vertebraten, also z.B. beim Menschen, aber auch bei speziellen Invertebraten. Myoglobin speichert Sauerstoff in Muskelzellen, um die Versorgung der Mitochondrien zur Synthese von ATP zu gewährleisten (BERG ET AL., 2014). Hämoglobine und Myoglobine besitzen einen Eisenporphyrinring, mit dem je ein Sauerstoffmolekül eine reversible Bindung eingehen kann (BALDWIN, 1980). Dieses Eisen-Ringsystem wird als Häm-Gruppe bezeichnet.

Viele höher entwickelte Gliederfüßer (Arthropoden) und Weichtiere (Mollusken) besitzen dagegen Hämocyanine. Die Sauerstoffbindung erfolgt bei diesen Proteinen nicht über ein Eisenatom, sondern über zwei Kupferatome. Diese werden im aktiven Zentrum des Proteins durch jeweils drei Histidin-Reste in einer *four-alpha-helix-bundle*-Anordnung komplexiert (VAN HOLDE ET AL., 2001).

Neben Hämoglobin, Myoglobin und Hämocyanin existiert noch Hämerythrin, welches bei marinen Wirbellosen (z.B. Spritzwürmern, Ringelwürmern und Armfüßern) den Sauerstofftransport gewährleistet. Trotz seines Namens, trägt es keine Hämgruppe im aktiven Zentrum, sondern die Eisenionen des Hämerythrins sind direkt mit der Proteinstruktur verbrückt (TERWILLIGER, 1998).

Da im Rahmen dieser Dissertation die Kristallstruktur von zwei Hämoglobinen ermit-

telt werden soll, wird in den nächsten Kapiteln näher auf den Aufbau, die Funktion und die Eigenschaften der Hämoglobine eingegangen.

1.1 Die Globin-Familie

Die Proteinfamilie der Globine (lat.: *globus* = Kugel) zeichnet sich durch ihre Fähigkeit aus Sauerstoff reversibel zu binden (DICKERSON & GEIS, 1983). Dafür verantwortlich ist der Eisen(II)-Komplex des Protoporphyrins IX, besser bekannt als "Häm" (gr.: *haíma* = Blut), welcher als Kofaktor gebunden wird (HARDISON, 1996). Globine existieren in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Tieren und sind somit ubiquitär in allen Reichen der Lebewesen vorhanden (HARDISON, 1996). Bekannt sind unter anderem die Flavohämoglobine der Bakterien und Pilze (BONAMORE & BOFFI, 2008), die Leghämoglobine der Pflanzen (KUBO, 1939; APPLEBY, 1962), Globine der Wirbellosen (GOODMAN ET AL., 1988), sowie die Myoglobine (Mb) und Hämoglobine (Hb) der Wirbeltiere (WEBER & WELLS, 1989). Diese beiden Proteine waren auch die ersten, an denen die Röntgenkristallstrukturaufklärung gelang und deren molekulare Struktur ermittelt wurde. Für diese Leistung erhielten John Kendrew und Max Perutz den Nobelpreis für Chemie im Jahre 1962 (KENDREW ET AL., 1958; PERUTZ ET AL., 1960).

Obwohl sich die Aminosäuresequenzen der Globine teilweise sehr stark unterscheiden (z.B. 80% Identitätsunterschied zwischen Leghämoglobin und Vertebraten Hämoglobin), besitzen sie alle die gleiche dreidimensionale Grundstruktur (RIGGS, 1991; ERMILER ET AL., 1995; HARDISON, 1996). Diese „klassische Globinfaltung“ besteht aus rund 140-180 Aminosäuren und setzt sich aus sieben bis acht α Helices zusammen, die mit A,B,C,D,E,F,G und H bezeichnet werden (Abb. 1, rechts), wobei die kurze Helix D nicht in allen Formen der Globine ausgebildet ist (DICKERSON & GEIS, 1983; BASHFORD ET AL., 1987). Eine Ausnahme zu dieser Grundstruktur bilden die Flavohämoglobine, denn sie besitzen neben dieser klassischen Domäne eine weitere, die sich auch aus β -Faltblättern zusammensetzt (ERMILER ET AL., 1995). Globine liegen üblicherweise als Monomere (Myoglobin), Dimere (Globine der Mollusken) oder Tetramere (Hämoglobin) vor, sie können sich aber auch zu Multiglobin-Aggregaten verknüpfen (Globine der Nematoden und Anneliden)(GOODMAN ET AL., 1988).

1.2 Hämoglobin

Das Hämoglobin der Vertebraten gehört, auch aufgrund der frühen Ermittlung der Kristallstruktur durch PERUTZ ET AL. (1960), zu den besterforschten Proteinstrukturen. Es besteht aus zwei Heterodimeren, die sich aus einer α - und einer β -Untereinheiten zusammensetzen, welche üblicherweise aus ca. 140 Aminosäuren aufgebaut sind (~ 16 kDa). Das tetramere Hämoglobin besitzt eine molekulare Masse von ~ 64 kDa und einen Durchmesser von 50-60 Å. Jede der Untereinheiten weist die typische Globin-Faltung aus

sieben bzw. acht α -Helices auf und trägt eine Hämgruppe, an dessen Eisenzentrum jeweils ein Sauerstoffmolekül reversibel gebunden werden kann. Die Heterodimere sind hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander koordiniert und um eine gemeinsame zweizählige Rotationsachse angeordnet.

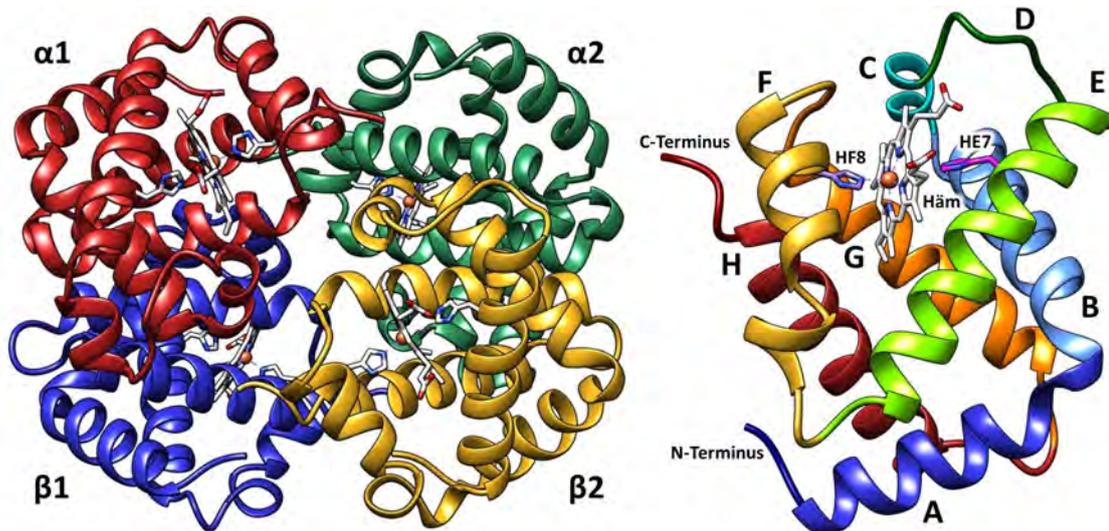


Abbildung 1: **Hämoglobin-Tetramer und klassische Globinfaltung der Untereinheiten.** **Links:** Die typische Faltung der Hämoglobin-Tetramere am Beispiel des humanen Hämoglobins (pdb: 1A3N). Es ist aus zwei identischen α - (rot, grün) und β -Untereinheiten (blau, gelb) aufgebaut, die miteinander zu Dimeren (rot/blau, grün/gelb) assoziieren. Jede der Untereinheiten trägt eine Hämgruppe (weiß, Stickdarstellung) und ist in der Lage ein Sauerstoffmolekül reversibel zu binden. **Rechts:** Typische Faltung der Globin-Proteinfamilie am Beispiel der α -Untereinheit des humanen Hämoglobins (pdb:1A3N). Ein Globin setzt sich aus sieben bis acht α -Helices zusammen (A-H) und trägt eine Hämgruppe. Wichtig bei der Sauerstoffbindung sind das proximale Histidin HF8 und das distale Histidin HE7.

1.2.1 Sauerstoffbindung

Bei der Bindung des Sauerstoffs durch das Hämoglobin spielen zwei Histidine im Zusammenhang mit der Hämgruppe eine bedeutende Rolle. Das Eisenion in der Mitte des Protoporphyrins besitzt unbesetzte Bindungsstellen, jeweils eine auf beiden Seiten der Hämebene (Abb. 2). Man spricht in diesem Sinne von der 5. und 6. Koordinationsstelle. Die 5. Koordinationsstelle wird durch das sogenannte proximale Histidin besetzt (BERG ET AL., 2014). Da die Numerierung der Aminosäuren in der Sequenz von Spezies zu Spezies und auch innerhalb der α - und β -Untereinheit variiert, wird es auch synonym als HisF8 bezeichnet, da es an der achten Stelle der Helix F sitzt. An der 6. Koordina-

tionsstelle findet die Bindung des Sauerstoffmoleküls statt. Das zweite Histidin HisE7, auch distales Histidin genannt, stabilisiert durch eine zusätzliche Wasserstoffbindung den Sauerstoffkomplex und verhindert die Freisetzung von Superoxid bei der Freisetzung des Sauerstoffs (Abb. 2) (BERG ET AL., 2014).

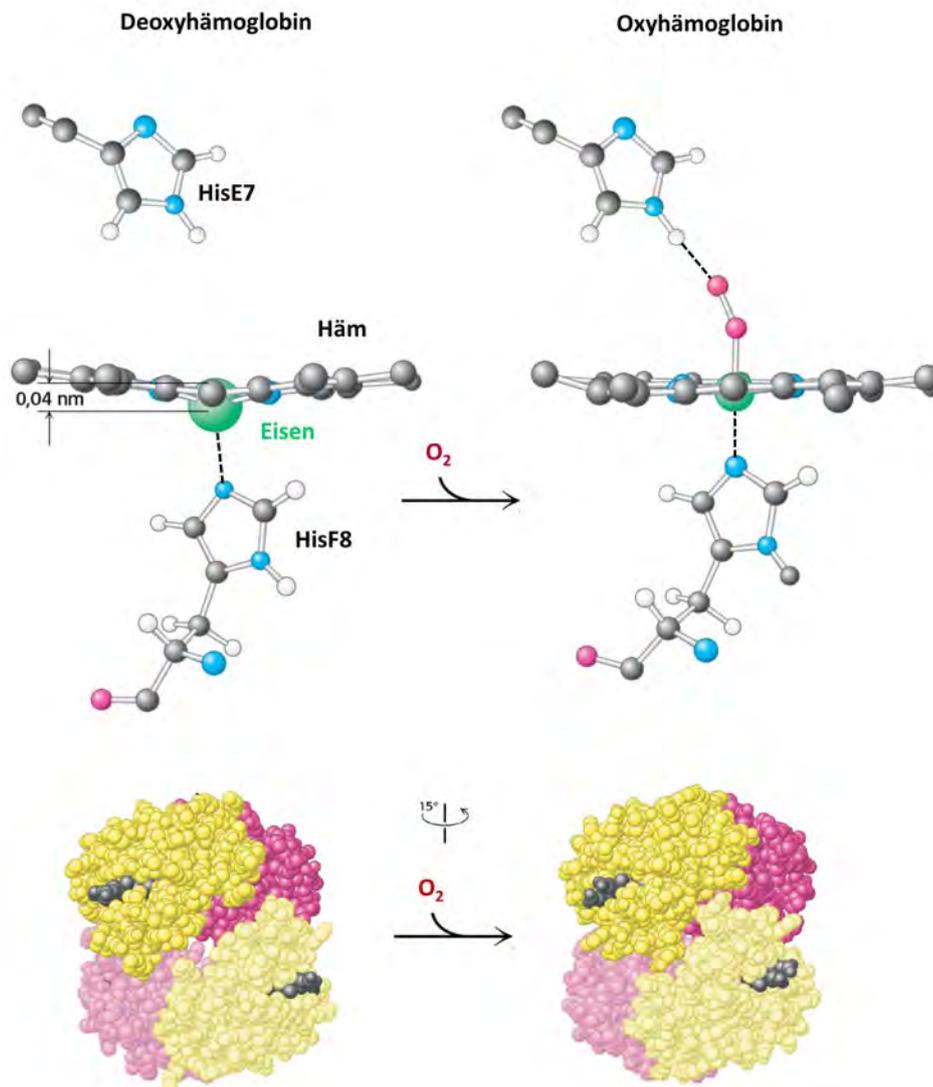


Abbildung 2: **Deoxy- und Oxyhämoglobin im Vergleich.** Die Abbildung zeigt die strukturellen Änderungen der Hämgruppe bei Beladung mit Sauerstoff. Eine wichtige Rolle spielen dabei das proximale Histidin HisF8, welches die 5. Koordinationsstelle des Eisens (grün) im Zentrum der Hämgruppe besetzt, und das distale Histidin HisE7, welches eine Wasserstoffbrücke (gestrichelte Linie) mit gebundenem Sauerstoff herstellt und damit die Bildung von Superoxid verhindert. Bei der Bindung des Sauerstoffs erfolgt eine 15°-Drehung der beiden Dimere (gelb und rot, Hämgruppe schwarz). Abbildung verändert nach BERG ET AL. (2014).

Die Bindung des Sauerstoffs bringt eine Strukturveränderung innerhalb des Moleküls mit sich. Sie ist bedingt durch die Größenveränderung des Eisenatoms im Hämzentrum, aufgrund des Wechsels zwischen dem *high spin*- und *low spin*-Zustand des Atoms. Ist das Zentrum unbeladen, so ist die Elektronenverteilung des Eisens zu groß um in die Mitte der Porphyrinebene zu passen und liegt daher etwas außerhalb (0,4 Å) (Abb. 2, links). Die Hämebene ist deswegen leicht gebogen (BERG ET AL., 2014). Durch die Bindung des Sauerstoffs und durch die partielle Übertragung eines Eisen(II)-Ions auf letzteren, orientieren sich die Elektronen in den Orbitalen des Eisens neu. Es besitzt anschließend einen kleineren Durchmesser und kann in die Mitte der nun planaren Hämebene verschoben werden (Abb. 2, rechts). Es handelt sich dabei um den energetisch günstigeren Zustand der Hämgruppe. Diese zunächst kleine Verschiebung von 0,04 nm bedingt allerdings eine Positionsänderung des proximalen Histidins und somit der kompletten Helix F, dem EF- sowie dem FG-Übergang. Am Ende dieser Kettenreaktion lässt sich eine relative Drehung des $\alpha_1\beta_1$ Dimers zum $\alpha_2\beta_2$ Dimer um 15° feststellen, welche den zentralen Hohlraum des Proteins verkleinert (Abb. 2) (BALDWIN & CHOTHIA, 1979). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Deoxyhämoglobin bzw. T-Form (engl. *tense* = gespannt) und Oxyhämoglobin bzw. R-Form (engl. *relaxed* = entspannt) (BERG ET AL., 2014).

1.2.2 Kooperativität und der allosterische Effektor 2,3-BPG

Die tetramere Struktur des Hämoglobins besitzt aufgrund dieses Konformationswechsels eine wichtige Eigenschaft: Die Kooperativität. Wird eine der Untereinheiten oxygeniert, so führt dies aufgrund der Strukturänderung (von T nach R) der oxygenierten Untereinheit auch zu einer Strukturänderung (von T nach R) der noch unbeladenen Untereinheiten. Sie können dadurch den Sauerstoff leichter binden. Dies gilt auch im umgekehrten Falle, bei der Endladung des Sauerstoffs in den Geweben. Die Untereinheiten des Hämoglobins kooperieren also miteinander, um den Sauerstoff höchst effektiv aufnehmen und wieder abgeben zu können. Das monomere Myoglobin, welches den Untereinheiten des Hämoglobins sehr ähnlich ist, besitzt diese Eigenschaft nicht und der Unterschied des Beladungsverhalten ist sehr gut in Sauerstoffbindungskurven beider Proteine zu erkennen (Abb. 3A). Die Bindungskurve des Hämoglobins (rot) weist, im Gegensatz zu der des Myoglobins (schwarz, gestrichelt), einen sigmoiden Verlauf auf. Der Halbsättigungsdruck (P50) des Hämoglobins in den Erythrozyten beträgt 26 Torr und der des Myoglobins 2 Torr. Je kleiner der P50, desto höher ist auch die Affinität der Proteine zu ihrem Substrat (BERG ET AL., 2014).

Bei dem Vergleich von Sauerstoffbindungskurven von Hämoglobin in Erythrozyten und aufgereinigtem Hämoglobin fällt auf, dass gereinigtes Hämoglobin den Sauerstoff sehr viel stärker bindet (ähnlich dem Myoglobin) (1 Torr) (Abb. 3B). Weitere Analysen zeigten, dass die T-Form des Hämoglobins sehr viel instabiler ist als angenommen und

durch einen allosterischen Effektor stabilisiert wird, der bei aufgereinigtem Hämoglobin nicht mehr vorliegt. Es handelt sich dabei um 2,3-Biphosphoglycerat (2,3-BPG), welches in den Erythrozyten in gleicher Konzentration vorhanden ist wie das Hämoglobin (ca. 2 mM) (BENESCH & BENESCH, 1967; TYUMA ET AL., 1973).

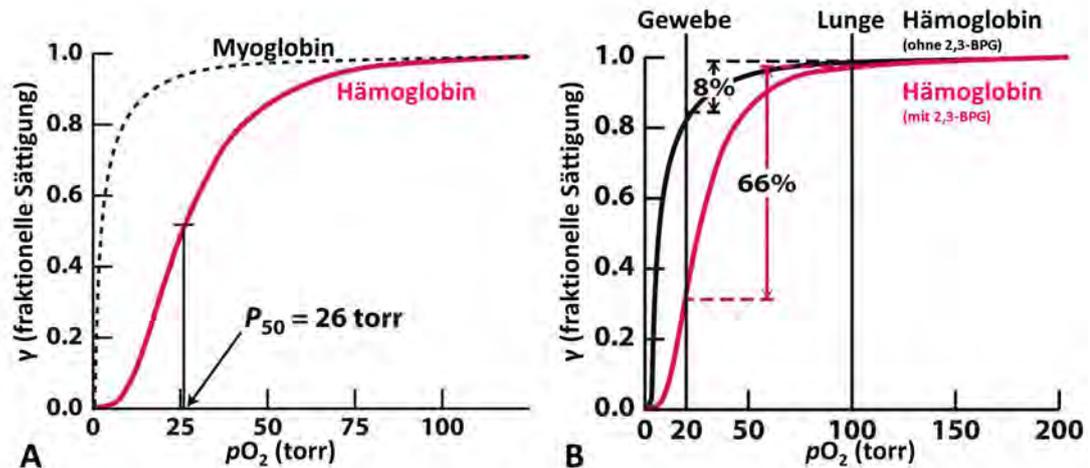


Abbildung 3: **Kooperativität und Einfluss des Effektors 2,3-BPG auf die Sauerstoffbindung** **A:** Die Kooperativität des tetrameren Hämoglobins (rot) wird anhand der sigmoiden Sauerstoffbindungskurve deutlich, ganz im Gegensatz zum Myoglobin (schwarz). **B:** Der allosterische Faktor 2,3-BPG verringert die Sauerstoffaffinität (rot) des Hämoglobins, sodass es in der Lunge maximal oxygeniert vorliegt und im Gewebe dagegen nur zu 34% oxygeniert vorliegt. Abbildung verändert nach BERG ET AL. (2014).

Dieser Effektor bindet in eine Tasche im $\beta_1\beta_2$ -Zwischenraum, welche von positiven Resten umgeben ist, stabilisiert den unbeladen Zustand (T) und führt zu einer Affinitätsverminderung des Proteins, welche den effektiven Transport des Sauerstoffs ermöglicht. Bei Vögeln erfolgt ein nahezu identischer Vorgang mit Hilfe des Effektors Inositolpentaphosphat (IPP) und bei Fischen und Amphibien mit dem Effektor ATP (ROLLEMA & BAUER, 1979; VOET ET AL., 2010).

Bei Säugern ist die Bindung des Inhibitors 2,3-BPG essentiell für die Versorgung von Embryonen im Mutterleib. Embryonen besitzen einen anderen Hämoglobintyp als Erwachsene. Ihr als fetales Hämoglobin bezeichnetes Tetramer setzt sich aus zwei α - und zwei γ -Untereinheiten zusammen und die γ -Untereinheit besitzt im Gegensatz zur β -Untereinheit einen Austausch in der 2,3-BPG Bindetasche, sodass dieses nicht mehr gebunden werden kann. Das Hämoglobin des heranwachsenden Embryos/Fetus besitzt somit eine viel höhere Sauerstoffaffinität als der normale Hämoglobintyp und der Sauerstoff kann effektiv von den Erythrozyten der Mutter auf die des Kindes übertragen werden (BERG ET AL., 2014).

Neben 2,3-BPG und IPP nehmen noch zahlreiche andere Faktoren Einfluss auf die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Dazu zählen unter anderem der pH-Wert, die Temperatur, der Sauerstoffpartialdruck und die Ionenstärke (JENKINS ET AL., 2009).

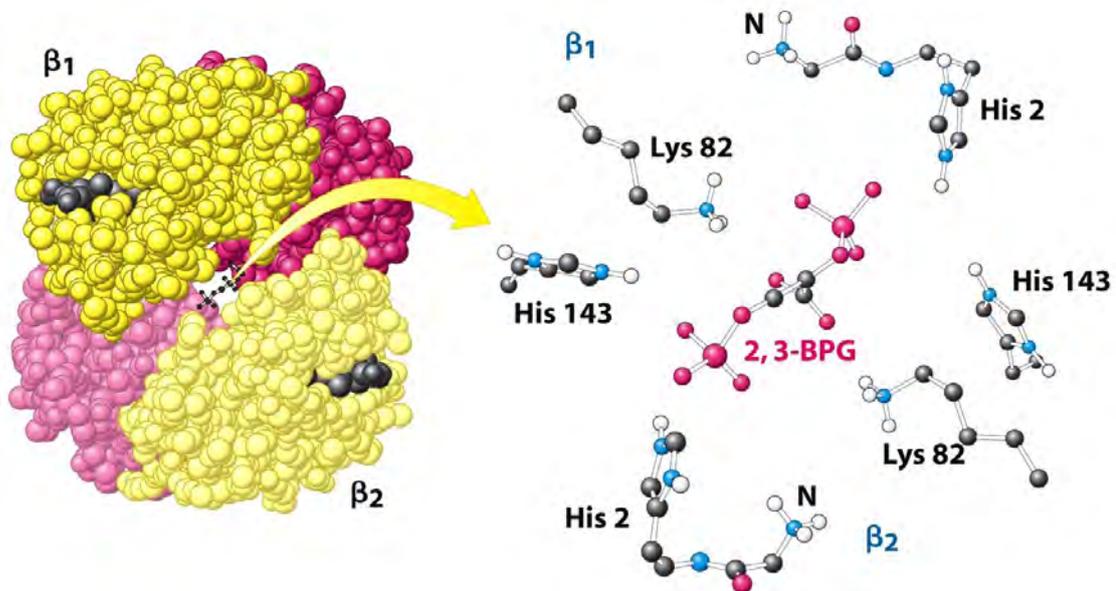


Abbildung 4: **Bindestelle des allosterischen Faktors 2,3-BPG.** **A:** Die Bindestelle liegt in der Kontaktfläche der beiden β -Untereinheiten (gelb). **B:** Das negativ (rot) geladene 2,3-BPG wird von den sechs positiv (blau) geladenen Aminosäuren in der Umgebung koordiniert. Es handelt sich dabei um β His2, β Lys82 und β His143 beider β -Untereinheiten. Abbildung nach BERG ET AL. (2014).

1.2.3 Die verschiedenen Konformationszustände des Hämoglobins

Zwei theoretische Modelle versuchen die kooperative Bindung von Liganden an Proteinkomplexe zu erklären. Das MWC-Modell geht von einem „Alles-oder-nichts“-Prinzip aus, bei dem das Protein entweder vollständig in seiner beladenen (R) oder unbeladenen Quartärstruktur (T) vorliegt (MONOD ET AL., 1965). Das KNF-Modell dagegen geht von einem *induced fit*-Übergang aus, bei dem sich die einzelnen Untereinheiten über eine tertiäre Strukturänderung an den Liganden anpassen und so eine Strukturänderung in der benachbarten Untereinheit auslösen. (KOSHLAND ET AL., 1966). Max Perutz verfeinerte diese Modelle zum sogenannten „stereochemischen Modell“ aufgrund seiner Erkenntnisse über die strukturellen Vorgänge bei der Sauerstoffbindung (PERUTZ, 1970, 1972, 1989; PERUTZ ET AL., 1998). Es existieren noch weitere, auf diesen Grundideen aufbauende Theorien, wie z.B. das Cooperon-Modell (BRUNORI ET AL., 1986), das SK-

Modell (SZABO & KARPLUS, 1972), das modifizierte SK-Modell (LEE & KARPLUS, 1983), das TTS-Modell (HENRY ET AL., 2002) und das globale Allosterie-Modell (YONETANI & TSUNESHIGE, 2003). Auf diese Modelle soll hier nicht weiter eingegangen werden, jedoch existieren ausführliche Zusammenfassungen zu diesem Thema in der Literatur z.B. EATON ET AL. (2007); CIACCIO ET AL. (2008); YUAN ET AL. (2015).

Nach weiteren Forschungsergebnissen stellte sich für das Hämoglobin heraus, dass, neben den in Kapitel 1.2.1 beschriebenen T- und R-Zuständen, noch weitere Konformationszustände existieren. Zunächst erfolgte die Entdeckung des R2-Zustandes (SMITH ET AL., 1991), wobei diskutiert wurde, ob dieser eine Zwischenstufe (SILVA ET AL., 1992) oder einen neuen Endzustand beim Übergang zwischen den Beladungszuständen des Hämoglobins darstellt (SRINIVASAN & ROSE, 1994; SCHUMACHER ET AL., 1997). Inzwischen wurden noch weitere Konformationen entdeckt, sodass sich die in Abb. 5 dargestellte Übersicht ergibt (MUESER ET AL., 2000; BISWAL & VIJAYAN, 2002; SAFO & ABRAHAM, 2005).

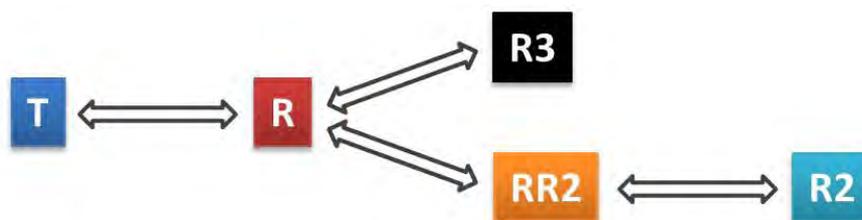


Abbildung 5: **Zusammenhang der Hämoglobin-Konformationen.** Das unbeladene Hämoglobin (T, dunkelblau) gelangt bei der Bindung des Liganden, üblicherweise O₂, über den Zwischenzustand R (rot) entweder in die Endkonformation R3 (schwarz) oder über einen weiteren Zwischenzustand (RR2, gelb) in den Endzustand R2 (hellblau) (SAFO & ABRAHAM, 2005).

Der R-Zustand stellte sich demnach als Zwischenkonformation heraus, der entweder zur Quartärstruktur des R3-Zustandes führen kann oder über den RR2-Zustand im R2-Zustand endet (SAFO & ABRAHAM, 2005). Die strukturellen Änderungen zwischen dem T-Zustand und dem R2-Zustand sind dabei genauso groß wie zwischen dem T-Zustand und dem R3-Zustand. Allerdings zeigte sich, dass der R3-Zustand noch energetisch günstiger ist als der R2-Zustand und damit die größte Affinität zum Sauerstoff aufweist (SAFO & ABRAHAM, 2005).

Der Übergang dieser Zustände lässt sich sehr gut in der sogenannten *Switch*-Region beobachten (Abb. 6). Dieser hochkonservierte Bereich befindet sich im $\alpha_1\beta_2$ bzw. $\alpha_2\beta_1$ *Interface* und besteht aus den Aminosäuren α Pro37, α Thr38, α Thr41, α Pro44 der Helix C (weiß) und dem gegenüberliegenden β His97 auf Loop FG (BALDWIN & CHOTHIA, 1979). Beim Übergang vom unbeladenen T-Zustand in die R-Zustände des Hämoglobins und der daraus resultierenden Drehung der beiden Dimere um 15° (siehe Kapitel 1.2.1),

verändert βHis97 seine Position (violetter Pfeil) und passiert dabei αThr41 und αThr38 , mit denen es Wasserstoffbrücken bilden kann (SAFO ET AL., 2011). Abb. 6 zeigt die *Switch*-Region und die bisher bekannten Positionen des βHis97 am Beispiel des menschlichen Hämoglobins: T (dunkelblau, pdb: 2HHB), R (rot, pdb: 1HHO), RR2 (orange, pdb: 1MKO), R2 (hellblau, pdb: 1BBB) und R3 (dunkelgrau, pdb: 1YZI) (SHAANAN, 1983; FERMI & PERUTZ, 1984; ARNONE & SILVA, 1993; SAFO & ABRAHAM, 2002, 2005).

Die Existenz mehrerer End- und Zwischenkonformationen des Hämoglobins sowie der Einfluss äußerer Faktoren, z.B. des Sauerstoffpartialdrucks, der Ionenstärke, dem pH-Wert, Effektoren wie dem 2,3-BPG und der Temperatur, zeigt deutlich die Komplexität des Sauerstoffbindungsprozesses. Einfache Modelle, wie das MWC- bzw. das KNF-Modell sind zwar prinzipiell korrekt, aber reichen nicht aus um den Vorgang in seiner Ganzheitlichkeit zu erfassen (JENKINS ET AL., 2009; YUAN ET AL., 2015).

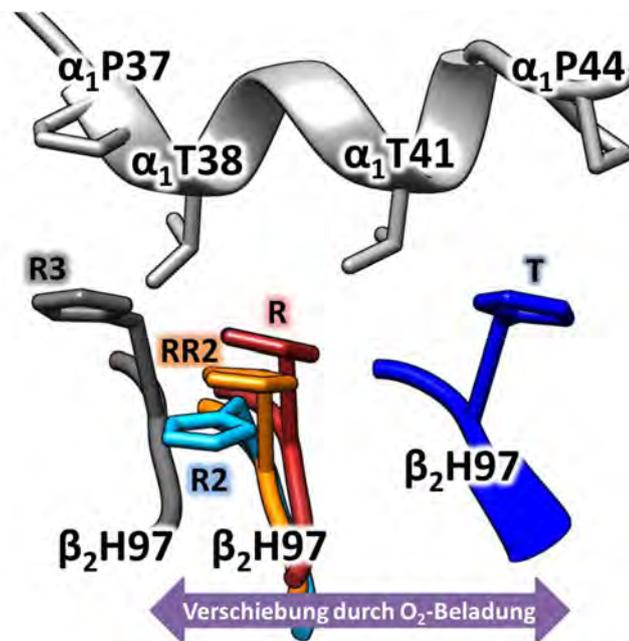


Abbildung 6: **Die *Switch*-Region des menschlichen Hämoglobins im $\alpha_1\beta_2$ - bzw. $\alpha_2\beta_1$ -Interface.** Das βH97 wandert bei der Sauerstoffbeladung des Hämoglobins (violetter Pfeil) vom unbeladenen T-Zustand (dunkelblau, pdb: 2HHB) in die verschiedenen R-Zustände: R (rot, pdb: 1HHO), RR2 (orange, pdb: 1MKO), R2 (hellblau, pdb: 1BBB) und R3 (dunkelgrau, pdb: 1YZI) (SHAANAN, 1983; FERMI & PERUTZ, 1984; ARNONE & SILVA, 1993; SAFO & ABRAHAM, 2002, 2005). Das Histidin passiert dabei αT41 und αT38 der α -Untereinheit, mit denen es Wasserstoffbrücken ausbilden kann (SAFO ET AL., 2011).

1.2.4 Bohr-Effekt

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, besitzt der pH-Wert einen Einfluss auf das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämoglobins. Diese Eigenschaft wurde erstmals von Christian Bohr im Jahre 1904 beschrieben (BOHR ET AL., 1904). Sinkt der pH-Wert des Blutes, z.B. durch die steigende Konzentration von CO_2 , so sinkt auch die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Der Bohr-Effekt trägt so zur Effizienz der Sauerstoffbeladung und Entladung bei. In der Lunge, wo O_2 aufgenommen werden soll, ist der pH-Wert durch die vorherige Abgabe von CO_2 erhöht ($\text{pH} = 7,4$) und die Affinität steigt. In den Geweben dagegen liegt eine höhere CO_2 -Konzentration vor, der pH-Wert und die Affinität des Hämoglobins sinken ($\text{pH} = 7,2$) und der Sauerstoff wird abgegeben (PERUTZ, 1970).

PERUTZ (1970) formulierte folgenden Mechanismus für die Erklärung des Bohr-Effekts, welcher zwar nicht endgültig als bewiesen gilt, jedoch wissenschaftlich anerkannt ist. Eine wichtige Rolle spielt dabei das endständige Histidin βHisHC3 , welches in geladenem Zustand eine Salzbrücke mit dem Asparagin βAspFG1 bildet. Die Carboxygruppe des C-terminalen Endes kann so eine Bindung mit dem Lysin αLysC5 eingehen und so die T-Struktur stabilisieren. Bei niedrigem pH-Wert ist die Ladung des Histidins schwächer, die Bindung zu βAspFG1 daher ebenfalls und die Carboxygruppe des C-Terminalen Endes favorisiert eine Bindung mit Lysin βLysHC1 .

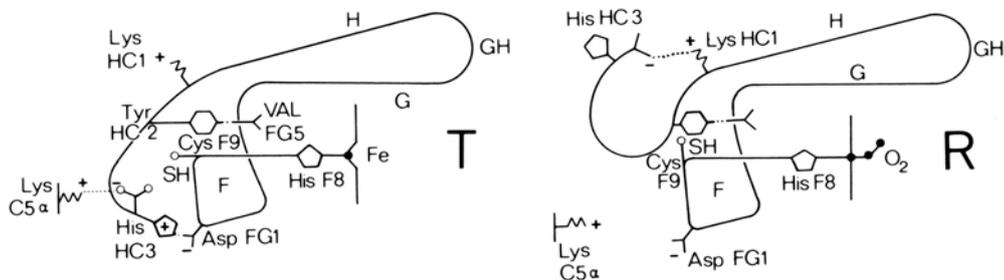


Abbildung 7: **Mechanismus des Chlorid-unabhängigen Teils des alkalischen Bohr-Effekts beim Menschen.** Die Konformationsänderung des endständigen $\beta\text{Histidin146}$ (HisHC3) des humanen Hämoglobins während der Transformation vom T- in den R- Zustand. Abbildung verändert nach PERUTZ (1970).

1.2.5 Root-Effekt

Der Root-Effekt beschreibt einen Spezialfall des Bohr-Effektes. Hier bewirkt die Herabsenkung des pH-Wertes zwar ebenfalls eine Reduzierung der Sauerstoffaffinität, jedoch verringert sich zusätzlich die gesamte O_2 -Aufnahmekapazität des Hämoglobins (ROOT, 1931). Selbst bei hohen Sauerstoffpartialdrücken können Hämoglobine mit dieser

Eigenschaft nicht vollständig oxygeniert werden (SCHOLANDER & VAN DAM, 1954). Der Root-Effekt wurde hauptsächlich bei den echten Knochenfischen (Teleostei) beobachtet (BRITAIN, 1987), woraus sich auch der physiologische Nutzen dieser Anpassung ableitet. Es hat sich die Annahme etabliert, dass der Root-Effekt bei der Befüllung von Schwimmblasen in erheblichen Meerestiefen oder der Versorgung von schwach vaskularisierten Retinalgeweben eine Rolle spielt (INGERMANN & TERWILLIGER, 1982; BRITAIN, 2005). Hierbei ist ein feines Geflecht aus Arterien nötig, die *Rete mirabile*, welche unabhängig voneinander, an der Schwimmblase (Schwimmblasen *Rete*) und der Retina der Fische (*Choroide Rete*) vorliegt (WITTENBERG & HAEDRICH, 1974; BRITAIN, 2005). Die Gasdrüse der Schwimmblase sowie die Retina sind dazu in der Lage Milchsäure zu produzieren. Die Drüsen senken so den pH-Wert des Blutes innerhalb der *Rete mirabile* (KUHN & KUHN, 1961; HOFFERT & FROMM, 1970; BRITAIN, 1987). Root-Effekt-Hämoglobine verlieren innerhalb der *Rete* ihre Affinität zum Sauerstoff und geben diesen daher bevorzugt ab (BRITAIN, 2005). Selbst bei hohen Sauerstoffpartialdrücken in der Umgebung oder bei einer Umgebung mit niedrigem Sauerstoffgehalt werden die Augen so mit ausreichend Sauerstoff versorgt bzw. die Schwimmblase mit Sauerstoff befüllt (INGERMANN & TERWILLIGER, 1982; BRITAIN, 2005). Da sich der Root-Effekt 150 Millionen Jahre vor dem Auftauchen der *Choroide Rete* und der *Rete mirabile* entwickelt hat, wird vermutet, dass es sich bei dieser physiologischen Bedeutung um eine Exaptation handelt (BERENBRINK ET AL., 2005; BERENBRINK, 2007). Als Exaptation bezeichnet man die Nutzbarmachung einer Funktion, für die sie ursprünglich nicht entstanden ist. Als evolutionär ursprüngliche Funktion der Root-Effekt-Hämoglobine wird die Verbesserung der O₂-Versorgung des Gewebes in Zeiten azidotischen Stresses postuliert (RUMMER ET AL., 2013).

Die *Review*-Veröffentlichungen von BRITAIN (1987) und RIGGS (1988) betonen, dass folgende vier wichtige Voraussetzungen erfüllt sein müssen, damit ein Hämoglobin als Root-Effekt Protein bezeichnet werden kann (KISTER ET AL., 1989):

1. Bei saurem pH-Wert, aber sonst physiologischen Bedingungen (Temperatur, Effekorkonzentrationen, Sauerstoffpartialdruck der Raumluft) kann das Hämoglobin nicht vollständig oxygeniert werden.
2. Ein starkes Abfallen der Sauerstoffaffinität bei einem pH < 7, was einem verstärkten Bohr-Effekt entspricht.
3. Das Hämoglobin verliert seine Kooperativität ($n_{50} \sim 1$) bei niedrigem pH-Wert und
4. der biphasische Hillplot in CO Bindungskurven zeigt ein großes Ungleichgewicht zwischen der α - und der β -Kette des Proteins.

Seit der Etablierung der Röntgenkristallstrukturaufklärung von Proteinen wurde in vielen wissenschaftlichen Studien nach dem strukturellen Auslöser des Root-Effekts innerhalb des Hämoglobins gesucht (siehe Kapitel 5.6, S. 106). Bis heute konnte allerdings keine der Annahmen zweifelsfrei bestätigt werden.

1.3 Ziel der Arbeit

In dieser Doktorarbeit wurde die Kristallisation und die Strukturaufklärung der Hämoglobine des Breitmaulnashorns *Ceratotherium simum* (HbCs) und des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (HbXl) durchgeführt. Anschließend folgte die Analyse der gewonnenen Kristallstrukturen auf Besonderheiten in Form und Funktion des Proteins.

Beim Hämoglobin des Breitmaulnashorns *Ceratotherium simum* handelt es sich um ein typisches Hämoglobin der Mammalia, jedoch weisen BAUMANN ET AL. (1984) mit Sauerstoffbindungskurven eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Nashorn Hämoglobins nach. BAUMANN ET AL. (1984) und MAZUR ET AL. (1982) erklären sich dies durch eine Veränderung in der 2,3-BPG Bindestelle. Heutzutage bereitet diese hohe Affinität vor allem den Tiermedizinern bei der Narkose der großen Tiere Probleme, da die hohe Affinität des Hämoglobins nicht vergleichbar mit anderen Tierarten ist und die Pulsoxymetrie-Methode daher falsche Ergebnisse liefert (HAYMERLE ET AL., 2016). Die Kristallstruktur des HbCs soll Einblicke in den molekularen Aufbau des Proteins liefern und sicherstellen, ob die hohe Affinität tatsächlich durch das Fehlen der Inhibitorbindung verursacht wird, oder ob andere strukturelle Eigenschaften einen Auslöser dafür darstellen könnten.

Beim Krallenfrosch handelt es sich um einen Modellorganismus in Medizin und Forschung. Da die Gesamtheit der Aminosäuresequenzen des Proteins nur zu 51% identisch mit den Aminosäuren des menschlichen Hämoglobins sind, liefert die Kristallstruktur des HbXl neue Erkenntnisse im Bereich der Hämoglobinforschung. Neben der allgemeinen Analyse der tetrameren Struktur und der Bindungskräfte zwischen den Untereinheiten, stand hier die Suche nach Struktureigenschaften im Mittelpunkt, welche Einfluss auf die Sauerstoffbindung des Proteins nehmen könnten. Primär handelt es sich dabei um die Frage, ob die Kristallstruktur Hinweise auf die Natur und den Mechanismus des Root-Effektes liefert. Letzterer wurde von (PERUTZ & BRUNORI, 1982) für das Hämoglobin des Krallenfroschs, aufgrund der Existenz des Cysteins β Cys94, vorhergesagt, jedoch liefern die Sauerstoffbindungskurven unterschiedlicher Forschungsgruppen widersprüchliche Ergebnisse (KISTER ET AL., 1989).

2 Material und Methode

2.1 Chemikalien

Aluminiumsulfat-Hydrat	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
APS	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Brilliant Blau G250	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Calciumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Ethylenglykol	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Glyzerin	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
HCl 37 %	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Native Marker Liquid Mix	Serva; Heidelberg
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
PEG 3350	Sigma-Aldrich; St. Louis
PEG 4000	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
SDS-Marker Precision Plus Protein Unstained	BIO-RAD, München
TEMED	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe
TRIS	Carl Roth GmbH+Co KG; Karlsruhe

2.2 Puffer und Lösungen

Natriumphosphat-Puffer:	pH: 6,5	10 mM	
TRIS-Puffer:	pH: 7,8 (HCl)	0,1 M	
Laufpuffer (SDS) x4:	pH: 8,3	0,1 M	0,75 M Glycin, 0,4 % SDS
Laufpuffer (Nativ) x4:	pH: 8,3	0,1 M	0,75 M Glycin

Die pH-Werte der TRIS-Puffer wurden mit HCl bei einer Temperatur von 20°C eingestellt.

2.3 Versuchstiere

2.3.1 Das Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum*

Das Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum* (BURCHELL,1817) gehört zur Familie der Nashörner (Rhinocerotidae), zur Ordnung der Unpaarhufer (Perissodactyla) und der Unterklasse der höheren Säugetiere (Eutheria) (GROVES, 1972). Es lebt in Afrika und bewohnt dort hauptsächlich größere Grassavannengebiete, wobei die Kühe mit ihren Kälbern in größeren Gruppenverbänden (6-20 Tiere) leben (OWEN-SMITH, 1971). Ausgewachsene Bullen sind Einzelgänger und verteidigen ihr 1-3 km² großes Revier alleine (OWEN-SMITH, 1971). Das Breitmaulnashorn gehört mit seiner Körperlänge von max. 375 cm, einer Schulterhöhe von max. 182 cm und einem Gewicht von max. 3,5 t (alle Werte Bulle) zu den größten drei lebenden Landsäugetieren neben Elefant und Flusspferd. Es ist außerdem das größte der rezenten Nashornarten (GROVES, 1972). In der englischen Literatur wird es oft auch als „Weißes Rhinoceros“ bezeichnet. Namensgebend für das Breitmaulnashorn ist der, im Vergleich zum Spitzmaulnashorn, breit auslaufende Kiefer (GROVES, 1972). Es existieren zwei Unterarten des Breitmaulnashorns, das südliche Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum simum*, von dem weltweit ca. 20 000 Exemplare leben und das nördliche Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum cottoni*, welches mit nur noch drei lebenden Individuen so gut wie ausgestorben ist (GROVES ET AL., 2010; SARAGUSTY ET AL., 2016). Aus diesem traurigen Grund konnte im Rahmen dieser Arbeit selbstverständlich nur das Blut des südlichen Breitmaulnashorns verwendet werden und es wird im Folgenden nicht mehr namentlich zwischen den einzelnen Unterarten unterschieden.

Das Vollblut des Breitmaulnashorns wurde uns freundlicherweise von der [REDACTED] [REDACTED] in Zusammenarbeit mit [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt.



Abbildung 8: **Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum simum*.**
Kuh mit jungem Kalb. ©James Temple¹.

2.3.2 Der gewöhnliche Krallenfrosch *Xenopus laevis*

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* (DAUDIN, 1802) hat viele Synonyme und man kennt ihn z.B. auch unter dem Namen Glatter Krallenfrosch, Apothekerfrosch oder Afrikanischer Krallenfrosch. Er gehört zur Familie der zungenlosen Lurche (Pipidae), zur Ordnung der Froschlurche (Anura) und zur Klasse der Lurche (Amphibia). Wie der Name Amphibia andeutet (= doppeltes Leben), besitzen alle Tiere dieser Klasse ein Larvenstadium, welches nur im Wasser durchlebt werden kann und ein adultes Stadium, welches an Land bzw. an der Luft gelebt wird und sich durch eine Lungenatmung auszeichnet.

Sein eigentliches Vorkommen liegt in Afrika südlich der Sahara, doch hat er sich aufgrund der Globalisierung und seiner Nutzung als Labor- und Aquarientier weltweit verbreiten können. Weibliche Exemplare, die größer werden als die Männchen, können eine Größe von 13 cm erreichen sowie ein Alter von bis zu 25 Jahren. Beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* handelt es sich um einen Modellorganismus in Medizin und Forschung. So wurde er z.B. bis in die 60er Jahre als Schwangerschaftsfrühtest genutzt, daher erhielt er auch den Beinamen Apothekerfrosch (ELKAN, 1938). Die Entwicklungsphysiologie nutzt die Eier des Krallenfroschs als beliebtes Forschungsobjekt, da sie nicht nur zahlreich vorhanden und leicht zu kultivieren sind, sondern durch die Zugabe des menschlichen Hormons Choriongonadotropin sogar gelagert und zu einem beliebigen Zeitpunkt befruchtet werden können (CANNATELLA & DE SA, 1993). In der Stammzellforschung war die Entdeckung, dass differenzierte Zellen aus adulten Organismen des Krallenfroschs in Stammzellen zurückverwandelt werden können, bahnbrechend und wurde im Jahre 2012 mit dem Nobelpreis an den Japaner Shinya Yamanaka und den Briten John Gurdon belohnt (GURDON, 1962; TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Seit Neustem wird der Krallenfrosch auch in der Neurobiologie als Modellorganismus genutzt um anhand von Zellkulturen die Bildung von Axonen zu untersuchen (SLATER ET AL., 2017).

Das Vollblut des Krallenfrosches wurde uns mit freundlicher Unterstützung von ■■■■■ durch das ■■■■■ der Johannes Gutenberg-Universität zur Verfügung gestellt.



Abbildung 9: Der Krallenfrosch *Xenopus laevis*. ©Ben Rschr².

2.4 Gewinnung der Hämoglobine aus den Erythrozyten

Das Hämoglobin des Breitmaulnashorns (6 ml Vollblut + Heparin) und das des Krallenfroschs (5 ml Vollblut + Heparin) wurde bei beiden nach der Methode von PAOLI und NAGAI aufgereinigt und erfolgte stets direkt nach dem Eintreffen der Vollblutproben (MESSERSCHMIDT, 2011). Die Aufreinigung erfolgte, je nach vorhandener Vollblutmenge in 50 bzw. 15 ml Kunststoffzentrifugenröhrchen, mit Hilfe einer Universal 23 R Zentrifuge (Hettich Lab Technology, Tuttlingen) und bei 4°C. Durch einen schonenden Zentrifugationsschritt (30 min bei 100 xg) wurde zunächst das Blutplasma von den Erythrocyten getrennt. Während sich die Erythrozyten in einer dunkelroten Phase im unteren Teil des Falkons sammelten, befand sich das Blutplasma im Überstand und konnte vorsichtig abpipettiert werden. Durch die niedrige Geschwindigkeit wurde sichergestellt, dass die Erythrozyten nicht durch die vorhandenen Scherkräfte zerstört wurden und ungewollt Hämoglobin freigeben.

Anschließend wurden die Erythrozyten großzügig mit isotonischer 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (beim Breitmaulnashorn) bzw. mit isotonischer Amphibien Ringerlösung (MOSS & INGRAM, 1968)(siehe Tabelle 1) versetzt, vorsichtig aber gründlich, invertiert und erneut bei 100 xg und 30 min einem Zentrifugationsschritt unterzogen. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand von den Erythrozyten entfernt und erneut mit frischer isotonischer Lösung durchmischt. Es wurden mindestens drei dieser Waschschrift pro Probe durchgeführt, um alle Unreinheiten und Restbestandteile des Blutplasmas zu minimieren.

Tabelle 1: **Zusammensetzung der Amphibien-Ringer Lösung**

Substanz	Menge
NaCl	6,6 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂	0,15 g
Aqua dest.	1 l
NaHCO ₃	einstellen auf pH 7.4

Um das Hämoglobin aus den gewaschenen Erythrozyten freizusetzen, mussten diese auf proteinfreundliche Art und Weise aufgeschlossen werden. Dies erfolgte durch die Zugabe eines Volumenanteils destillierten Wassers. Nach einer Inkubationszeit von 10-20 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei den Proben des Nashorns ein 0,5-facher Volumenanteil einer 9% NaCl-Lösung hinzugegeben um die endgültige Salzkonzentration auf 3% einzustellen. Die bei der Lyse entstandenen Zelltrümmer wurden mit einer abschließenden Zentrifugation bei 4100 xg für 30 min abzentrifugiert. Die Hämoglobine befanden sich anschließend im Überstand und das Pellet wurde verworfen.

Die Erythrozyten des Krallenfroschs waren durch die einmalige Zugabe des destillierten Wassers nicht vollständig zur Lyse zu bringen. Daher wurde nach dem Zentrifugenschritt das freigewordene Hämoglobin abgenommen (und gelagert) und erneut destilliertes Wasser (1:1) hinzugegeben, inkubiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand nur noch rosa gefärbt war. Alle gelagerten Überstände wurden anschließend zusammengefügt und mittels eines Centricons (Vivaspin 20 ml, 30.000 Da, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) in die Amphibien-Ringer-Lösung umgepuffert und auf eine Konzentration von 60 mg/ml eingestellt.

Das Hämolysat der Erythrozyten enthält zu 98% nur Hämoglobin, deshalb erfolgte kein weiterer Reinigungsschritt für die Kristallisation, jedoch wurde die Reinheit durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (siehe Kapitel 2.6, Seite 23). In diesen Lösungen wurde das Hämoglobin bei 4°C in Aliquots gelagert. Bei Bedarf wurde die nötige Proteinmenge entnommen und in Centricons umgepuffert und/oder aufkonzentriert. Zur Feststellung der Hämoglobin-Konzentration (siehe Kapitel 2.5, Seite 22) diente die Aufnahme eines Absorptionsspektrums an einem Nanodrop 1000 Spektrophotometer (Peqlab GmbH, Erlangen).

2.5 UV/Vis Absorptionsspektroskopie

Proteine absorbieren anhand ihrer Peptidgruppen, aromatischen Aminosäuren und Disulfidbrücken UV-Licht zwischen Wellenlängen von 215 und 300 nm. Für die Konzentrationsbestimmung wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm betrachtet. Diese ist auf die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zurückzuführen, wobei letztere den größten Absorptionsbeitrag liefert. Den Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und der Absorption des eingestrahelten Lichtes beschreibt das LAMBERT-BEERsche Gesetz:

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Bei einer Schichtdicke von $d = 1$ spricht man synonym von der optischen Dichte (OD).

E_{λ} = Extinktion bzw. Absorption	ϵ_{λ} = Extinktionskoeffizient (ml/mg · cm)
d = Schichtdicke der Probe (cm)	I_0 = Intensität des einstrahlenden Lichts
I_1 = Intensität des transmittierten Lichts	
c = Konzentration des absorbierenden Stoffes (mg/ml)	

Das UV/Vis-Spektrum wurde an einem NanoDrop ND-1000 Photospektrometer der Firma Peqlab im Wellenlängenbereich von 190 bis 400 nm aufgenommen. Die Schicht-

dicke betrug $d = 0.1$ cm. Die Konzentration des Hämoglobins wurde nach folgender Gleichung berechnet (VAN KAMPEN & ZIJLSTRA, 1983):

$$c = (fD^{540}M \cdot 10^{-4}) / \epsilon_{HbCN}^{540} \quad g/100ml$$

mit

f = Verdünnungsfaktor

D^{540} = OD bei $\lambda = 540$

M = 1/4 Molekulargewicht von Hb = 16114 Da

ϵ_{HbCN}^{540} = 1/4 des millimolaren Extinktionskoeffizienten = 11

2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund seiner Nettoladung wandert ein Protein durch ein elektrisches Feld. Dieses Prinzip wird als Elektrophorese bezeichnet und es wird genutzt um Proteine anhand ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Die Geschwindigkeit, mit der die Proteine durch das elektrische Feld wandern, hängt von den spezifischen Nettoladungen der Proteine, der elektrischen Feldstärke sowie dem Reibungskoeffizienten ab. Die in dieser Arbeit angewendeten Gelelektrophoresen basieren auf LAEMMLI (1970) und der Modifikation von SEE ET AL. (1985).

Als Trägermedium dienen am häufigsten Polyacrylamid-Gele. Sie sind leicht herzustellen und durch Variation der Acrylamid-Konzentrationen lassen sich unterschiedliche Porengrößen einstellen. Die Prozentigkeit eines Gels gibt dessen Acrylamid-Gehalt in Prozent an. Je höher die Prozentigkeit, desto geringer die Porengröße. Man spricht in diesem Fall auch von Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (BERG ET AL., 2014).

Um möglichst scharfe Banden auf dem Trenngel zu erhalten, hat sich das Prinzip der **Diskontinuierlichen PAGE** nach ORNSTEIN (1964) und DAVIS (1964) bewährt. Dabei durchwandern die Proteine während der Elektrophorese ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8), wo sie konzentriert werden und schließlich gemeinsam ins engporige Trenngel (pH 8,8) einlaufen. Dort geschieht dann die eigentliche Trennung der Proteine anhand ihrer Ladung und/oder ihrer Größe (ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964).

Tabelle 2: **Zusammensetzung der Proben- und Denaturierungspuffer**

Probenpuffer	Denaturierungspuffer
0,15 g BPB	8 ml 10 % SDS Lösung
10 g Saccharose	1 ml H ₂ O
in 50 ml H ₂ O	4 ml Glycerin
	2 ml β -Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze BPB

2.6.1 SDS-PAGE

Denaturiert man mit Hilfe des anionischen Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) die aufzutrennenden Proteinproben, so werden diese ausschließlich auf Grund ihrer Masse aufgetrennt. Jeweils etwa ein SDS-Molekül bindet an zwei Aminosäurereste der Proteinhauptkette. Infolge der zusätzlichen Denaturierung der Probe bei 95°C über 10 Minuten wird das Protein gestreckt. Es entsteht ein, im Idealfall linearer, SDS-Protein-Komplex, dessen stark negative Ladung durch die gebundenen SDS-Moleküle proportional der Masse des Proteins ist. Die Eigenladung der Moleküle wird durch die starke Ladung der SDS Moleküle nivelliert (BERG ET AL., 2014). Das Protein wandert im elektrischen Feld somit ausschließlich aufgrund der negativen Ladungen des SDS. Größere SDS-Protein-Komplexe erfahren in der engporigen Gelmatrix eine größere Reibungskraft und wandern somit langsamer als kleinere Komplexe. Es ist wichtig, dass sowohl die Proteinprobe, das Sammel- und Trenngel, als auch der Elektrodenpuffer mit SDS versetzt werden, um den SDS-Protein-Komplex zu erhalten. Um die Größe der aufgetrennten Proteinbanden qualitativ zu bestimmen, erfolgt die Co-Elektrophorese von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für SDS-Gelelektrophoresen der *Protein Precision Plus Unstained*-Marker (Biorad GmbH, Kalifornien, Hercules) verwendet.

Um zusätzlich auch Disulfidbrücken zu spalten, wird der Probe β -Mercaptoethanolhaltiger Denaturierungs-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden jeweils 1:1 mit dem Denaturierungspuffer versetzt, bevor eine 10-minütige Erhitzung der Probe auf 95°C in einem Heizblock die Denaturierung vervollständigte.

Tabelle 3: **Zusammensetzung und Pipettivorschrift der SDS-PAGE**

	Trenngel (14 %)	Sammelgel (3%)
Rotiphorese 30	6,5 ml	1 ml
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	3,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	3,5 ml	6,05 ml
SDS 10%	280 μ l	200 μ l
TEMED	28 μ l	40 μ l
APS 4%	420 μ l	400 μ l

2.6.2 Native PAGE

Die native oder nicht-denaturierende Gelelektrophorese eignet sich unter anderem dafür, die Quartärstruktur von oligomeren Proteinen und deren Reinheit zu überprüfen. In diesem Falle wurde sie genutzt, um einen Einblick in die Proteinzusammensetzung der Hämolympheprobe zu gewinnen und die Sauberkeit der Extraktionsmethode zu analysieren. Bei der nativen PAGE findet keine Denaturierung der Proteinprobe statt. Das heißt, es wird auf den Zusatz von SDS und Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol

sowie auf die Erhitzung der Probe verzichtet, um die Quartärstruktur der Proteine zu erhalten. Es erfolgte eine Versetzung der Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 und die Stammlösung des Laufpuffers wurde vor der Nutzung 1:4 verdünnt.

Tabelle 4: **Zusammensetzung und Pipettivorschrift der nativen PAGE**

	Trenngel 12%	Sammelgel 3%
Rotiphorese 30	5,6 ml	1 ml
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	3,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	4,68 ml	6,25 ml
TEMED	28 µl	40 µl
APS	420 µl	400 µl

2.6.3 Coomassiefärbung nach Kang

Zur Standardfärbung der Proteinbanden von nativen und SDS Elektrophoresegelelen diente die Coomassie-Färbung nach KANG ET AL. (2002). Im Vergleich zur Coomassie-Färbung nach MERRIL (1990) zeichnet sich diese durch eine erhöhte Sensibilität und geringere Hintergrundfärbung aus (KANG ET AL., 2002). Beide basieren auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 mit den basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine. Die Proteinbanden färben sich blau an und werden im Gel fixiert. Eine Diffusion der Proteine aus dem Gel ist somit nicht mehr möglich.

Die Anwesenheit von SDS schwächt und/oder verhindert die Färbung der Gele. Daher müssen mit SDS behandelte Gele zuerst 2x10 Minuten in H₂O gewässert werden, bevor sie, für einige Stunden oder über Nacht, in die Färbelösung gelegt werden können.

Die Färbelösung nach Kang wurde nach institutsüblichen Vorlagen hergestellt und enthielt 0,02% Coomassie G250, 5% Aluminiumsulfat-Hydrat, 10% Ethanol 100, 2% o-Phosphorsäure und 83% H₂O (Angaben in v/v bzw. w/v).

2.7 Röntgenstrukturaufklärung

Der dreidimensionale, atomare Aufbau von Proteinen und anderen Makromolekülen kann über röntgenkristallographische Methoden ermittelt werden. Die Lage der einzelnen Atome wird durch ein Strukturmodell visualisiert und ermöglicht Einblicke und Untersuchungen über die Faltung der Peptidketten und die Funktionsweise der Proteine. Sofern es gelingt geeignete Kristalle zu züchten, ist es möglich, die Struktur von Makromolekülen jeglicher Art und Größe zu gewinnen (z.B. Protein-Nukleinsäurekomplexe, Viren usw.). Zu Beginn bis Mitte des 20. Jahrhunderts konnten zunächst nur sehr kleine Moleküle (z.B. Vitamin B12, Penicillin, Insulin) bestimmt werden. Die methodischen Verfeinerun-

gen zur Untersuchung von komplexeren Makromolekülen erfolgten durch John Kendrew und Max Perutz. Ihnen gelang die erste Röntgenstrukturaufklärung an den Proteinen Myoglobin und Hämoglobin (KENDREW ET AL., 1958; PERUTZ ET AL., 1960).

Die folgenden Unterkapitel beschreiben die theoretischen Grundlagen der Röntgenkristallstrukturaufklärung sowie deren, in dieser Arbeit angewendeten, praktischen Durchführung.

2.7.1 Kristallisation

Die Kristallisation des zu untersuchenden Proteins entscheidet im Normalfall über den Erfolg oder Misserfolg eines Strukturaufklärungsprojektes, da dieses Verfahren bis heute auf der heuristischen „Versuch und Irrtum“-Methode beruht. Die Kristallisationsbedingungen sind für jedes Protein verschieden und können, trotz großem wissenschaftlichen und technischen Fortschritt, nicht vorhergesagt werden. Es müssen daher zu Beginn viele verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet und immer weiter verfeinert werden bis geeignete Proteinkristalle erhalten werden. Dieser Prozess kann wenige Tage, Wochen aber auch Monate dauern.

Wenn Moleküle einer übersättigten Lösung in einen festen, geordneten Phasenzustand übergehen, bezeichnet man diesen Vorgang als Kristallisation. Bei der Proteinkristallisation geschieht dies gezielt durch die Zugabe eines Fällungsmittels (Präzipitans, z.B. Alkohole, Polyethylenglykole, Salze), welche das Protein aus der Lösung verdrängen. Dies findet bei einer bestimmten Konzentration des Fällungsmittels statt, welche allerdings unbekannt ist. Durch verschiedene Ausgangskonzentrationen und die anschließende Diffusion soll die Konzentration des Präzipitans langsam erhöht werden. Die Fällung des Proteins findet, je nach Präzipitans, aus unterschiedlichen Gründen statt. Bei Alkoholen und anderen organischen Lösungsmitteln erfolgt dies durch die Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels. Bei der Zugabe von Salzen entfernen diese, aufgrund der Konkurrenz mit den Proteinen um Solvationswasser, langsam die Hydrathülle der Proteine, was zu einer langsamen Aggregation letzterer führt. Die Präzipitation durch Polyethylenglykole erfolgt durch den sog. Volumenausschluss. Die Polyethylenglykole bilden verzweigte Netzsysteme, in welche die Proteine aufgrund ihrer Größe nicht hinein diffundieren können und es folgt somit die partielle Aufkonzentration der Proteine in der Lösung, was wiederum zur Kristallbildung führt (ATHA & INGHAM, 1981).

Oft führt auch eine Kombination der verschiedenen Fällungsmittel zum Ziel sowie die Zugabe von weiteren Salzen oder Detergenzien. Abgesehen davon spielen unter anderem auch die Temperatur, die Konzentration und Reinheit des Proteins sowie der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Bildung von Proteinkristallen. In den Kristallisationsansätzen kann es, neben den verschiedenen Kristallformen (Nadeln, Platten, multikristalline Aggregate, Einkristalle), außerdem zur Bildung von Phasenseparationen, Proteingel und

amorphem Niederschlag kommen. All diese Formen geben Hinweise darauf, inwiefern die Kristallisationsbedingungen verändert werden müssen. Die Lösung, in der der Kristall schlussendlich wächst, wird als Mutterlauge bezeichnet.

Zur langsamen Fällung der Proteine gibt es verschiedene Kristallisationsmethoden, wie z.B. die *Batch*-Methode, Dialyse oder die Dampfdiffusion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Hanging Drop* Dampfdiffusion durchgeführt, welche aufgrund ihrer einfachen Durchführung zu den am häufigsten angewendeten Kristallisationsmethoden zählt.

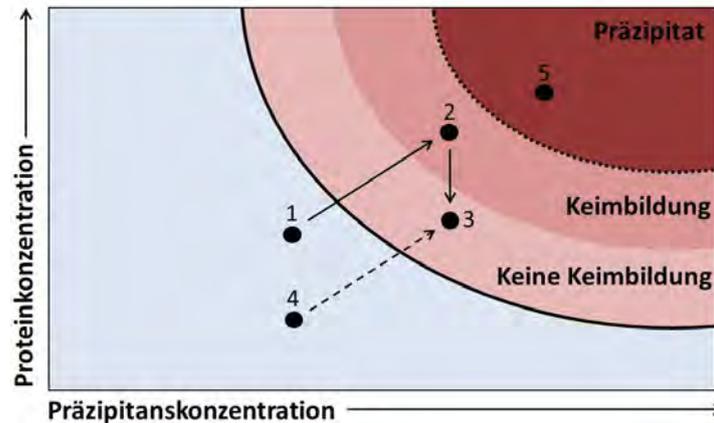


Abbildung 10: **Phasendiagramm der Kristallisation mittels Dampfdiffusion.** Die richtige Ausgangskonzentration an Protein und der Fällungsmittel (1) entscheidet über den Verlauf der Kristallisation. Während der Diffusion (Pfeile) erhöhen sich beide Konzentrationen und im Idealfall (2) gelangen sie in eine Phase der Keimbildung (dunkelrosa). Es bilden sich Kristallkeime, die Konzentration an Protein sinkt (3) und das Kristallwachstum schreitet voran. Werden die Ausgangskonzentrationen zu niedrig (4) oder zu hoch (5) gewählt, schlägt die Kristallisation fehl. Abb. nach ASHERIE (2004).

Der Vorgang bei der Dampfdiffusion kann durch das in Abb. 10 dargestellte Phasendiagramm beschrieben werden (ASHERIE, 2004). Der Erfolg der Kristallisation ist dabei abhängig von den gewählten Ausgangskonzentrationen von Protein und Fällungsmittel. Sind diese richtig gewählt (1), so erhöhen sich beide Konzentrationen durch das Verdampfen des Wassers und verschieben sich in einen Bereich, in dem die Keimbildung möglich ist (2). Da sich nun Aggregate bilden, verringert sich wiederum die Konzentration des Proteins (3), die Keimbildung stoppt, jedoch schreitet das Kristallwachstum weiter voran, da sich die Konzentrationen noch in einer metastabilen Phase befinden (rosa). Wählt man die Konzentrationen zu niedrig (4), gelangt man bei gleicher Diffusion nicht in den Bereich der Kristallkeimbildung. Wählt man die Konzentrationen zu hoch (5), fällt das Protein direkt als ungewünschtes Präzipitat aus. In diesen beiden Fällen schlägt die Kristallisation fehl.

Es existieren noch einige Varianten der Dampfdiffusions-Methode, jedoch soll im Folgenden nur auf das *Hanging-Drop*-Verfahren eingegangen werden.

Praktische Durchführung der *Hanging Drop* Dampfdiffusionskristallisation. Bei diesem Kristallisationsverfahren wurde zunächst 1 ml Reservoir-Lösung, welche aus Puffer, Präzipitans und weiteren Detergenzien besteht, in ein Reservoir mit Silikonrand einer VDX-Platte gegeben (Abb.11). Die einzelnen Bestandteile wurden zuvor gut durchmischt, da einige Bestandteile (z.B. Polyethylenglykol) sehr dickflüssig sind. Das zu kristallisierende Protein wurde aus einer Stammlösung auf ein rundes Glasplättchen pipettiert (5 μ l) und 1:1 mit einem Tropfen der Reservoirlösung gemischt. Der Tropfen, bestehend aus Reservoir- und Proteinlösung, hat in der Regel eine Größe zwischen 1 und 20 μ l. Das Glasplättchen wurde anschließend mit der Pinzette umgedreht und auf das entsprechende Reservoir der Platte aufgesetzt. Der Silikonrand des Reservoirs dichtet dieses luftdicht ab und verhindert Entweichen von Wasserdampf aus dem System. Wurde die ganze 4x6-VDX-Platte bestückt, wurde der Ansatz in einem Klimaschrank bei einer Temperatur von 20°C gelagert.

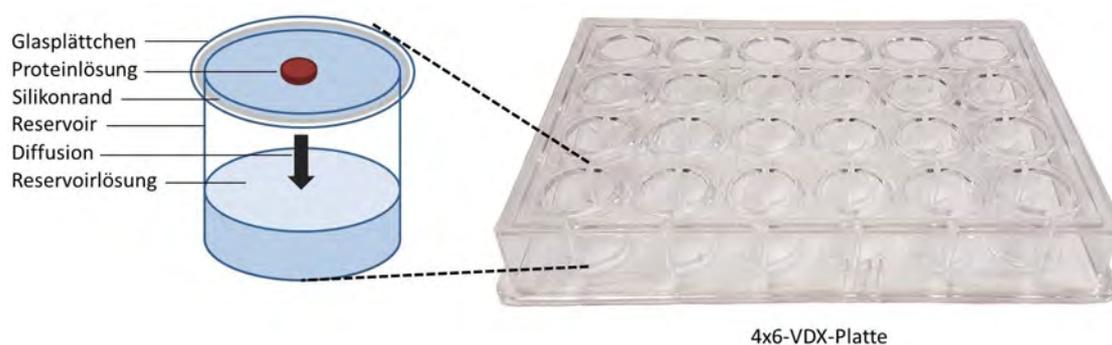


Abbildung 11: **Aufbau eines *Hanging Drop* Kristallisationsversuchs.**

Da die Reservoirlösung doppelt so hoch konzentriert ist wie der hängende Tropfen, erfolgt während der Lagerung die Diffusion von Wasserdampf aus dem Tropfen in die Reservoirlösung um dieses Ungleichgewicht aufzuheben, nach dem zuvor beschriebenen Phasendiagramm (Abb. 10). Die Kristallansätze wurden zunächst täglich, dann wöchentlich und dann monatlich nach Kristallen untersucht.

Tabelle 5 führt die Geräte und Lösungen auf, die bei der Kristallisation genutzt wurden. Die genauen Zusammensetzungen der Kristallisationsansätze für die Kristallisation des *Ceratotherium simum* und des *Xenopus laevis* Hämoglobins sind in Kapitel 3.2.1 (S. 42) und Kapitel 3.3.1 (S. 56) beschrieben. Ziel der Kristallisation ist stets der Erhalt eines Einkristalls mit 0,1 - 0,5 mm Kantenlänge in jeder Raumrichtung. Stark verwachsene oder zu dünne Kristalle sind für die Röntgenbeugungsversuche unbrauchbar, jedoch sind Einkristalle mit unregelmäßiger Oberfläche verwendbar.

Tabelle 5: Geräte und Lösungen für die *Hanging Drop* Kristallisation

Geräte
- 4x6-VDX Platte mit Silikonrand (Hampton Research, Aliso Viejo)
- silikonbeschichtete Deckgläser (Hampton Research)
- IKA Vortex Genius 3 (IKA-Werke, Staufen))
- SZ-60 Olympus Stereomikroskop (Olympus, Shinjuku)
- Glass Cover Slide Gizmo (Hampton Research)
Lösungen
- PEG 3350 Stammlösng 50%
- PEG 4000 Stammlösung 60%
- 1 M TRIS/HCl-Puffer pH 7,5
- 1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5
- 4 M Ammoniumsulfatlösung
- 4 M Magnesiumchloridlösung
- Ethylenglykol 100%
- Glycerin 100%

2.7.2 Kristallsymmetrie

Einkristalle bestehen aus einer Vielzahl von Parallelepipeden, die das Kristallgitter durch die wiederholte Translation an den Kanten des Parallelepipeds aufbauen. Das kleinste dieser Parallelepipede wird als Einheitszelle oder synonym als Elementarzelle bezeichnet. Die Kanten der Einheitszellen von Proteinkristallen variieren normalerweise zwischen 30 und 200 Å (LOTTSPREICH & ENGELS, 2012). Neben den Kantenlängen a , b und c wird die Einheitszelle durch die Winkel α , β und γ definiert und man spricht daher auch von den Gitterkonstanten oder den Zellparametern. Da ein Kristall durch verschiedene Einheitszellen beschrieben werden kann, wird üblicherweise ein Parallelepiped mit der höchsten Symmetrie und möglichst geringen Kantenlängen gewählt. Es ist wichtig hervorzuheben, dass ein einzelnes Molekül nicht vollständig in einer Einheitszelle vorliegen muss, sondern es kann bei Kantenlage auch über mehrere Einheitszellen positioniert sein. Die Gesamtheit der translatierten Einheitszellen wird als Kristall- oder Punktgitter bezeichnet. Alle denkbar möglichen Formen der Einheitszelle lassen sich in die 14 Bravais-Gitter einteilen, von denen sich wiederum die 7 Kristallsysteme zusammenfassen lassen. Die Kristallsysteme unterscheiden sich nur durch die Länge der Vektoren der Einheitszelle sowie die Größe ihrer Winkel.

Befinden sich mehrere identische Moleküle in der Einheitszelle, können diese auf unterschiedliche Weise symmetrisch angeordnet sein (z.B. Rotations- und Schraubenachsen). Diese Symmetrien können durch eine sogenannte Punktgruppe charakterisiert werden. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass es einen Punkt (nicht zu verwechseln mit den Punk-

ten des Kristallgitters) gibt, der durch alle Symmetrioperationen wieder auf sich selbst abgebildet werden kann. Es existieren 32 mögliche kristallographische Punktgruppen.

Die 14 Bravais-Gitter ergeben kombiniert mit den 32 Punktgruppen und den möglichen Translationen (Schraubenaachsen, Gleitspiegelebenen) insgesamt 230 mögliche Raumgruppen. Für Proteine kommen, aufgrund der Chiralität der Aminosäuren, nur 65 Raumgruppen davon in Frage. Die Raumgruppe beschreibt die Symmetrie eines Kristalls und alle Symmetrioperationen durch welche die Anordnung der Atome im Kristall dargestellt werden können.

Die asymmetrische Einheit ist die kleinste Einheit, die mit Hilfe der Raumgruppe die Einheitszelle repräsentieren kann. Wie der Name sagt, ist sie asymmetrisch und kann z.B. eine Untereinheit eines symmetrischen Moleküls darstellen oder mehrere Moleküle beinhalten. Die Anzahl der asymmetrischen Einheiten ist abhängig von der Raumgruppe des Kristalls. Eine Schätzung, wie viele Moleküle pro Einheitszelle bzw. pro asymmetrischer Einheit vorliegen, kann mit einer von MATTHEWS (1968) entwickelten Methode mit Hilfe des Molekulargewichts des Proteins und den Gitterkonstanten berechnet werden.

Zwischen den Molekülen des Kristalls befinden sich teilweise große leere Räume, die mit Mutterlauge gefüllt sind. Üblicherweise liegt das Verhältnis zwischen Protein und Mutterlauge zwischen 1:3 und 3:1. Proteinkristalle sind daher nicht sehr stabil, sondern brechen bei Austrocknung in sich zusammen und können schon durch kleinste mechanische Kräfte zerstört werden.

Die Gitterkonstanten sowie die Symmetrie des Kristalls, welche durch die Raumgruppe beschrieben wird, sind die ersten Daten, die aus den röntgenkristallographischen Daten bestimmt werden. Wie dies in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wird in Kapitel 2.7.9 (S. 37) erklärt.

2.7.3 Millersche Indizes

Wie in 2.7.4 beschrieben wird, kann die Streuung der Röntgenstrahlen als eine Reflexion an Ebenen des Kristallgitters angesehen werden, den sog. Gitter- oder Netzebenen. Um später die Streuung am Kristall besser verstehen zu können, soll in diesem Kapitel auf diese Ebenen eingegangen werden. Eine große Anzahl an verschiedenen Ebenen kann durch die Punkte des Kristallgitters gezogen werden. Innerhalb der gleichen Ebenenschar liegen die Ebenen parallel und sind regelmäßig um einen Abstand d voneinander verschoben. Die Ebenen schneiden die Achsen der Einheitszelle in ganzzahlige Abschnitte, welche als Indizes bezeichnet werden. Sie tragen den Namen Millersche Indizes und werden gewöhnlich mit h , k und l bezeichnet (MILLER, 1839), wobei h gleich der Anzahl der Schnittpunkte der x-Achse, k der y-Achse und l der z-Achse ist. Diese Achsen können synonym auch als Achsen a , b und c der Einheitszelle benannt werden.

2.7.4 Röntgenstreuung an Proteinkristallen - Die Braggsche Gleichung

In den letzten Kapiteln wurde ausführlich über den Aufbau, die Symmetrie und das Wachstum von Proteinkristallen geschrieben, jedoch wird die Notwendigkeit des Kristalls erst klar, wenn man sich ihn im Zusammenhang mit der Röntgenstreuung betrachtet. Die Strahlung, die ein einzelnes Atom streut, ist nämlich so gering, dass sie von einem Detektor nicht registriert werden könnte. Die vielen äquivalenten Einheiten des Kristalls addieren die gebeugten Röntgenstrahlen in einem so hohen Maße, dass deren Intensität in den messbaren Bereich gelangt. Es kann allerdings nur zu einer solchen positiven Interferenz kommen, wenn Wellen mit gleicher Ausbreitungsrichtung interferieren und deren Wegunterschied ein Vielfaches der eingestrahnten Wellenlänge beträgt. Diese Bedingung wurde von BRAGG (1913) formuliert und in der Bragg-Gleichung zusammengefasst:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$$

mit

λ = Wellenlänge der Röntgenstrahlung

θ = Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene (Braggwinkel)

d = Abstand zwischen den parallelen Gitterebenen in einer Schar

hkl = Millersche Indizes

n = eine natürliche Zahl, welche die Beugungsordnung angibt.

Die Streuung des einfallenden Röntgenstrahls an der Schar paralleler Ebenen wird als Reflexion betrachtet und der Einfallswinkel θ ist daher gleich dem Ausfallswinkel (Abb. 12). Der Winkel θ wird als „Braggwinkel“ bezeichnet. Die Bragg-Gleichung beschreibt den Wegunterschied zwischen zwei Streuwellen, die aus der Reflexion der Röntgenstrahlung an zwei unterschiedlichen Ebenen der gleichen Ebenenschar resultieren. Die Position der Ebenenschar wird über die Millerschen Indizes hkl definiert, welche im vorherigen Kapitel eingeführt wurden. Der Abstand d_{hkl} entspricht auch hier dem Abstand zwischen den Ebenen einer Ebenenschar und je größer dieser Abstand ausfällt, desto kleiner ist der Braggwinkel θ , wenn es sich bei dem Streustrahl um die gleiche Ordnung n handelt. Zu einer positiven Interferenz der Streuwellen und somit zu einem „Bragg-Reflex“, welcher vom Detektor gemessen werden kann, kommt es nur bei einem bestimmten Streuwinkel 2θ , da nur dann das Braggsche Gesetz für eine Ebenenschar hkl erfüllt ist. Das entstehende Beugungsmuster durch die Bragg-Reflexe ist zentrosymmetrisch und es existiert daher zu einem Bragg-Reflex hkl stets ein Reflex $-h-k-l$, der eine identische Intensität besitzt, wenn keine sog. anomale Streuung auftritt. Man spricht bei diesen Reflexen von Friedel-Paaren und für sie gilt, unter den genannten Voraussetzungen, das Friedelsche Gesetz $I(hkl) = I(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$.

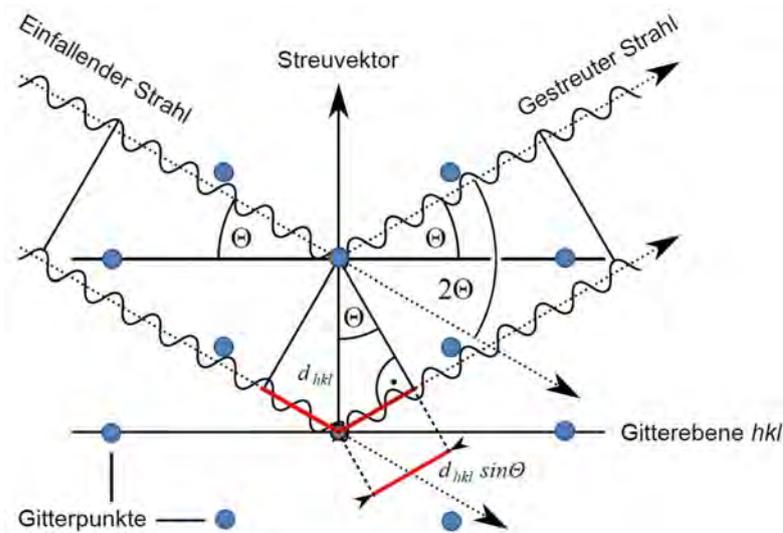


Abbildung 12: **Herleitung der Bragg'schen Gleichung.** Der einfallende Röntgenstrahl wird an den Gitterebenen hkl im Winkel θ gestreut. Eine positive Interferenz beider Streuwellen ist nach der Bragg-Gleichung nur erfüllt, wenn deren Wegunterschied (rot) ein Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Abbildung verändert nach TEXTOR (2011).

2.7.5 Mathematische Konstrukte beschreiben die Position der Bragg-Reflexe

Um die Bragg-Reflexe mit dem Kristallgitter in Beziehung zu setzen, macht man sich den Zusammenhang zwischen Ebenenabstand und Streuwinkel zu Nutze. Man muss dazu zwei mathematische Konstrukte ins Spiel bringen: Das reziproke Gitter und die Ewald-Kugel. Im reziproken Gitter entspricht jeder Gitterpunkt einer spezifischen Ebenenschar des Kristallgitters. Die Lage des reziproken Gitterpunktes ist über einen Vektor definiert, dessen Länge dem Kehrwert des Ebenenabstands d gleicht. Man spricht in diesem Zusammenhang vom reziproken Ebenenabstand $\frac{1}{d_{hkl}}$. Die Richtung des Vektors wird durch die Richtung der Normalen der Ebenenschar bestimmt.

Der Ursprung des reziproken Gitters fällt mit dem Ursprung der Ewald-Kugel zusammen. In der Mitte der Ewald-Kugel sitzt der Kristall und ihr Radius entspricht dem Kehrwert der Wellenlänge $\frac{1}{\lambda}$. Wird der Kristall bei der Vermessung gedreht, so ändert sich auch die Orientierung des Kristallgitters und das reziproke Gitter rotiert um seinen Ursprung. Ein Bragg-Reflex erscheint, wenn ein reziproker Gitterpunkt die Oberfläche der Ewald-Kugel schneidet (DRENTH, 1994).

2.7.6 Berechnung der Elektronendichte und der Streuamplituden

Neben der Position der Bragg-Reflexe ist deren Intensität bedeutend für die Aussage über die Atome der Moleküle in der Einheitszelle. Die Intensität der Reflexe ist eine Messgröße

für die Anzahl der Elektronen, die an der entsprechenden Ebene hkl den einfallenden Röntgenstrahl streuen und proportional zum Quadrat der Amplitude des Streustrahls $|F_{hkl}|$ sind. Man spricht von dieser Messgröße auch vom Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$ und er ist eine Funktion der Elektronendichteverteilung der Einheitszelle (DRENTH, 1994; STOUT & JENSEN, 1989):

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_j f_j e^{2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}}$$

Anstatt über alle Atomformfaktoren f der separaten Atome j in der Einheitszelle zu summieren, kann über die Gesamtheit der Elektronen der Einheitszelle integriert werden:

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_{Zelle} p(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} dv$$

mit $p(\mathbf{r}) =$ die Elektronendichte an der Position \mathbf{r} der Einheitszelle. Wenn x, y und z fraktionale Koordinaten in der Einheitszelle darstellen ($0 \leq x, y, z < 1$) und V das Volumen der Einheitszelle repräsentiert, dann gilt

$$dv = V \cdot dx dy dz$$

und

$$\begin{aligned} \mathbf{r} \cdot \mathbf{S} &= (\mathbf{a} \cdot x + \mathbf{b} \cdot y + \mathbf{c} \cdot z) \cdot \mathbf{S} = \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} \cdot x + \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} \cdot y + \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} \cdot z \\ &= hx + ky + lz \end{aligned}$$

Deswegen kann $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ beschrieben werden als $\mathbf{F}(hkl)$

$$\mathbf{F}(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 p(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz$$

Da das Ziel der Kristallographie nicht die Berechnung des Streubildes ist, sondern die Berechnung der Elektronendichte, muss eine Fourier-Transformation durchgeführt werden. $\mathbf{F}(hkl)$ ist die Fourier-Transformierte von $p(xyz)$ und umgekehrt. Deswegen kann $p(xyz)$ auch als Funktion von allen $\mathbf{F}(hkl)$ beschrieben werden:

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Die Laue-Bedingungen sagen, dass die Diffraktion nur in diskreten Richtungen auftritt und daher kann in der letzten Formel die Integration durch eine Summierung ersetzt werden. Wegen $\mathbf{F} = |F|e^{i\alpha}$ gilt:

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(hkl)}$$

Anhand der letzten Formel kann die Elektronendichte $p(xyz)$ an jeder Position (xyz) der Einheitszelle berechnet werden. Man benötigt dazu allerdings die Amplituden $|F(hkl)|$, welche von den Intensitäten $I(hkl)$ ermittelt werden können, und die Phasenwinkel $\alpha(hkl)$, welche nicht direkt aus dem Diffraktionsmuster ermittelt werden können. In der Kristallographie wird dies als das **Phasenproblem** bezeichnet (DRENTH, 1994).

2.7.7 Das Phasenproblem

Wie schon im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sind für die Berechnung einer Elektronendichte die Phasen und Amplituden der Streuwellen nötig. Die Amplituden können aus den Intensitäten der Bragg-Reflexe ermittelt werden, jedoch gehen bei diesem Experiment jegliche Information über die Phasen verloren. Die Phasen sind allerdings entscheidend über das Ergebnis der Strukturberechnung, wie es TAYLOR (2003) prägnant beschreibt: „Die Berechnung einer Elektronendichtekarte mit den Amplituden der Diffraktion einer Ente und den Phasen der Diffraktion einer Katze endet in der Form einer Katze“.

Mittlerweile wurden einige Methoden entwickelt um die Phasen für die Berechnung der Elektronendichte zu ermitteln, bei den gängigsten Methoden handelt es sich um den Molekularen Ersatz, den Isomorphen Ersatz oder die Phasenbestimmung durch anormale Streuung. Bei sehr kleinen Proteinen und einer sehr guten Auflösung, können die Phasen sogar durch statistische Methoden direkt aus den Messdaten ermittelt werden (TAYLOR, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Molekulare Ersatz (*Molecular Replacement*) angewendet, deswegen soll nur auf diese Methode der Phasengewinnung näher eingegangen werden:

Molecular Replacement: Für das *Molecular Replacement*, welches zuerst von ROSSMANN & BLOW (1962) beschrieben wurde, ist ein sogenanntes Homologiemodell erforderlich. Es handelt sich dabei um ein Protein, welches eine Primärsequenzidentität von mindestens 25% besitzt und einen RMSD-Unterschied der C_α -Atome zwischen Modell und der neuen Struktur von $<2,0 \text{ \AA}$ aufweist. Aus der Kristallstruktur des Homologiemodells und der neuen Struktur werden beim *Molecular Replacement* zwei sogenannte Patterson-Karten erstellt. Die Berechnung der Patterson-Karte mittels Fouriersynthese verläuft ähnlich wie die Berechnung der Elektronendichte, jedoch basiert die Patterson-Karte ausschließlich auf den Intensitäten der gemessenen Bragg-Reflexe. Sie enthält daher keine Informationen über den atomaren Inhalt der Einheitszelle. Die Peaks der Patterson-Karte des gemessenen Datensatzes lassen sich jedoch mit den Peaks der Patterson-Karte

des Homologiemodells vergleichen und Wahrscheinlichkeitsberechnungen ermitteln das beste übereinstimmende Ergebnis der beiden Karten. Das *Molecular Replacement* besteht dabei aus drei wesentlichen Schritten: Die Bestimmung der relativen Orientierung des Homologiemodells im neuen Kristall (Rotationsfunktion), die Bestimmung der Position des korrekt orientierten Modells in der Einheitszelle (Translationsfunktion) und die abschließende Bestimmung der Phasen anhand der zuvor gewonnenen Informationen (ROSSMANN, 1990; TAYLOR, 2003).

Da in dieser Arbeit die Kristallstruktur zweier Hämoglobine ermittelt werden soll und sich in der RCSB PDB-Datenbank zurzeit 692 Hämoglobinstrukturen finden lassen (März 2017), liegt es nahe, die Phasen über das *Molecular Replacement* zu gewinnen.

2.7.8 Praktische Durchführung der Röntgenkristallstrukturbestimmung

Konnte in einem Kristallisationsansatz ein optimaler Proteinkristall gewonnen werden, so folgte die Untersuchung seines Streuvermögens und, im besten Fall, die Aufnahme eines röntgenkristallographischen Datensatzes. Der Aufbau eines solchen Experiments ist in Abb. 13 dargestellt. Zur Generierung der Röntgenstrahlen diente eine *Microstar* Drehanode (Firma Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland) und das Spiegelsystem *Montel 200 Optics* (ebenfalls Bruker AXS) zur Erhaltung des monochromatischen und kollimierten Primärstrahls ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Der Kristall wird dabei in einer Nylonschlinge auf dem Goniometerkopf platziert und in einem Gasstrom des Kryosystems (Oxford Cryosystems, Oxford, United Kingdom) tiefgefroren (100 K), um Strahlenschäden zu minimieren und das Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Zur Messung der gestreuten Röntgenstrahlen diente der ortsempfindliche Flächendetektor *mar345* (MARresearch, Norderstedt, Deutschland), durch den die Streusignale schlussendlich in ein digitales Bild umgewandelt werden können.

Zunächst musste der zu vermessende Kristall unter dem Mikroskop in eine passende Nylonschlinge platziert werden. Er wird dort durch die Oberflächenspannung der mitgeführten Reservoirlösung festgehalten. Die Schritte zwischen der Öffnung des Reservoirs bis zur Einspannung der Nylonschlinge in den Goniometerkopf müssen sehr schnell durchgeführt werden, da nur wenige μl Flüssigkeit in der Nylonschlinge Platz finden und die Verdunstung von zu viel Wasser den Kristall zerstören kann. Bei den Kristallen des HbXl musste der Kristall außerdem vorsichtig durch seine Mutterlauge mit zusätzlichen 25% Ethylenglykol gezogen werden, um die Bildung von Eiskristallen im Kryostrom zu verhindern. Bei den Kristallen des HbCs war das Frostschutzmittel schon in der Mutterlauge vorhanden. Nach dem anschließenden Aufstecken der Nylonschlinge auf den Goniometerkopf erfolgte die Justierung des Kristalls auf ein gleichbleibendes Zentrum, um bei der Drehung der Messung die Präzession des Kristalls so gering wie möglich zu halten.

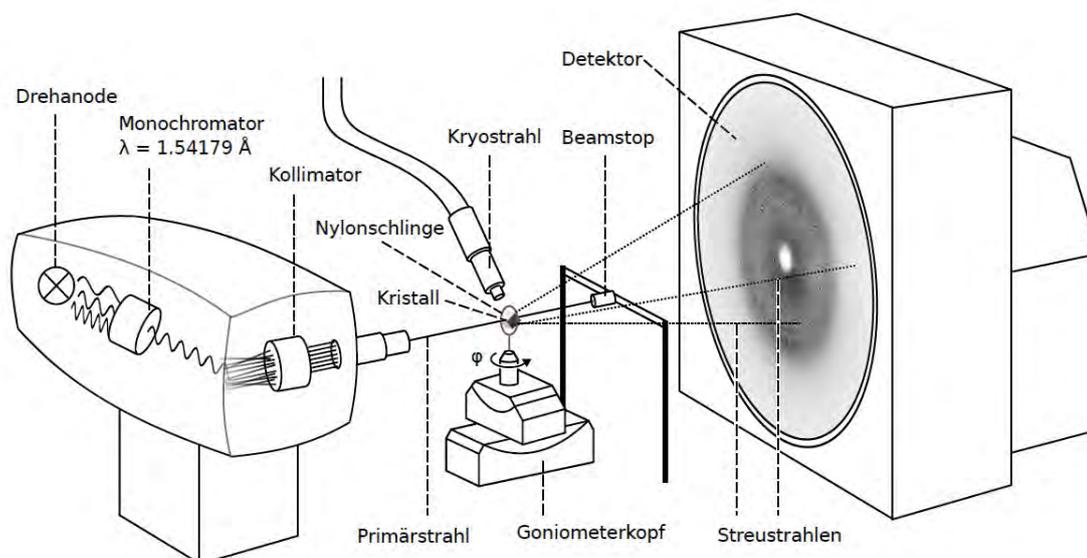


Abbildung 13: **Aufbau des Experiments zur Röntgenstrukturbestimmung.** Die an einer Drehanode erzeugte Röntgenstrahlung besitzt nach dem Passieren des Monochromators und des Kollimators eine spezifische Wellenlänge und eine homogene Intensität. Der Kristall sitzt in einer Nylonschlinge, wird dort durch einen Kryostrahl tiefgekühlt und kann durch den Goniometerkopf um einen Winkel $\Delta\varphi$ gedreht werden. Der Kristall ist dabei so ausgerichtet, dass der Primärstrahl ihn optimal trifft. Die Streustrahlen des Kristalls werden von einem Detektor registriert. Der Primärstrahl muss nach dem Durchqueren des Kristalls durch einen Beamstop aufgehalten werden, damit er keinen Schaden auf dem Detektor hinterlässt. Abb. entnommen aus TEXTOR (2011).

Während der Streumessung wurde der Goniometerkopf samt Kristall bei jeder Aufnahme um den Drehwinkel $\Delta\varphi$ von 1° gedreht. Die Belichtungszeit pro Aufnahme, der gesamte Drehwinkel der aufeinanderfolgenden Aufnahmen, sowie die Einstellungen der Drehanode sind in Tab. 6 für beide Datensätze aufgeführt.

Tabelle 6: **Parameter der Diffraktionsaufnahmen**

	Datensatz HbCs	Datensatz HbXI
X-Ray Quelle Strom	50 mA	50 mA
X-Ray Quelle Spannung	45 kV	45 kV
Detektorabstand	150 mm	150 mm
Belichtungszeit pro Aufnahme	30 min	15 min
$\Delta\varphi$	1°	1°
Anzahl Aufnahmen	360	246
Detektorpixel	3450 x 3450	3450 x 3450

2.7.9 Auswertung der röntgenkristallographischen Datensätze

Die Auswertung des gemessenen Datensatzes erfolgte mit Hilfe der Programmsammlung **CCP4** (WINN ET AL., 2011). Für die Ermittlung der Gitterkonstanten und der Intensitäten der Bragg-Reflexe wurde das dort implementierte Programm **Mosflm** genutzt. Es liefert die gewonnenen Informationen in Form einer MTZ-Datei, die in die Programme **Pointless** und **Scala** geladen werden kann, um die Raumgruppe und die Vollständigkeit des Datensatzes zu ermitteln, sowie die mehrfach gemessenen Bragg-Reflexe zusammenzuführen. Die Auflösung der Kristallstruktur wurde stets bei dem Wert fixiert, an dem die Struktur zuerst den höchst zu erreichenden Wert der Vollständigkeit angenommen hat. Die Vollständigkeit beschreibt in Prozent den Anteil der beobachteten Reflexe an der Gesamtzahl der möglichen Reflexe im gewählten Auflösungsbereich. Zur Bestimmung des Matthews-Koeffizienten diente das Programm **Matthews** (KANTARDJIEFF & RUPP, 2003; MATTHEWS, 1968).

Das *Molecular Replacement* erfolgte durch das Programm **MolRep**, welches die atomare Struktur des Modells im PDB-Format ausgibt, sowie eine weitere MTZ-Datei, welche die gemessenen Amplituden (Intensitäten) des Streuexperimentes und die durch das *Molecular Replacement* gewonnenen Phaseninformationen enthält (VAGIN & TEPLYAKOV, 2010). Aus dieser MTZ-Datei errechnet anschließend das Programm **Coot** die Elektronendichte und eine Differenzdichte. Von dieser Differenzdichte zeigt **Coot** positive und negative Werte an, die Auskunft darüber geben, ob zu viel (negativ) oder zu wenig (positiv) Struktur an bestimmten Positionen des Modells vorhanden ist.

2.7.10 Validierung

Die Qualität einer Röntgenkristallproteinstruktur wird hauptsächlich an ihrer Auflösung und ihren R-Faktoren gemessen. Die Auflösung ist abhängig von der Qualität und Größe des Einkristalls. Die durchschnittliche Auflösung von Proteinstrukturen in der RCSB Protein Datenbank liegt bei 2,2 Å (Stand 15.11.2016). Je niedriger der Wert der Auflösung desto besser, da sich die Elektronendichte so schärfer um die Atome des Moleküls abzeichnet und die Struktur besser eingepasst werden kann. Die maximal erreichbare Auflösung ist, in der Theorie, durch die Wellenlänge der eingestrahlten Röntgenstrahlen begrenzt (in dieser Arbeit $\lambda = 1,5418$ Å). In der Praxis jedoch wird sie maßgeblich durch die Unordnung des Moleküls und des Kristalls bestimmt. Wie schon in Kapitel 2.7.9 erwähnt, wurde die Auflösung der Kristallstrukturen dieser Arbeit bei dem Wert fixiert, an dem die Struktur zuerst den höchstmöglichen Wert der Vollständigkeit angenommen hat.

Bei den R-Faktoren handelt es sich um Gütekriterien für die Qualität des Datensatzes und der Kristallstruktur. In der Kristallographie existieren viele Formen des R-Faktors, jedoch nutzt man im Allgemeinen die vier R-Faktoren R_{merged} , R_{meas} , R_{cryst} und R_{free} .

Der R_{merged} und der R_{meas} geben Auskunft über die Güte des gemessenen Datensatzes und sie berechnen sich aus Mehrfachmessungen von gleichen und symmetrieäquivalenten Reflexen.

$$R_{merged} = \frac{\sum_k \sum_i |\bar{I}_k - I_{k,i}|}{\sum_k \sum_i I_{k,i}}$$

mit

$I_{k,i}$ = die i-te Intensitätsmessung von Reflex k

\bar{I}_k = Mittelwert aller Messungen des Reflexes k

Beim R_{merged} handelt es sich um einen abgewandelten R_{meas} , der zusätzlich die Multiplizität der Messung mit einbezieht (DIEDERICHS & KARPLUS, 1997):

$$R_{meas} = \frac{\sum_k \sqrt{\frac{n_k}{n_k-1}} \sum_{i=1}^n |\bar{I}_k - I_{k,i}|}{\sum_k \sum_i I_{k,i}}$$

Dabei stellt n_k die Multiplizität des Reflexes dar, wodurch z.B. auch Friedel-Paare berücksichtigt werden. Die Qualität der Primärdaten hängt fast ausschließlich von der Qualität des Einkristalls und den Messfehlern des Versuchsaufbaus ab.

Der R_{cryst} , der häufig nur als R -Faktor bezeichnet wird und der R_{free} beschreiben die Güte der erstellten und verbesserten Kristallstruktur, welche aus den Messdaten erstellt wurde. Dabei gibt der R -Faktor an, inwiefern die gemessenen Strukturaktoren F_{obs} und die aus dem Modell berechneten Strukturaktoren F_{calc} übereinstimmen:

$$R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|}$$

Je kleiner der R -Faktor, desto besser passt die erstellte Kristallstruktur mit den gemessenen Streudaten überein. Der Wert sollte daher höchstens 0,3 betragen. Der R -Faktor ist äußerst wichtig, denn die Erstellung der Kristallstruktur und die Einschätzung über Änderungen der Struktur beim *Refinement* hängt vom Auge des Betrachters ab. Um beim *Refinement* die Überinterpretation der Strukturdaten zu verhindern, z.B. durch zu viele in der Elektronendichte „gesehene“ Wassermoleküle, wurde zusätzlich der R_{free} -Wert eingeführt (BRUNGER, 1992). Die Berechnung des R_{free} erfolgt äquivalent zum R -Faktor, jedoch wird dafür ein Datensatz an Reflexen genutzt (ca. 5%), der zu Beginn vom *Refinement* ausgeschlossen wurde und daher keine falschen Daten enthält. Sinken bei den Strukturverbesserungen der R - und der R_{free} -Faktor, so kann eine Überinterpretation der Daten durch den Wissenschaftler verhindert werden.

2.7.11 Refinement

Die Interpretation der Elektronendichte und das Refinement der Proteinstruktur wurden mit Hilfe der Programme **Coot** (EMSLEY ET AL., 2010) und **Refmac5** (VAGIN ET AL., 2004) durchgeführt. Das Programm **Coot** dient sowohl dazu, eine neue Molekülstruktur anhand einer Elektronendichte zu konstruieren, als auch eine vorhandene Struktur zu verbessern (*Refinement*). Letzteres ist im Rahmen dieser Arbeit der Fall, da durch das *Molecular Replacement* schon eine Struktur näherungsweise vorliegt. **Coot** berechnet aus den Amplituden und Phasen der Reflexe die Elektronendichte der Einheitszelle sowie eine sog. Differenzelektronendichte (optional) und stellt diese zusammen mit den Atomen des Moleküls graphisch dar. Das Programm erlaubt außerdem Manipulationen an der Struktur, wie das Einfügen oder den Austausch von Aminosäuren sowie manuelles oder automatisches Verschieben und Drehen der Atome bzw. Atomgruppen. Dies erfolgt während des Refinements, bis eine möglichst gute Einpassung der Atome in die Elektronendichte erreicht wurde. Es werden dabei Zusatzbedingungen (*restraints*) berücksichtigt, welche auch bei nicht-atomarer Auflösung dafür sorgen, dass die Standardgrößen für z.B. Bindungswinkel und Bindungslängen eingehalten werden. Zusätzlich berechnet **Coot** einige Gütefaktoren auf Aminosäure- oder Gruppenbasis wie z.B. den Ramachandran-Plot, Wahrscheinlichkeiten für die Konformationen der Aminosäureseitenketten (Rotamere) oder Übereinstimmungen der Elektronendichte des Modells mit der gemessenen Elektronendichte (*density fit*), die dabei helfen Unstimmigkeiten in der Molekülstruktur zu erkennen und zu korrigieren.

Die Verbesserung der Struktur wird durch die Güte der Elektronendichte begrenzt. Wie schon in Kapitel 2.7.7 (S. 34) erwähnt, hängt diese von der Genauigkeit der gemessenen Reflexamplituden $\mathbf{F}(hkl)$ ab, jedoch hauptsächlich von der Genauigkeit der Phasen (TAYLOR, 2003). Die berechneten Phasen (z.B. über das *Molecular Replacement*) sind allerdings in der Regel viel ungenauer als die gemessenen Amplituden. Aus der verbesserten Molekülstruktur werden deshalb über die erste Gleichung in Kapitel 2.7.6 (S. 32) neue Phasen berechnet und mit diesen und den gemessenen Amplituden eine neue, bessere Elektronendichte berechnet. Letztere kann als Ausgangspunkt für weitere *Refinement*-Schritte genutzt werden. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt bis keine weiteren Verbesserungen (sichtbar an den R-Faktoren) erreicht werden können. Diese Neuberechnung der Phasen erfolgt mit dem Programm **Refmac5** (VAGIN ET AL., 2004). Dieses Programm ist außerdem dazu in der Lage ein *Refinement* im reziproken Raum durchzuführen. Dabei werden die Atomparameter solange variiert, bis die aus der Struktur berechneten Amplituden F_{calc} möglichst gut mit den gemessenen Amplituden F_{obs} übereinstimmen. Auch dabei werden Nebenbedingungen verwendet, welche dafür sorgen, dass die Molekülstruktur bei schlechter Auflösung nicht verzerrt wird.

Die Aminosäuren der Hämoglobine des Nashorns *Ceratotherium simum* und des Kralenfroschs *Xenopus laevis* wurden mit **Coot** anhand der Primärsequenz ausgetauscht und in die Dichte eingepasst (siehe Kapitel 3.2.4, S. 46 und Kapitel 3.3.4, S. 61). Überwacht wurden diese Veränderungen anhand der *Density fit*- und *Rotamer fit*-Analyse des Programms. Neben den Aminosäuren erfolgte die Einpassung von Wassermolekülen in passende positive Differenzdichteflächen sowie die korrekte Ausrichtung der Peptide anhand ihrer Torsionswinkel ϕ und ψ . Letztere wurde mit Hilfe eines Ramachandran-Plots (RAMACHANDRAN ET AL., 1963), welcher durch **Coot** berechnet werden kann, durchgeführt. Nach jedem größeren *Refinement* Vorgang wurde mit Hilfe des in **CCP4** (WINN ET AL., 2011) implementierten Programms **Refmac5** der Fortschritt der Strukturverbesserung überprüft. **Refmac5** berechnet unter anderem die R- und R_{free} -Werte des Strukturmodells. Bei der Verbesserung der Struktur wurde stets darauf geachtet, dass sich beide R-Faktoren verbessern und das Verhältnis zwischen ihnen nicht zu groß wird, da dies auf falsche Änderungen hindeutet. Das *Refinement* wurde für beendet erklärt, wenn die angewandten Strukturverbesserungen keinen Einfluss mehr auf die R-Faktoren ausübten.

2.7.12 Darstellung und Vermessung der Proteinstrukturen

Die Analyse der Kristallstrukturen erfolgte mit dem Programm **UCSF Chimera** (Version 1.11) (PETTERSEN ET AL., 2004). Neben der Visualisierung der Proteine, sowie der Erstellung von Abbildungen, wurde **Chimera** ebenfalls genutzt um z.B. Distanzen zwischen Atomen zu vermessen sowie RMSD-Unterschiede zu berechnen und graphisch darzustellen. Die Berechnung der RMSD-Werte der c_{α} -Atome des Peptidrückgrats im Vergleich zu anderen Hämoglobinstrukturen erfolgte durch die Option „*Match Maker*“ und der Unteroption „*Specific chain(s) in reference structure with specific chain(s) in match structure*“.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigungsgrad der Hämoglobine

Die Aufreinigung der Hämoglobine aus *X. laevis* und *C. simum* erfolgte mit Hilfe der Methode nach Paoli und Nagai (2004). Um den Reinheitsgrad der Proben festzustellen wurde mit ihnen eine SDS-PAGE (Abb. 14a) sowie eine native PAGE durchgeführt (Abb.14b). Jede Gelspur enthielt jeweils 2 µg Protein, damit selbst schwache Verunreinigungen sichtbar werden. Zum besseren Vergleich diente humanes Hämoglobin.

Das SDS-Gel (14%; pH 8,8; Abb.14a) weist bei allen drei Proben eine dominante Doppelbande bei ca. 13 kDa auf. Diese ist auf die α - und β -Untereinheiten des Hämoglobins zurückzuführen und entspricht den Erwartungen. Bei den Proben aus *X. laevis* und *C. simum* sind keine weiteren Banden zu erkennen, was für eine hohe Probenreinheit spricht. Verwunderlich ist, dass die Proben optisch sehr deutlich unterhalb der 15 kDa liegen, da Hämoglobinuntereinheiten typischerweise ~16 kDa groß sind. Vermutlich wurde hier die Auflösungsgrenze des Gels überschritten.

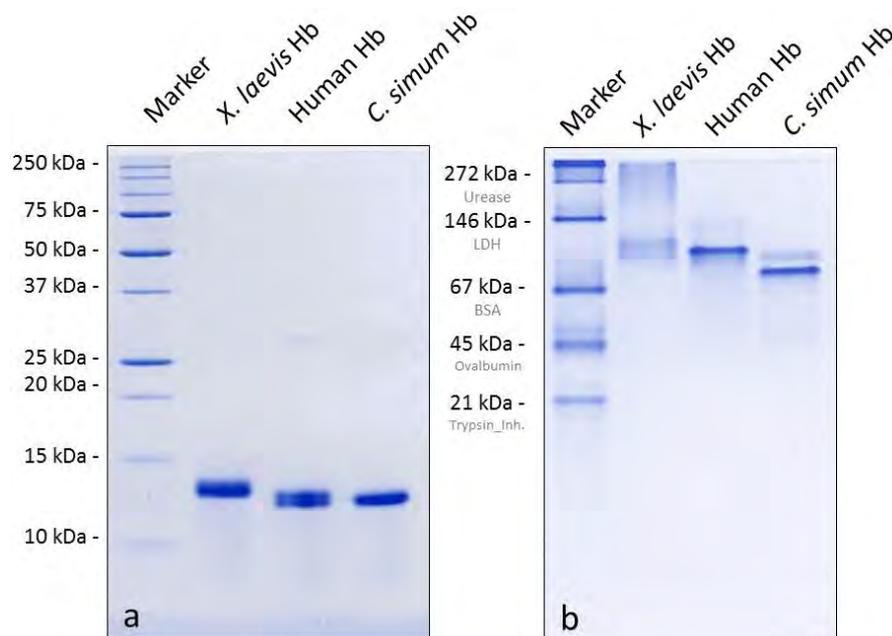


Abbildung 14: **SDS und native PAGE der aufgereinigten Hämoglobinproben.** Aufgetragen wurden jeweils die Hb des Breitmaulnashorns, des Krallenfroschs und des Menschen. **A:** 14 % SDS-Gel, pH 8,8. **B:** 12 % natives Gel, pH 7,5. Beide Gele zeigen, dass die Aufreinigung der Hämoglobine erfolgreich war. Alle Banden liegen in den erwarteten Bereichen für die UE (ca. 16 kDa) und das native Tetramer (64 kDa). Die native Hb-Probe des Krallenfroschs weist mehrere Banden auf, bei denen es sich um Isoformen oder um Multimere des Hämoglobins handeln könnte. Färbung: Coomassie nach KANG ET AL. (2002).

Das native Gel (12%; pH 7,5; Abb. 14b) zeigt dagegen deutlich mehr Banden. Da das SDS-Gel zeigt, dass keine Verunreinigungen in den Proben vorliegen, muss es sich bei allen nativen Banden um Hämoglobin handeln. Die *X. laevis* Hämoglobinprobe weist zwei unscharfe Banden auf, von denen eine nur knapp ins Gel eingelaufen ist. Die zweite Bande befindet sich auf gleicher Höhe mit der einzigen Bande des humanen Hämoglobins. Das *C. simum* Hämoglobin besitzt ebenfalls zwei Banden im Bereich des humanen Hämoglobins. Die untere Bande ist dabei deutlich stärker ausgeprägt als die obere.

Da das SDS-Gel zeigt, dass keine weiteren Proteine in den Proben vorhanden sind, muss es sich bei allen Banden des nativen Geles um Hämoglobin handeln. Höchstwahrscheinlich handelt sich dabei um Isoformen oder um Multimeren des Tetramers. Die Existenz von Isoformen in der Probe kann Probleme bei der Kristallisation bereiten, dennoch soll die Kristallisation beider Hämoglobine zunächst ohne weitere Aufreinigungsschritte durchgeführt werden.

3.2 Kristallstruktur des *Ceratotherium simum* Hämoglobins (HbCs)

3.2.1 Kristallisation des HbCs

Als Ausgangsbedingungen für die Kristallisation dieses Hämoglobin dienten die Bedingungen bei denen TEXTOR (2011) erfolgreich Alpaka-Hämoglobin kristallisieren konnte. Die Mutterlauge bestand somit zunächst aus variierenden Konzentrationen folgender Komponenten: PEG 3350, Ammoniumsulfat, Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,5) sowie Ethylenglykol bzw. Glycerin als Frostschutzmittel. Tab. 7 zeigt die Zusammensetzung der Ansätze, welche ausnahmslos bei 20°C durchgeführt wurden. Es zeigte sich während des Prozesses, dass TRIS-Puffer (50 mM, pH 7,5) wesentlich besser zur Lagerung der Probe geeignet ist, da das Hämoglobin im Natriumphosphatpuffer bereits in der Stammlösung kristallisierte.

Tabelle 7: Ansätze zur Kristallisation des HbCs

Nr.	Puffer	PEG 3350	(NH ₄) ₂ SO ₄	Cryoschutz	mg/ml
1	Natr.Phos.10 mM, pH 6,5	15-26,5 %	-	-	5
2	Natr.Phos.10 mM, pH 6,5	14-24 %	0,05-0,3 M	-	5
3	Natr.Phos.10 mM, pH 6,5	14-24 %	0,4-1 M	-	5
4	Natr.Phos.10 mM, pH 6,5	10-20 %	0,4-1 M	Ethylenglykol 35-38%	1
5	TRIS 50 mM, pH 7,5	10-20 %	0,4-1 M	Ethylenglykol 35-38%	10
6	TRIS 50 mM, pH 7,5	18-28 %	0,4-1 M	Ethylenglykol 25%	10
7	TRIS 50 mM, pH 7,5	18-28 %	0,4-1 M	Glycerin 25%	10
8	TRIS 50 mM, pH 7,5	10-20 %	0,4-0,7 M	Ethylenglykol 25%	10
9	TRIS 50 mM, pH 7,5	17-20 %	0,5 M	Ethylenglykol 25%	10

Alle Kristalle bildeten sich bereits über Nacht oder nach wenigen Tagen und waren stets lang, dünn und nadelförmig. In einigen Ansätzen war zudem deutlich der faserige Charakter der Kristalle zu beobachten (Abb. 15a). Für die Strukturgewinnung sollten Proteinkristalle idealerweise eine ähnliche Dicke in alle drei Raumrichtungen besitzen und eine stabile Struktur besitzen. Da dies für die bisher gewonnenen Kristalle nicht zutraf, wurde zusätzlich das Crystal Screening Kit 1 & 2 (Hampton Research, Aliso Viejo) genutzt um festzustellen, ob geeignetere Kristallformen erhalten werden können. Jedoch bildete das Hämoglobin in allen Fällen die gleichen nadelförmigen Strukturen aus. Fokus bei der Kristallisation war es also, die Faserigkeit der Kristalle auf ein Minimum zu beschränken und die Zucht in frostschtzhaltigem Medium zu ermöglichen. Letzteres ist nötig um die Kristalle vor der Vermessung möglichst vor mechanischem Stress und somit vor einem Zerfasern zu schützen. Die besten Kristalle konnten in Ansatz Nr. 9 (siehe Tabelle 7) gezüchtet werden (Abb. 15b).

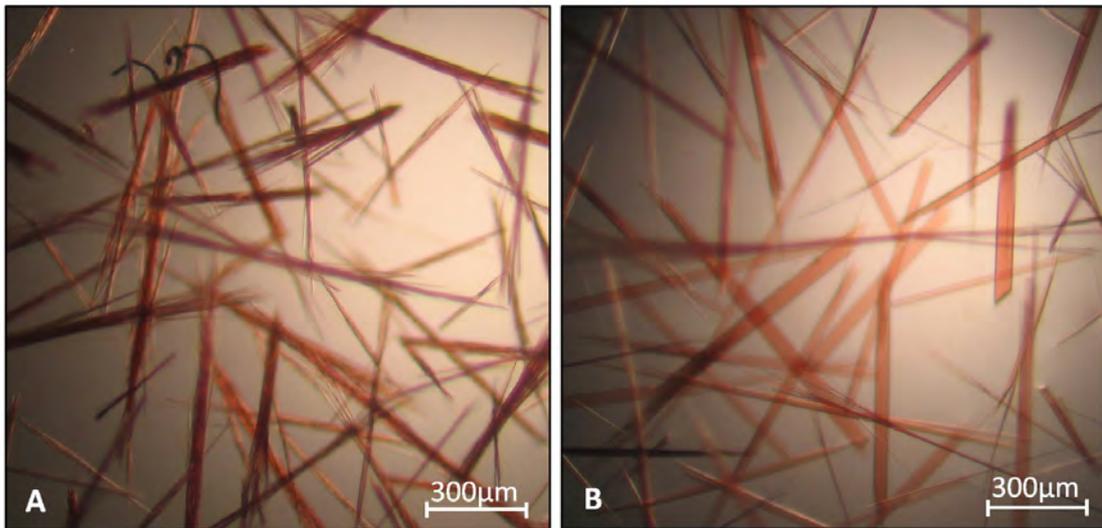


Abbildung 15: **Typische Kristallformen des Rhinoceros Hämoglobins.** **A:** Das Hämoglobin neigt zur Bildung von faserigen Nadeln. **B:** Optimierte Kristalle, welche für die Streudatengewinnung genutzt wurden. Gezüchtet bei 17% PEG 3350, 0,5 M Ammoniumsulfat, 25% Ethylenglykol, 50 mM TRIS-Puffer pH: 7,5, 20°C und einer Proteinkonzentration von $c = 10$ mg/ml.

3.2.2 Primärdaten der Streuexperimente

Ein Kristall aus des Kristallisationsansatzes, welcher in Abb. 15B dargestellt ist, wurde zur Gewinnung der Streuamplituden genutzt. Da die Mutterlauge des Kristalls schon ein Frostschutzmittel beinhaltetete, konnte bei der Einspannung des Kristalls in die Drehanode auf die Inkubation in Ethylenglykol verzichtet werden. Der Kristall blieb so bestmöglich erhalten und konnte unter folgenden Bedingungen vermessen werden:

- 360 Aufnahmen; $\varphi = 360^\circ$; $\Delta\varphi = 1^\circ$
- Pixel pro Aufnahme: 3450 x 3450
- Pixelgröße: 0,10 mm
- Belichtungszeit: 1800 s
- Detektorabstand: 150 mm
- genutzte Wellenlänge: 1,54 Å
- Maximaler Streuwinkel $2\Theta = 49^\circ$

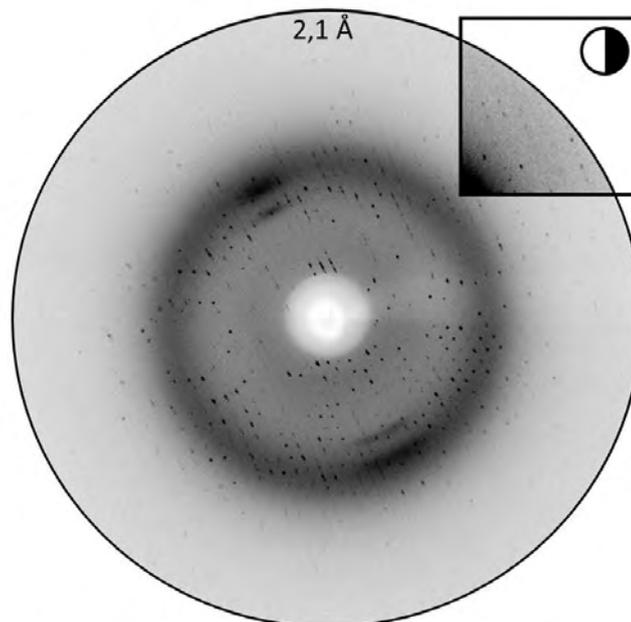


Abbildung 16: **Strebild für *Ceratotherium simum* Hämoglobin.** Aufnahme bei $\varphi=91,00^\circ - 92,00^\circ$. Der Abstand zum Detektor betrug 150 mm. Die Auflösungsgrenze zeigt die Auflösung bei welcher der Datensatz ausgewertet wurde (2.1 Å). Zu erkennen sind z.B. Bragg-Reflexe unterschiedlicher Intensität, diffuse Streuung (dunkler Ring) und der Bereich, welcher durch den Strahlenfänger (*Beamstop*) verdeckt wurde (weiße Fläche).

Abb. 16 zeigt beispielhaft die Aufnahme $\varphi = 91,00^\circ - 92,00^\circ$. Man erkennt Reflexe bis zu einer Auflösung von 2,1 Å. Im Bereich höherer Auflösungen sind einige überlappende Reflexe zu sehen. Die Aufnahmen ließen sich jedoch ohne Probleme mit dem Programm **Mosflm** auswerten und es ermittelte für den Kristall die monokline Raumgruppe P1 2₁ 1, mit der Einheitszelle: a = 53,00 Å b = 119,43 Å, c = 53,34 Å und den Winkeln $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 113,42^\circ$ und $\gamma = 90^\circ$. Die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Raumgruppe liegt bei 92,2%. Weitere Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 8 aufgeführt. Einzig der Wert der Vollständigkeit, welcher angibt wie viele der theoretisch messbaren Reflexe gemessen wurden, liegt mit nur 83,8% (74,0% in der äußeren Schale) unterdurchschnittlich. Dies ist höchstwahrscheinlich durch die hohe Anzahl an überlappenden Reflexen und die faserige Kristallform zu erklären. Da keine andere Kristallform erhalten wurde, muss mit diesem Datensatz weiter gearbeitet werden.

Tabelle 8: Statistik des HbCs Datensatzes berechnet mit Scala

Streudaten	Datensatz
Raumgruppe	Nr. 4: P1 2 ₁ 1
Einheitszelle	a = 53,00 Å, b = 119,43 Å, c = 53,34 Å $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 113,42^\circ$
Auflösungsbereich	2,10 Å - 15,66 Å
Anzahl akzeptierter Reflexe	200846 (15418)
Anzahl unabhängiger Reflexe	29582 (2137)
Vollständigkeit (%)	83,8 (74,0)
R _{meas}	0,102 (0,312)
R _{merged}	0,088 (0,268)
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	14,0 (6,2)
Mosaizität	1,13

Alle Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Schale.

3.2.3 Zellinhaltsanalyse

Mit Hilfe des Programms **Matthews** wurde eine Zellinhaltsanalyse durchgeführt. Die Molekulare Masse, welches sich aus der Aminosäuresequenz der Untereinheit des HbCs, ermitteln lässt, wurde dazu mit 16100 Da angegeben. Die höchste Wahrscheinlichkeit (P = 0,66) ergab sich für vier Ketten pro asymmetrischer Einheit mit einem Matthews-Koeffizienten von 2,41 und einem Lösungsmittelgehalt von 48,90%. Da das Hämoglobin aus vier Untereinheiten besteht und auch der Koeffizient im Rahmen des von (MATTHEWS, 1968) angegebenen Bereichs liegt, handelt es sich um glaubhafte Daten. Die Wahrscheinlichkeit von 66% scheint zunächst gering, jedoch lässt sich die Richtigkeit dieser Vorhersage schnell anhand des Ergebnisses des *Molecular Replacements* und der berechneten R-Faktoren überprüfen und im Zweifelsfall mit anderen Berechnungsvoraussetzungen wiederholen. In diesem Fall erwies sich das Ergebnis als korrekt.

3.2.4 Molecular Replacement und Strukturverbesserung

Für die Bestimmung der Phasen durch *Molecular Replacement* wurde die Kristallstruktur des Met-Hämoglobin-Dimers des Pferdes *Equus caballus* (pdb-Code: 2MHB) genutzt (HbEc) (LADNER ET AL., 1977). Nach der Phasenbestimmung lag der R-Wert bei 0,28 und der R_{free} -Wert bei 0,34. Da die so erhaltene Struktur die Aminosäuresequenz des HbEc (BRAUNITZER & MATSUDA, 1963; PERUTZ ET AL., 1968), muss diese an die Sequenz des HbCs angepasst werden (MAZUR ET AL., 1982). Die zu verändernden Aminosäuren wurden durch ein Alignment der beiden Sequenzen ermittelt (Abb. 17) und mit Hilfe des Programms **Coot** ersetzt. Anschließend erfolgte eine Anpassung aller Aminosäuren an die Elektronendichte.

```

***.:*****:*.:.:*.:.:*****.*****.*****
P01958 | HBA_HORSE VLSAADKTNVKAAWSKVGGHAGEYGAELERMFLGFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKAHGK
P01963 | HBA_CERSI VLSPTDKTNVKTAWGHVGAQAGEYGAELERMFLSFPPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKAHGK
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
KVGDALTLAVGHLDDLPGALSNDLHAKLRVDPVNFKLLSHCLLSTLAVHLPNDFTPA
KVGDALTQAVGHLDDLPGALSALSDLHAYKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLALHHPQDFTPA
.....70.....80.....90.....100.....110.....120
*****.*****
VHASLDKFLSSVSTVLTSKYR 141
VHASLDKFLSNVSTVLTSKYR 141
.....130.....140.

*:.:..*****.:.:*****.*****.*****.*****.*****.*****
P02062 | HBB_HORSE VQLSGEKAAVLALWDKVNEEEVGGEALGRLLVVYPWTRQFFDSFGDLSNPGAVMGNPKV
P02066 | HBB_CERSI VELTAEKAAVLALWDKVKEDEVGGEALGRLLVVYPWTRQFFDSFGDLSTPAAVMGNNAKV
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
KANGKVLHSFGEGVHHLNLLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLVVVLAHFHFK
KANGKVLHSFGDGVHHLNLLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLVVVLAHFHFK
.....70.....80.....90.....100.....110.....120
:*****.*****.*****
DFTPELQASYQKVVAGVANALAHKYH 146
DFTPELQAAYQKVVAGVANALAHKYH 146
.....130.....140.....

```

Abbildung 17: Vergleich der Aminosäuresequenzen des HbEc und des HbCs. **HBA:** Aminosäuresequenz der α -Untereinheiten des HbEc und des HbCs (MAZUR ET AL., 1982). Identität: 89%, Homologie: 90%. **HBB:** Aminosäuresequenz der β -Untereinheiten. Identität: 92% Identität, Homologie: 95%. * = identische AS, : = homologe AS (gleiche Eigenschaft), . = unterschiedliche AS. Startcodon entfernt. Alignment erstellt mit ClustalX.

Es ist wichtig an dieser Stelle zu erwähnen, dass zu Anfang jeder Proteinsequenz ein Methionin steht, da es sich bei dessen codierenden Basenabfolge AUG um das Startcodon der Transkription handelt. Üblicherweise wird dieses Methionin in Kristallstrukturen nicht dargestellt. Um Missverständlichkeiten der Nummerierung zu vermeiden, wurde daher das Methionin im Alignment in Abb. 17 entfernt.

Abb. 18 zeigt beispielhaft zwei Aminosäurereste, an denen die Verbesserung der Struktur deutlich sichtbar wird. Die Aminosäurekette der Ausgangsstruktur ist in Gelb (Abb. 18A und C) dargestellt und die verbesserte Kette in Orange (Abb. 18B und D). Fehlende Dichte im Modell wird durch eine grüne Differenzdichte und überschüssige Dichte durch eine rote Differenzdichte dargestellt. Werden diese Stellen im Strukturmodell verbessert und angepasst, verschwinden diese und die eigentliche Elektronendichte (schwarz) ändert sich in eine verbesserte Version ab (nicht dargestellt).

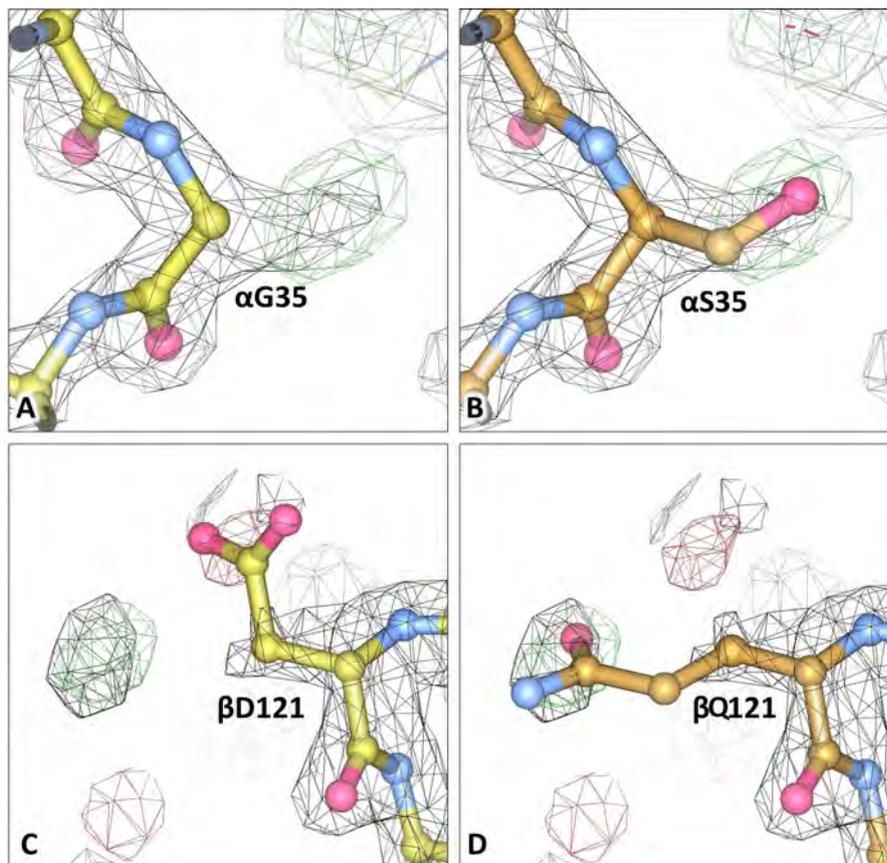


Abbildung 18: **Refinement der Aminosäuren des HbCs.** Gelb: Ausgangsstruktur (HbEq), orange: verbesserte Struktur (HbCs), schwarz: Elektronendichte, grün: positive Differenzdichte (fehlende Dichte in der Struktur), rot: negative Differenzdichte (überschüssige Dichte). Wasseratome nicht dargestellt. **A:** Der ursprüngliche Aminosäurerest α_1 Gly35 füllt die Elektronendichte nicht aus. **B:** Das falsche Glycin wird zum passenden Serin abgeändert, welches die positive Differenzdichte sehr gut ausfüllt. **C:** Die ursprüngliche Asparaginsäure β_1 D121 bildet eine rote Differenzdichte. **D:** Die Asparaginsäure an Position β_1 121 wurde durch Glutamin ersetzt und in die grüne Differenzdichte verschoben. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: COOT.

Am Rest α_135 ist die Verbesserung sehr gut zu erkennen: Das Glycin der Ausgangsstruktur füllt die Elektronendichte nicht aus (Abb.18A). Verändert man diesen Rest in ein Serin, was der Primärsequenz des Nashorn Hbs entspricht, ist die grüne Differenzdichte entsprechend ausgefüllt (Abb. 18B). Die Aminosäure β_121 ist in der Ausgangsstruktur eine Asparaginsäure (Abb. 18C). Sie bildet aufgrund ihrer falschen Rotation eine rote Differenzdichte. Die AS-Sequenz schreibt für diese Position ein Glutamin vor, welches aufgrund seiner Länge in eine entfernte grüne Differenzdichte positioniert werden kann (Abb. 18D). Generell besitzt die gemessene Elektronendichte hauptsächlich klare und deutliche Bereiche und weist nach der Verbesserung kaum größere Differenzdichten auf (Abb. 19A). Auch besonders konservierte Bereiche, wie das aktive Zentrum des Proteins, das Häm, sind sehr gut zu erkennen (Abb. 19B). Das Hämoglobin kristallisiert unter den gewählten Bedingungen üblicherweise in der Met-Form (PAIRET & JAENICKE, 2010), weshalb in die grüne Differenzdichte in der Nähe des Eisenions ein Wassermolekül eingepasst wurde.

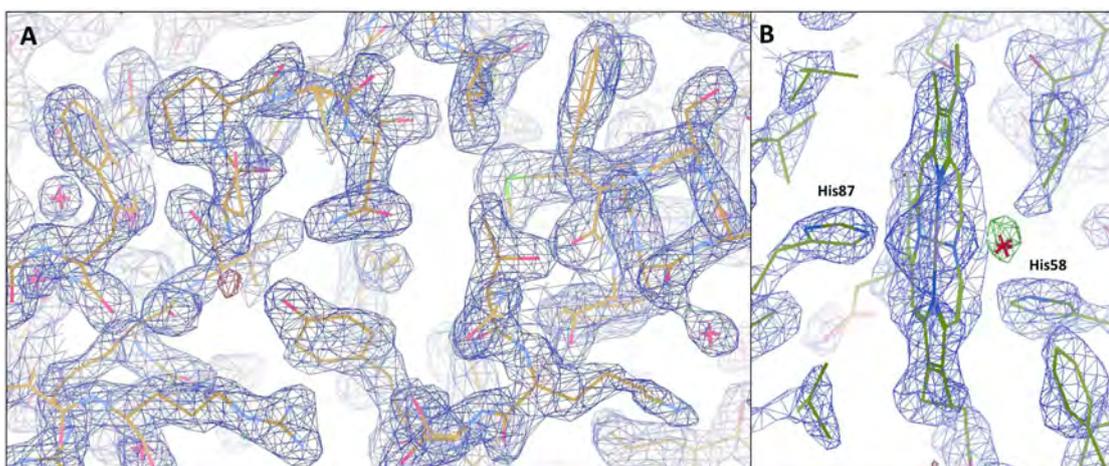


Abbildung 19: **Übereinstimmung der Elektronendichte mit der fertigen Struktur des HbCs.** **A:** Grober Überblick auf einen Teil der α_2 -Untereinheit. Es sind kaum noch positive oder negative Differenzdichten zu sehen und die Aminosäurereste passen sich sehr gut in die Elektronendichte ein. **B:** Häm-Gruppe der α_1 -Untereinheit. Das proximale Histidin 87 und das distale Histidin 58 sind ebenso vorhanden wie alle anderen konservierten Bereiche des aktiven Zentrums. In die grüne Differenzdichte am Eisenzentrum wurde ein Wassermolekül eingepasst, da Hämoglobin bei den gewählten Bedingungen üblicherweise im Met-Zustand kristallisiert (PAIRET & JAENICKE, 2010). Wasseratome nicht dargestellt. Kontur der Elektronendichte = $1,5 \sigma$. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: COOT.

Neben der Sequenzveränderung und der Einpassung in die Elektronendichte muss darauf geachtet werden, dass die Position der Rotamere korrekt und die Richtigkeit der ϕ - und ψ -Winkel der Peptidbindungen gegeben ist. Letzteres wird mit Hilfe des Ramachandran-Plots überprüft (Abb. 20). Der Plot zeigt, dass 97,7% der Aminosäurereste in favorisierten Regionen (schwarze Quadrate/schwarze Dreiecke) liegen und 1,9% in erlaubten Regionen (orangene Quadrate). Zwei Glutaminsäurereste ließen sich nicht in erlaubte Regionen verbessern, sie bilden die Ausreißer mit 0,4% (rote Quadrate). Diese Glutaminsäuren liegen beide an Position $\beta 2$ und damit an den C-terminalen Enden, welche üblicherweise sehr flexibel und daher schlecht aufgelöst sind. Diese Ausreißer sind somit zu vernachlässigen und es handelt sich um ein sehr gutes Ergebnis.

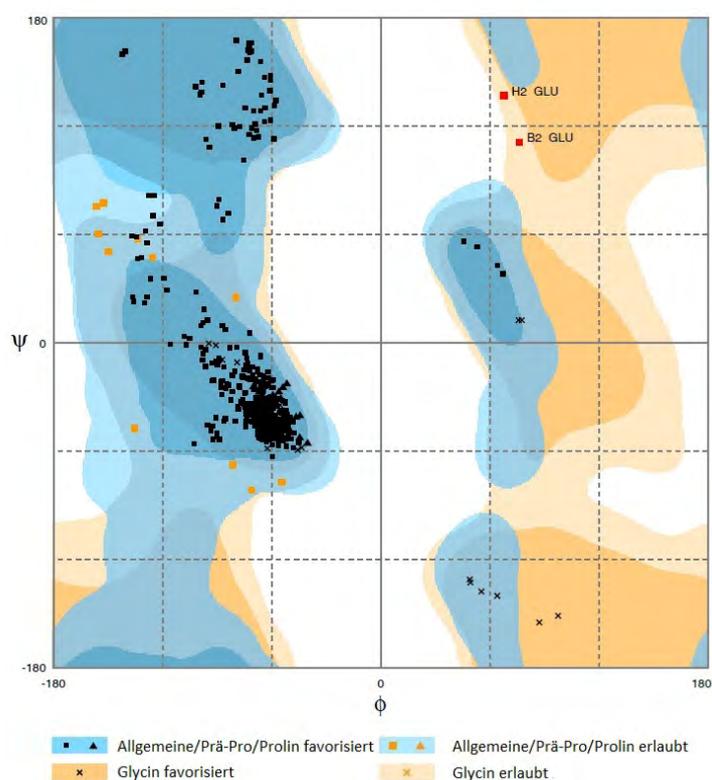


Abbildung 20: **Ramachandran-Plot der finalen Kristallstruktur des HbCs.** 97,9% der Aminosäurereste befinden sich in den favorisierten Regionen der ϕ - und ψ -Winkel (schwarze Quadrate/ schwarze Dreiecke). 1,9% der Reste befinden sich in erlaubten Regionen (orangene Quadrate) und 0,4% der Reste (zwei Glutaminsäuren) bilden die Ausreißer (rote Quadrate). Erstellt mit RAMPAGE (LOVELL ET AL., 2003).

Tab. 9 zeigt die einzelnen Schritte der Strukturverbesserung und wie deren Einfluss auf die Verbesserung der R-Faktoren (berechnet mit **Refmac5**). Nach dem Einfügen der Wassermoleküle (insgesamt 127) in freie Elektronendichteblassen hatte keine Veränderung

mehr einen positiven Einfluss auf diese Werte und das Refinement wurde mit einem R-Faktor von 0,228 und einem R_{free} von 0,297 beendet. In der Kristallstruktur ist zu beachten, dass die Methionine, welche in den einzelnen Sequenzen der Untereinheiten an erster Stelle stehen, üblicherweise in Kristallstrukturen nicht platziert werden, da es sich dabei um die Aminosäure mit dem Startcodon AUG handelt. Alle weiteren Aminosäuren der verschiedenen Untereinheiten konnten in die Elektronendichte platziert werden.

Tabelle 9: Auswirkungen der Strukturverbesserung auf die R-Faktoren

Strukturverbesserung	R-Faktor (R_{free} -Faktor)
nach Molecular Replacement	0,4225 (0,4099)
nach erstem Refmac5-Lauf	0,2847 (0,3386)
Korrektur Aminosäuresequenz $\alpha 1$	0,2672 (0,3323)
Korrektur Aminosäuresequenz $\beta 1$	0,2617 (0,3317)
Korrektur Aminosäuresequenz $\alpha 2$	0,2557 (0,3287)
Korrektur Aminosäuresequenz $\beta 2$	0,2514 (0,3197)
Rotamer/Geometry/Density Fit Kontrolle	0,2492 (0,3134)
Wassermoleküle eingefügt (127 Stk.)	0,2285 (0,2978)

R-Faktoren berechnet mit Refmac5

3.2.5 Finale Kristallstruktur des HbCs

Die allgemeine Struktur des *Ceratotherium simum* Hämoglobins (HbCs) ist identisch mit der typischen Faltung, die alle Hämoglobine aufweisen (Abb. 21). Es handelt sich um ein Tetramer, welches aus jeweils zwei α - (rot) und β -Untereinheiten (blau) aufgebaut ist. Jede der Untereinheiten trägt ein Häm als aktives Zentrum (weiß), welches in der Met-Form kristallisierte. Die HbCs Kristallstruktur trägt also ein Wassermolekül am Eisenion jedes aktiven Zentrums. Um herauszufinden, ob die Struktur in einem T- oder einem R-Zustand vorliegt, wurden RMSD-Vergleiche mit bekannten Hämoglobinstrukturen berechnet. Es handelt sich dabei um die durchschnittliche Abweichung der c_{α} -Atome des Peptidrückgrats zweier Strukturen. Die RMSD-Berechnungen erfolgten mit dem Programm **Chimera** (PETTERSEN ET AL., 2004) und der Option „*Match Maker*“. Diese Option ermöglicht das *Superimposement* der vier Untereinheiten des HbCs mit anderen Hämoglobinstrukturen, sowie die automatische Berechnung des RMSD-Wertes. Die Ergebnisse sind Tab. 10 zu entnehmen. Die höchste Abweichung liegt im Vergleich mit dem T-Zustand vor (5,5 Å), was zu erwarten war, da die Kristallstruktur im Met-Zustand vorliegt. Die niedrigsten RMSD-Unterschiede liegt beim R2-Zustand (0,8 Å) und dem RR2-Zustand (1,00 Å) vor, dicht gefolgt vom R-Zustand mit durchschnittlich 1,6 Å Unterschied. Aufgrund dieser Werte wird angenommen, dass die Kristallstruktur des HbCs im R2-Zustand vorliegt.

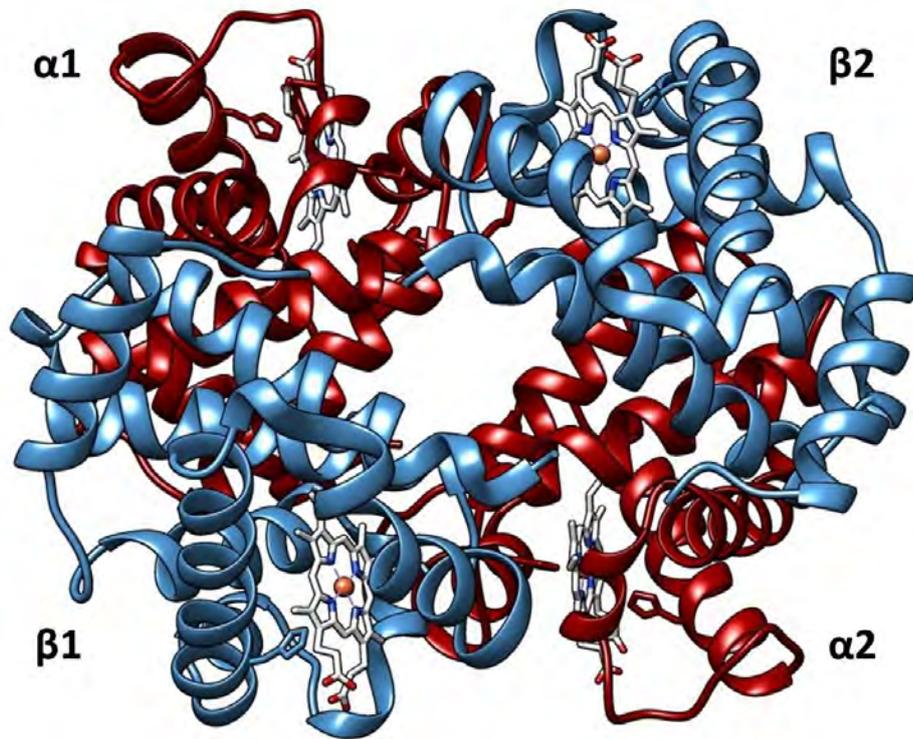


Abbildung 21: Die Kristallstruktur des *Ceratotherium simum* Hämoglobins. Typisches tetrameres Hämoglobin, welches aus zwei α -Untereinheiten (rot) und zwei β -Untereinheiten (blau) aufgebaut ist. Jede der Untereinheiten trägt ein Häm (weiß), welches in der Met-Form vorliegt. Das Hämoglobin liegt im R2-Zustand vor.

Tabelle 10: RMSD-Unterschiede zwischen den Strukturen der verschiedenen Beladungszustände und dem HbCs

Zustand	pdb	Organismus	RMSD (Å)	Atompaare
T	1A3N	Mensch	5,533	572
R	1HHO	Mensch	1,695	574
	1LJW	Mensch	1,656	574
	1HBR	Huhn	1,585	570
R2	1BBB	Mensch	0,829	574
RR2	1MKO	Mensch	1,001	574
R3	1YZI	Mensch	3,823	574

Anschließend wurden die ausgetauschten Aminosäuren näher betrachtet und auf ihre Form und Funktion hin untersucht.

α -Untereinheit: Abb. 22 und Tab. 11 verdeutlichen graphisch die Veränderungen in der Struktur der α -Untereinheit. Die Aminosäuren mit Nummer 4, 15, 19, 111, 115, 131 werden nicht näher betrachtet, da der Austausch aufgrund der gleichen physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren vermutlich keinen großen Einfluss auf die Struktur ausgeübt hat. Die meisten veränderten Aminosäuren liegen in α -Helices. Der Austausch dieser Reste hat die Bildung dieser Sekundärstrukturen nicht behindert. Es fällt allerdings auf, dass einige hydrophobe Aminosäuren durch hydrophile ersetzt wurden bzw. umgekehrt. Dies ist bei den Resten $\alpha 5$, $\alpha 12$, $\alpha 35$, $\alpha 68$ und $\alpha 113$ (hydrophob zu hydrophil) der Fall und umgekehrt bei $\alpha 82$, $\alpha 89$ und $1\alpha 07$ (hydrophil zu hydrophob). Dies führt zu dem logischen Schluss, dass diese Reste sich im Vergleich zu den Resten des HbEc, eher zum Proteininneren oder zum Lösungsmittel richten. Interessant ist außerdem der neue Histidin-Rest auf Position $\alpha 113$, welcher eine positive Ladung besitzt und somit einen möglichen Bindungspartner für Salzbrücken darstellt. Die Reste $\alpha 20$ und $\alpha 16$ bleiben zwar hydrophil, verlieren jedoch ihre positive Ladung. Auf all diese Strukturveränderungen soll in Kapitel 4.2 (S. 86) näher eingegangen werden.

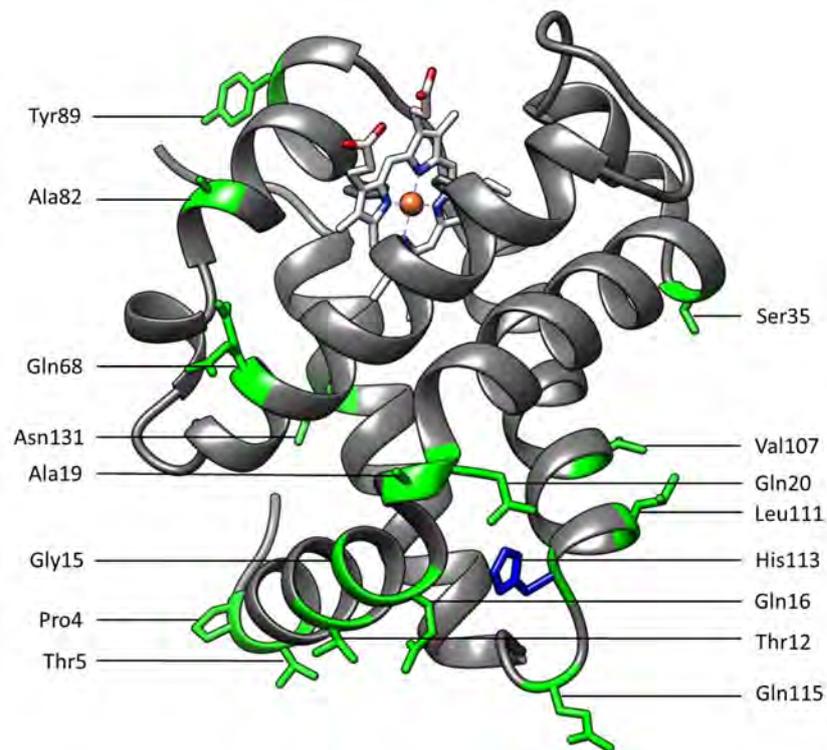


Abbildung 22: **Kristallstruktur der α -Untereinheit des HbCs.** Die Untereinheit besitzt die für Hämoglobin typische helikale Struktur. Jede der Untereinheiten trägt ein Häm (weiß). Grün: AS, welche von der Sequenz des Pferdes abweichen und im Zuge des Refinements ausgetauscht wurden. Blau: Neue AS mit positiver Ladung.

Tabelle 11: AS-Sequenzunterschiede zwischen der α -Untereinheit des HbEc und des HbCs

Nr.	HbEc	Eigenschaft	HbCs	Eigenschaft	Ort
4	Ala	hydrophob	Pro	hydrophob, nicht polar	Helix
5	Ala	hydrophob	Thr	hydrophil	Helix
12	Ala	hydrophob	Thr	hydrophil	Helix
15	Ser	hydrophil	Gly	hydrophob	Helix
16	Lys	stark hydrophil, positiv	Gln	hydrophil, ungeladen	Helix
19	Gly	hydrophob	Ala	hydrophob	Helix
20	His	stark hydrophil	Gln	hydrophil, ungeladen	Helix
35	Gly	hydrophob	Ser	hydrophil	Helix
68	Leu	hydrophob	Gln	hydrophil, ungeladen	Helix
82	Asn	hydrophil, ungeladen	Ala	hydrophob	Helix
89	His	stark hydrophil	Tyr	leicht hydrophob	Helix
107	Ser	hydrophil	Val	hydrophob	Helix
111	Val	hydrophob	Leu	hydrophob	Helix
113	Leu	hydrophob	His	hydrophil, positiv	Loop
115	Asn	hydrophil, ungeladen	Gln	hydrophil, ungeladen	Loop
131	Ser	hydrophil	Asn	hydrophil, ungeladen	Helix

β -Untereinheit: Abb. 23 und Tab. 12 verdeutlichen graphisch die Veränderungen in der Struktur der β -Untereinheit. Bei der genaueren Analyse der β -Untereinheit scheinen die Reste $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 21$, $\beta 50$, $\beta 52$ und $\beta 58$ zunächst keinen größeren Einfluss auf die Struktur zu besitzen, aufgrund ihrer gleichen Eigenschaften und ähnlichen Größen. Auch bei dieser Untereinheit bildet sich die typische α -helikale Struktur aus. Im Gegensatz zu den Veränderungen der α -Untereinheit wird in der β -Untereinheit nur das hydrophobe β Ser129 zu einem hydrophilen Alanin ausgetauscht. Dafür gibt es einige Veränderung bei geladenen Aminosäuren. So verliert Rest $\beta 121$ z.B. seine Ladung, in dem die negative Asparaginsäure durch ein ungeladenes Glutamin ersetzt wird. Position $\beta 116$ behält dagegen ihre Ladung, da Arginin durch ein ebenfalls positiv geladenes Lysin ersetzt wird und auch die negative Glutaminsäure auf Position $\beta 73$ wird durch eine negative Asparaginsäure ersetzt. Ladung dazu erlangen die Positionen $\beta 2$ (Glutaminsäure, negativ) und $\beta 19$ (Lysin, positiv). Es ist möglich, dass diese fünf geladenen Aminosäurereste wichtige Bindungspartner für Salzbrücken sind. Dies wird in Kapitel 4.2 (S. 86) näher untersucht.

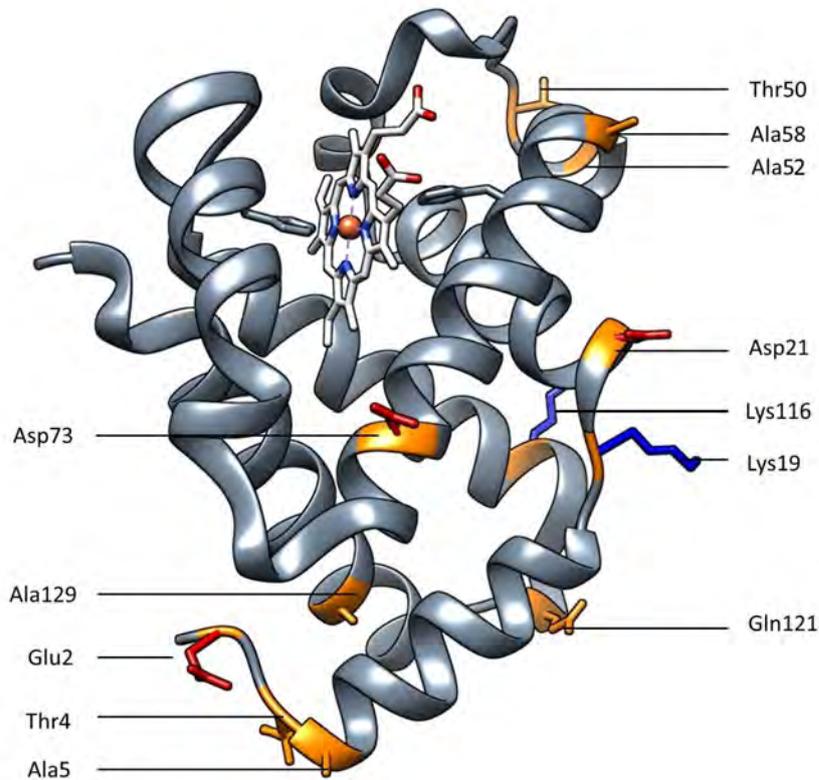


Abbildung 23: **Kristallstruktur der β -Untereinheit des HbCs.** Die UE besitzt die für Hämoglobin typische helikale Struktur. Jede der UE trägt ein Häm (weiß). Orange = AS, welche von der Sequenz des Pferdes abweichen und im Zuge des Refinements ausgetauscht wurden sind grün eingefärbt. Neue AS, die eine Ladung besitzen = blau (positiv) und rot (negativ).

Tabelle 12: **AS-Sequenzunterschiede zwischen der β -Untereinheit des HbEc und des HbCs**

Nr.	HbEc	Eigenschaft	HbCs	Eigenschaft	Ort
2	Gln	hydrophil, ungeladen	Glu	stark hydrophil, negativ	Loop
4	Ser	hydrophil	Thr	hydrophil	Loop
5	Gly	hydrophob	Ala	hydrophob	Helix
19	Asn	hydrophil, ungeladen	Lys	stark hydrophil, positiv	Loop
21	Glu	stark hydrophil, negativ	Asp	stark hydrophil, negativ	Loop
50	Asn	hydrophil, ungeladen	Thr	hydrophil	Loop
52	Gly	hydrophob	Ala	hydrophob	Helix
58	Pro	hydrophob	Ala	hydrophob	Helix
73	Glu	stark hydrophil, negativ	Asp	stark hydrophil, negativ	Helix
116	Arg	stark hydrophil, positiv	Lys	stark hydrophil, positiv	Helix
121	Asp	stark hydrophil, negativ	Gln	hydrophil, ungeladen	Helix
129	Ser	hydrophil	Ala	hydrophob	Helix

3.2.6 Salzbrücken des HbCs

Zur weiteren Analyse wurde überprüft ob und an welchen Stellen der Kristallstruktur die Ausprägung von Salzbrücken möglich ist. Dies geschah mit Hilfe des Programms **Chimera** (PETTERSEN ET AL., 2004). Die Bindungspartner (positiv: Histidin, Lysin, Arginin; negativ: Asparaginsäure, Glutaminsäure) wurden eingefärbt und die Distanz zwischen benachbarten bzw. gegenüberliegenden Aminosäuren in der Struktur abgemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 aufgelistet. Abstände die über der erforderlichen Länge (ca. 4 Å) für Salzbrücken liegen (KUMAR & NUSSINOV, 2002), sind in Klammern geschrieben. Alle Aminosäuren die für das HbCs spezifisch sind, wurden mit einem Asterisk (*) markiert.

Tabelle 13: Mögliche Salzbrücken im HbCs

Untereinheit	AS 1	AS 2	Distanz UE 1 (Å)	Distanz UE 2 (Å)
α	Asp6	Lys127	(6,87)	2,67
	Glu27	Arg31	2,92	2,76
	Glu27	His112	2,71	2,69
	Glu30	His50	2,97	2,98
	Asp64	Lys60	2,79	(4,15)
	Asp74	Lys7	2,81	2,77
	Asp116	His113*	(4,60)	(4,29)
	Häm- α	Häm	Lys61	3,61
Häm- α	Häm	His45	2,46	2,59
β	Glu2*	Lys8	3,61	3,53
	Glu7	Lys132	3,04	3,24
	Glu20	His69	(8,65)	3,34
	Glu20	Lys65	(5,83)	3,54
	Asp21*	Lys65	3,23	3,72
	Glu22	Lys19*	3,83	3,90
	Glu22	His117	(4,22)	3,72
	Glu26	His117	3,13	2,39
	Glu26	Lys116*	(4,11)	(5,24)
	Asp73*	His77	(5,42)	(4,51)
	Asp73*	His69	3,59	(5,03)
	Asp79	Lys8	(4,37)	(4,05)
	Glu90	Lys144	(4,79)	(4,78)
	Glu101	Arg104	(4,24)	(5,56)
	Häm- β	Häm	Lys66	2,807
α - β	α 1Arg92	β 2Asp43	2,62	
α - β	α 2Arg92	β 1Asp43		3,47

Interessant ist, dass nur zwei Salzbrücken zwischen verschiedenen Untereinheiten ausgebildet werden können. Es handelt sich dabei um eine Brücke zwischen α 1Arg92 und β 2Asp43 bzw. α 2Arg92 und β 1Asp43. Bei allen anderen Kontakten handelt es sich um intramolekulare Salzbrücken. Zusammenfassend existieren acht sichere Salzbrücken pro α -Untereinheit und zehn pro β -Untereinheit. Mitgerechnet wurden Kontakte, die nur

in einer Untereinheit den erforderlichen Abstand aufweisen. Nicht mitgerechnet wurden Salzbrücken, die in beiden Untereinheiten über dem erforderlichen Abstand lagen. Bei der β -Untereinheit fällt auf, dass dies bei einigen möglichen Verbindungen der Fall ist, welche räumlich sehr nahe beieinander liegen. Dies wird in Kapitel 4.2 (S. 86) näher diskutiert.

3.3 Kristallstruktur des *Xenopus laevis* Hämoglobins (HbXI)

Das Vollblut des Krallenfrosches wurde uns mit freundlicher Unterstützung von ■■■■■ durch das ■■■■■ der Johannes Gutenberg-Universität zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Kristallisation des HbXI

Als Ausgangsbedingung für die Kristallisation des *Xenopus laevis* Hämoglobins (HbXI) wurden die Bedingungen gewählt, bei denen schon das HbCs, das Meerschweinchen-Hb (PAIRET & JAENICKE, 2010) und das Alpaka-Hb (TEXTOR, 2011) erfolgreich kristallisierten (siehe Tab. 14, Ansatz 1, 4, 5). Alle Kristallisationsansätze wurden bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Am erfolgreichsten verhielt sich Ansatz 2, bei welchem sich bereits nach einem Tag Kristallcluster, Gel und Mikrokristalle bildeten (Abb. 24a, b, c). Dieser Ansatz wurde daher durch Variation aller Bedingungen weiter verbessert, bis in Ansatz 8 die in Abb. 24d dargestellten Kristalle erhalten wurden. Diese waren zwar wohlgeformt, aber mit einer Größe von ca. 50 μm^2 viel zu klein und instabil um mit ihnen das Streuexperiment durchzuführen. Der weitere Fokus der Kristallisation lag somit darauf diese Kristalle zu vergrößern. In Ansatz 9 wurde daher durch Volumenvariationen und Seeding mit Altkristallen versucht das Wachstum zu verlangsamen und die Größe der Kristalle zu erhöhen. Leider bildeten sich bei jeder dieser Bedingungen die gleichen kleinen Kristalle. Für Ansatz 10 wurde daher die Proteinkonzentration erhöht (20 mg/ml), doch jeder Ansatz enthielt nur ausgefallenes Protein, was verwunderlich war, da diese Konzentration schon vorher erfolgreich getestet wurde. In jedem weiteren Ansatz unter diesen Bedingungen, auch unter Bedingungen, die bereits erfolgreich waren, kam es zu einem Ausfall des Proteins. Diese Ansätze sind daher nicht weiter in Tab. 14 aufgeführt.

Vermutlich führte das Alter des Proteins, welches zu diesem Zeitpunkt bereits fünf Monate alt war, dazu, dass das Hämoglobin die Kristallisationsbedingungen nicht mehr vertrug. Dies ist ungewöhnlich, da Hämoglobine üblicherweise eine gute Haltbarkeit aufweisen. Da das Hämoglobin auf einem SDS-Gel keinen Zerfall zeigte und auch ein normales Absorptionsspektrum aufwies, wurde mit dieser Probe das Crystal Screening

3. ERGEBNISSE

1 & 2 (Hampton Research, Ort) durchgeführt um neue Kristallisationsbedingungen zu finden. Die besten Ergebnisse ergaben sich in Reagenz 6 mit 30 % PEG 4000, 0,2 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5 und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml (Abb. 24e). Diese Bedingungen wurden in Ansatz 17 weiter verfeinert und es wuchsen die in Abb. 24f gezeigten Kristalle. Sie zeigten eine andere, eher unregelmäßigere Form, wiesen aber eine hohe Stabilität auf. Ein Kristall aus Abb. 24f, gewachsen unter den Bedingungen 30% PEG 4000, 0,15 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wurde, nach Überführung in 25 % Ethylenglykol, erfolgreich an der Drehanode vermessen (siehe Kapitel 2). Es konnten keine besseren Kristalle gezüchtet werden, da auch unter diesen Bedingungen die Kristallisation bei weiteren Experimenten fehlschlug.

Tabelle 14: Ansätze zur Kristallisation des HbXI

Nr.	Puffer	PEG 3350	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Cryoschutz	Hb ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)
1	TRIS 50 mM, pH 7,5	18-28%	0,1-4 M	Ethylenglykol 25%	20
2	TRIS 50 mM, pH 7,5	13-18%	0,1-4 M	Ethylenglykol 25%	20
3	TRIS 50 mM, pH 7,5	13-18%	0,1-4 M	-	20
4	Natr.Phos.100 mM, pH 6,5	10-20%	0-0,3 M	-	5
5	Natr.Phos.100 mM, pH 6,5	- %	2-3 M	-	5
6	TRIS 50 mM, pH 7,5	14-24%	0,3-0,75 M	Ethylenglykol 25%	5
7	TRIS 50 mM, pH 7,5	10-15%	0,1-0,4 M	Ethylenglykol 25%	5
8	TRIS 50 mM, pH 7,5	10-15%	0,5-0,8 M	Ethylenglykol 25%	20
9	TRIS 50 mM, pH 7,5	12-13%	0,47-0,52 M	Ethylenglykol 25%	5
10	TRIS 50 mM, pH 7,5	12-13%	0,47-0,52 M	Ethylenglykol 25%	20
*					
		PEG 4000	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		
17	TRIS 100 mM, pH 8,5	20-35 %	0,1-0,35	-	10

*Wegen Problemen mit der Stabilität des Proteins wurden noch andere Kontrollansätze durchgeführt, die hier nicht weiter aufgeführt werden.

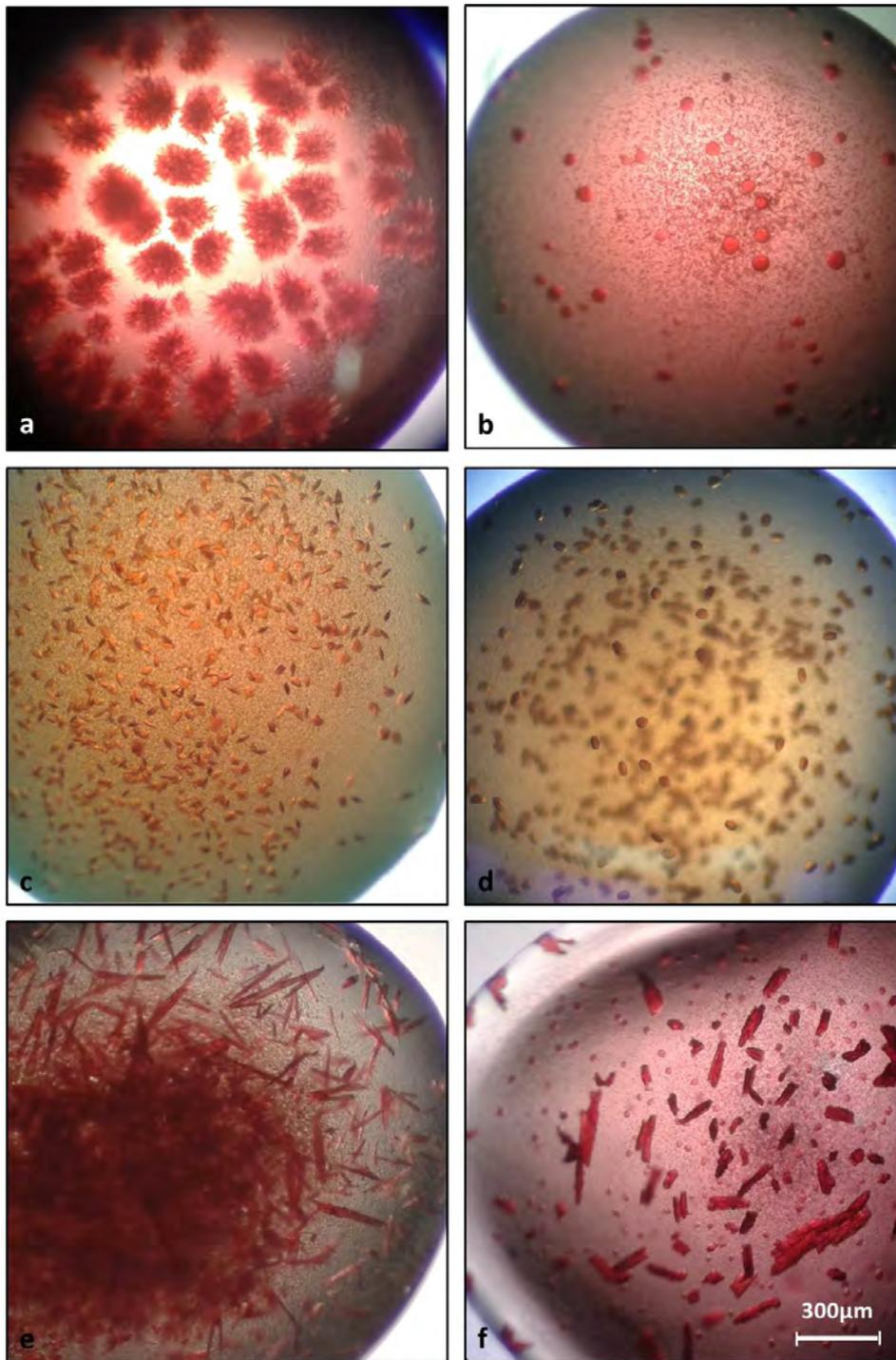


Abbildung 24: **Typische Kristallformen des HbXI.** **a&b:** Nadelförmige Kristallcluster und Proteingel aus Ansatz 1. **c&d:** Verbesserte Proteinkristalle aus Ansatz 8, instabil. **e&f:** Verbesserte Kristalle der neuen Bedingungen (Ansatz 17, f). Ein Kristall aus **f** wurde vermessen und streute bis 2.7 Å. Gezüchtet bei 30% PEG 4000, 0,15 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mM TRIS-Puffer pH: 8,5, 20°C und $c = 10$ mg/ml.

3.3.2 Primärdaten der Streuexperimente

Ein Kristall aus Abb. 24f wurde zur Gewinnung der Streuamplituden genutzt. Da die Mutterlauge des Kristalls kein Gefrierschutzmittel enthielt, musste der Kristall mit Hilfe einer Nylonschleife zunächst durch eine 25% Ethylenglykollösung gezogen werden, bevor die Nylonschleife inklusive Kristall auf den Goniometerkopf der Drehanode eingespannt werden konnte. Der Kristall blieb bestmöglich erhalten und konnte unter folgenden Bedingungen vermessen werden:

- 246 Aufnahmen; $\varphi = 246$; $\Delta\varphi = 1^\circ$
- Pixel pro Aufnahme: 3450 x 3450
- Pixelgröße: 0,10 mm
- Belichtungszeit: 900 s
- Detektorabstand: 150 mm
- genutzte Wellenlänge: 1,54 Å
- Maximaler Streuwinkel $2\Theta = 49^\circ$

Tabelle 15: Statistik des HbXI Datensatzes

Streudaten	Datensatz
Raumgruppe	Nr. 4: P1 2 ₁ 1
Einheitszelle	a = 53,16 Å, b = 66,83 Å, c = 79,01 Å $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 92,3^\circ$
Auflösungsbereich	2,70 Å - 24,87 Å
Anzahl akzeptierter Reflexe	76726 (10105)
Anzahl unabhängiger Reflexe	15308 (2015)
Vollständigkeit	99,6 (99,3)
R _{meas}	0,242 (0,374)
R _{merged}	0,188 (0,294)
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	5 (2,9)
Mosaizität	0,93

Alle Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Schale.

Abb. 25 zeigt beispielhaft die Aufnahme $\varphi = 0,00$ -1,00. Man erkennt Reflexe bis zu einer Auflösung von 2,7 Å. Weitere Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 15 aufgeführt. Die Vollständigkeit des Datensatzes liegt bei 99,6%. Dies spricht für die Qualität des Kristalls, obwohl dieser optisch nicht den typischen Kriterien eines Einkristalls entsprach.

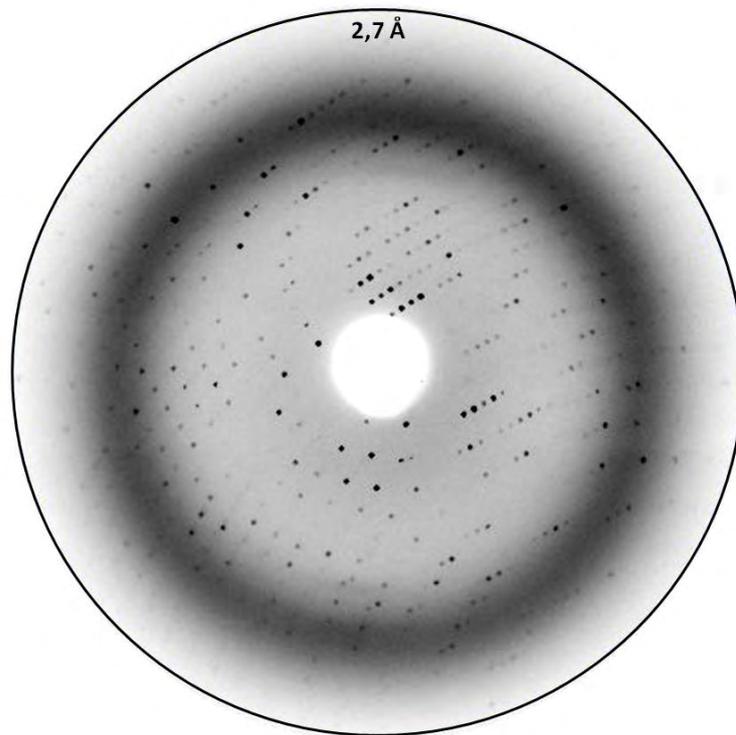


Abbildung 25: **Beispielhaftes Streubild des HbXI.** Aufnahme bei $\varphi = 0,00-1,00$. Der Abstand zum Detektor betrug 150 mm. Die Auflösungsgrenze zeigt die Auflösung, bei welcher der Datensatz ausgewertet wurde (2,7 Å). Zu erkennen sind z.B. Bragg-Reflexe unterschiedlicher Intensität, diffuse Streuung (dunkler Ring) und der Bereich, welcher durch den Strahlenfänger (*Beamstop*) verdeckt wurde (weiße Fläche).

3.3.3 Zellinhaltsanalyse

Mit Hilfe des Programms **Matthews** wurde eine Zellinhaltsanalyse durchgeführt. Das Molekulargewicht, welches sich aus der Aminosäuresequenz der Untereinheit des *Xenopus*-Hämoglobins ermitteln lässt, wurde dazu mit 16000 Da angegeben. Die höchste Wahrscheinlichkeit ($P = 0,66$) ergab sich für vier Ketten pro asymmetrischer Einheit mit einem Matthews Koeffizienten von 2,19 und einem Lösungsmittelgehalt von 43,86%. Da das Hämoglobin aus vier Untereinheiten besteht und auch der Koeffizient im Rahmen des von (MATTHEWS, 1968) angegebenen Bereichs liegt, handelt es sich bei diesem Ergebnis um glaubhafte Daten. Die Wahrscheinlichkeit von 66% scheint zunächst gering, jedoch lässt sich die Richtigkeit dieser Vorhersage schnell anhand des Ergebnisses des *Molecular Replacements* und der berechneten R-Faktoren überprüfen und im Zweifelsfall mit anderen Berechnungsvoraussetzungen wiederholen. In diesem Fall erwies sich das Ergebnis als korrekt.

3.3.4 Molecular Replacement und Strukturverbesserung

Für die Phasenbestimmung wurden verschiedene Kristallstrukturen von Hämoglobinen als Phasenvorlage getestet, vor allem wurde das humane Hämoglobin in seinen verschiedenen Zuständen (oxy, deoxy, met). Das beste Ergebnis lieferte das *Molecular Replacement* mit der Kristallstruktur des oxy-Hämoglobin-Dimers des Menschen (pdb: 1HHO) (SHAANAN, 1983) mit einem R-Wert von 0,3 und einem R_{free} -Wert von 0,39. Auch hier muss die Primärstruktur der erhaltenen Struktur an die Aminosäuresequenzen des HbXl angepasst werden.

Da mehrere Isoformen der α - (5) und β -Untereinheiten (3) des HbXl existieren, musste zunächst festgestellt werden um welche Isoform es sich handelt, wobei es sich bei den Isoformen HBA1 und 2 und HBB1 und 2 um Sequenzen aus adulten Tieren handelt und HBA3, 4 und 5 und HBBL um Sequenzen aus der Larve der Krallenfrösche (WILLIAMS ET AL., 1980; BANVILLE & WILLIAMS, 1985; MEYERHOF ET AL., 1984; KAY ET AL., 1983; KNOCHEL ET AL., 1983; PATIENT ET AL., 1983).

Dies geschah durch eine genaue Analyse der Elektronendichte an markanten Bereichen und dem Abgleich der potentiellen Aminosäuren mit Hilfe eines Alignments der verschiedenen Isoformsequenzen (Abb. 26).

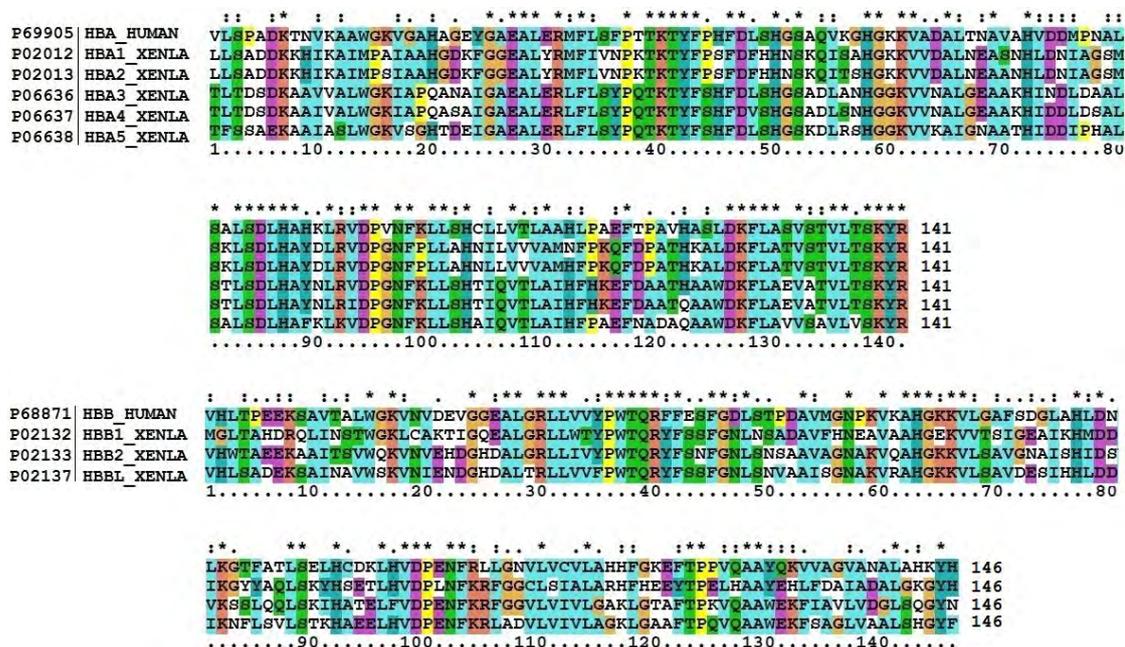


Abbildung 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen Hbs und des HbXl. **HBA:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der α -Untereinheiten. **HBB:** Aminosäuresequenzen der β -Untereinheiten. Zum Vergleich der Identitäten und der Homologien siehe Tab. 16. * = identische AS, : = homologe AS (gleiche Eigenschaft), . = unterschiedliche AS. Startcodon entfernt. Alignment erstellt mit ClustalX.

Es ist wichtig an dieser Stelle zu erwähnen, dass zu Anfang jeder Proteinsequenz ein Methionin steht, da es sich bei dessen codierenden Basenabfolge AUG um das Startcodon der Transkription handelt. Üblicherweise wird dieses Methionin in Kristallstrukturen nicht dargestellt. Um Missverständlichkeiten der Nummerierung zu vermeiden, wurde daher das Methionin im Alignment in Abb. 26 entfernt.

Tab. 16 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Identitäten und Homologien der Untereinheiten des HbXl untereinander und im Vergleich zum humanen Hb. Sie macht deutlich, dass die Untereinheiten des HbXl nur eine minimal 46%ige und maximal 63%ige Identität des humanen Hämoglobins aufweisen. Die Homologie schwankt zwischen 65% und 73%. Dabei handelt es sich um sehr niedrige Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen, da sich Hämoglobine üblicherweise sehr ähnlich sind.

Die Hämoglobin-Sequenzen der Larven wurde bei der Strukturverbesserung von vornherein ausgeschlossen, da es sich bei der untersuchten Struktur ausschließlich um Hämoglobin aus adulten Tieren handelte. Die entsprechenden Aminosäureketten wurden mit Hilfe des Programms **Coot** bestmöglich in die Elektronendichte eingepasst.

Tabelle 16: **Identität bzw. Homologie der Untereinheiten des HbXl im Vergleich untereinander und mit humanen Hb**

	HBA human	HBA1 Xl	HBA2 Xl	HBA3 Xl	HBA4 Xl	HBA5 Xl
HBA human	-	56%/71%*	58%/70%	63%/71%	61%/72%	63%/73%
HBA1 Xl	56%/71%	-	94%/99%	54%/70%	55%/69%	56%/71%
HBA2 Xl	58%/70%	94%/99%	-	55%/69%	55%/69%	51%/66%
HBA3 Xl	63%/71%	54%/70%	55%/69%	-	96%/100%	73%/83%
HBA4 Xl	61%/72%	55%/69%	55%/69%	96%/100%	-	72%/82%
HBA5 Xl	63%/73%	56%/71%	51%/66%	73%/83%	72%/82%	-
	HBB human	HBB1 Xl	HBB2 Xl	HBBL Xl		
HBB human	-	46%/65%	53%/72%	56%/73%		
HBB1 Xl	46%/65%	-	48%/65%	46%/64%		
HBB2 Xl	53%/72%	48%/65%	-	70%/81%		
HBBL Xl	56%/73%	46%/64%	70%/81%	-		

*Identität/Homologie

α -Untereinheit: Abb. 27 zeigt beispielhaft einige Verbesserung der Struktur einer α -Untereinheit. Bei der gelb dargestellten Struktur (Abb. 27A,C,E), handelt es sich um die Ausgangsstruktur nach dem *Molecular Replacement*. Diese Struktur enthält noch die Aminosäuresequenz des menschlichen Hämoglobins. Bei der grün dargestellten Struktur handelt es sich um die Aminosäuren, die sich aus der AS-Sequenz des HbXl ableiten lassen (Abb. 27B,D,F). Die Richtigkeit der verbesserten Aminosäuren zeigt sich bei

neuer Berechnung der Elektronendichte (schwarze Dichte) durch das Verschwinden der positiven Differenzdichte (grüne Dichte).

Die Isoformen HBA1 und HBA2 unterscheiden sich nur in sieben verschiedenen Aminosäurepositionen und es konnte anhand der Elektronendichte nicht eindeutig festgestellt werden um welche Isoform es sich handelt. Aufgrund der höheren Häufigkeit der HBA1 Isoform wird im Folgenden von dieser Isoform ausgegangen. Die Richtigkeit dieser Isoform sollte durch massenspektroskopische Analysen der Proteinkristalle bestätigt werden, welche aus zeitlichen Gründen nicht in diese Arbeit mit einfließen konnten.

In beiden α -Untereinheiten existierte nach dem *Molecular Replacement* ein Abschnitt in Helix A, in welchem die Aminosäuren sehr schlecht in die Elektronendichte eingefügt wurden. Durch bloßes Austauschen der Aminosäurereste und Einpassen in die Elektronendichte konnte dieses Problem nicht behoben werden. Ein Aminosäurerest ragte letztendlich immer komplett aus der Elektronendichte heraus (Abb. 28A). Daher mussten die entsprechenden Reste (α Lys8 bis α Ala19) komplett entfernt und eine neue Differenzdichte berechnet werden (OMIT-Map), mit deren Hilfe die fehlenden Aminosäuren entsprechend wieder in die Struktur eingebaut wurden (Abb. 28B). Es konnten so alle Aminosäuren in der Elektronendichte positioniert werden.

β -Untereinheit: Ebenso wurde mit den Isoformen der β -Untereinheit vorgegangen. Es zeigte sich hier, dass es sich vermutlich um die Isoform HBB1 handeln muss (Abb. 29), da das Einfügen der Aminosäuren der Isoform HBB2 an Position β 59 (Lysin) und β 108 (Valin) an diesen Stellen eine negative Differenzdichte (rote Dichte) verursachte (Abb. 29A,C). Das Einfügen der Aminosäuren Alanin (Abb. 29B) und Serin (Abb. 29D), wie es die HBB1-Sequenz vorsieht, führt, nach Berechnung einer neuen Elektronendichte (schwarz), zu einem deutlich besseren Ergebnis. Aufgrund dieser Beobachtung und der höheren Häufigkeit der HBB1 Isoform wird im Folgenden von dieser Isoform ausgegangen. Die Richtigkeit dieser Isoform sollte jedoch ebenfalls durch massenspektroskopische Analysen der Proteinkristalle bestätigt werden, welche aus zeitlichen Gründen nicht in diese Arbeit mit einfließen konnten. Weitere Verbesserungen der β -Untereinheiten sind in Abb. 30 beispielhaft aufgeführt. Auch hier ist die verbesserte Struktur in grün und die Ausgangsstruktur mit der falschen Aminosäuresequenz in gelb dargestellt. Auch hier füllen die verbesserten AS wesentlich besser die Elektronen- und die positive Differenzdichte aus.

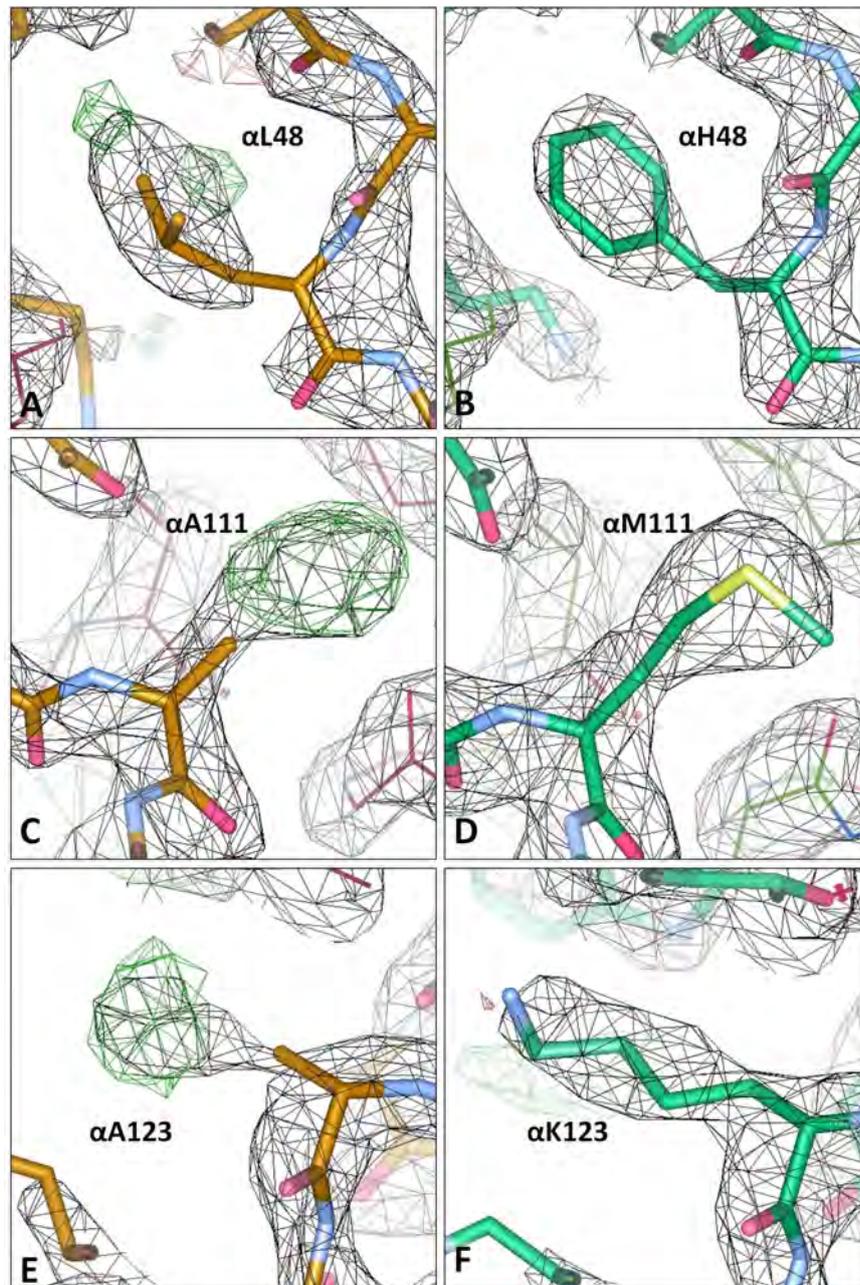


Abbildung 27: **Refinement der α -Untereinheit des HbXI.** Die Aminosäuren der Ausgangsstruktur (gelb) in **A** (α Leu48), **C** (α Ala111) und **E** (α Ala123) sind falsch platziert und verursachen eine positive Differenzdichte. Bei den AS in **B** (α His48), **D** (α Met111) und **F** (α Lys123) handelt es sich um die laut Aminosäuresequenz richtigen AS an diesen Positionen. Das Einfügen dieser Reste und die anschließende Neuberechnung der Elektronendichte (schwarz) führt zu einem Verschwinden der positiven Differenzdichte. Wasseratome nicht dargestellt. Kontur der Elektronendichte = 1,5 σ . Kontur der Differenzdichte = 3,0 σ . Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: **Coot**.

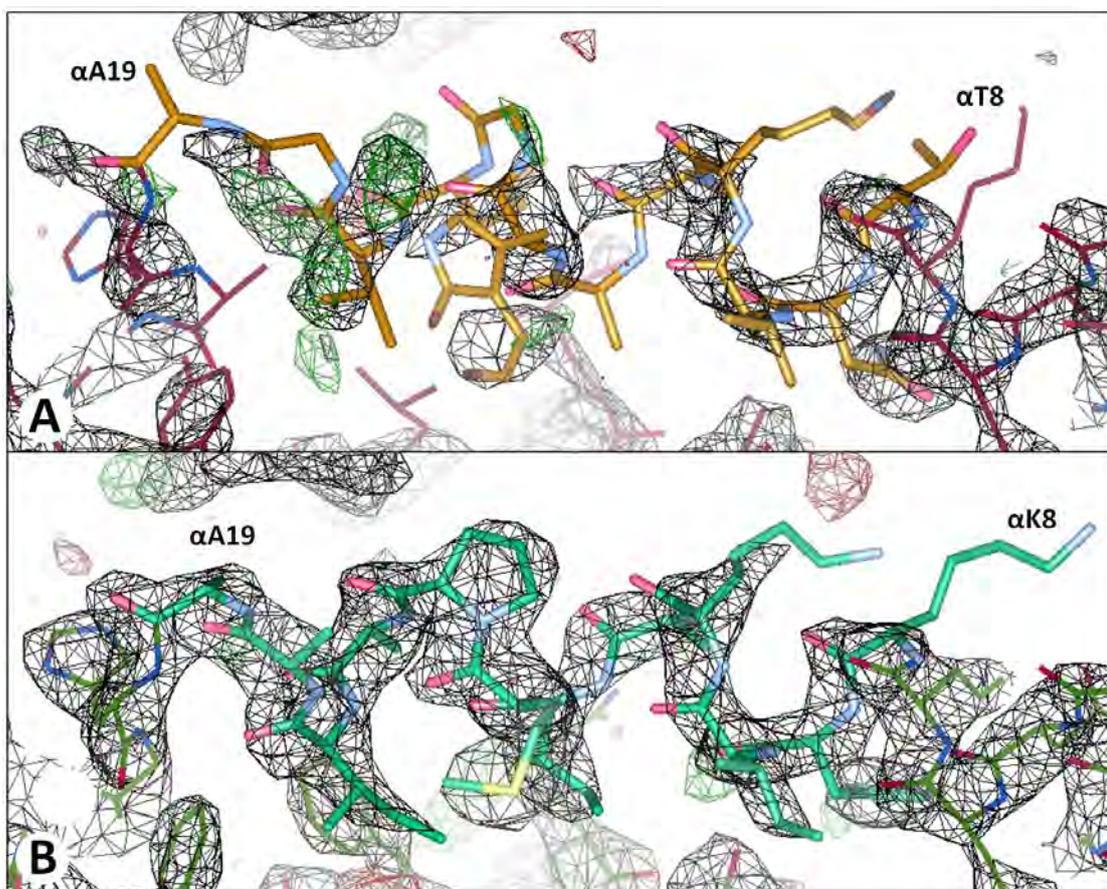


Abbildung 28: **Vergleich der Helix A der α -Untereinheit vor und nach dem Refinement.** **A:** Vor dem Refinement: Helix A weist große Lücken in der Elektronendichte, sowie größere negative Differenzdichten (grüne Flächen) auf. **B:** Nach dem Refinement. Die Reste α Lys8 bis α Ala19 mussten komplett entfernt und neu eingepasst werden. Die positiven Differenzdichten konnten so ausgefüllt werden und verschwanden. Kontur der Elektronendichte = $1,5 \sigma$. Kontur der Differenzdichte = $3,0 \sigma$. Wasseratome nicht dargestellt. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: **Coot**.

Beim Refinement musste außerdem darauf geachtet werden, dass die Stereoisomere der Rotamere, sowie die Korrektheit der ϕ - und ψ -Winkel der Peptidbedingungen eingehalten werden. Letzteres wird mit Hilfe des Ramachandran-Plots überprüft (Abb. 31). Der Plot zeigt, dass 91% der Aminosäurereste in favorisierten Regionen (schwarze Quadrate/schwarze Dreiecke) liegen und 7,7% in erlaubten Regionen (orangene Quadrate). Bei den restlichen 1,2% (rote Quadrate) handelt es sich um sogenannte Ausreißer, die nicht weiter verbessert werden konnten. Die Fortschritte des Refinements sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die finale Struktur besitzt einen R-Faktor von 0,2042 und einen R_{free} von 0,2844. Insgesamt wurden 15 Wassermoleküle eingefügt. In der Kristallstruktur ist zu beachten, dass das Methionin, welches in der Sequenz an erster Stelle steht, üblicherweise

in Kristallstrukturen nicht platziert wird, da es sich dabei um die Aminosäure mit dem Startcodon AUG handelt. Alle weiteren Aminosäuren der β -Untereinheit konnten ohne Probleme in die Elektronendichte eingepasst werden, jedoch musste auf die Platzierung der letzten drei Aminosäuren der β_1 -Untereinheit (Gly144, Tyr145 und His146) und die letzten zwei Aminosäuren der β_2 -Untereinheit (Tyr145, His146) verzichtet werden. Aufgrund der Flexibilität des C-terminalen Endes war nicht ausreichend Elektronendichte vorhanden um diese Reste glaubwürdig in die Struktur einzubauen.

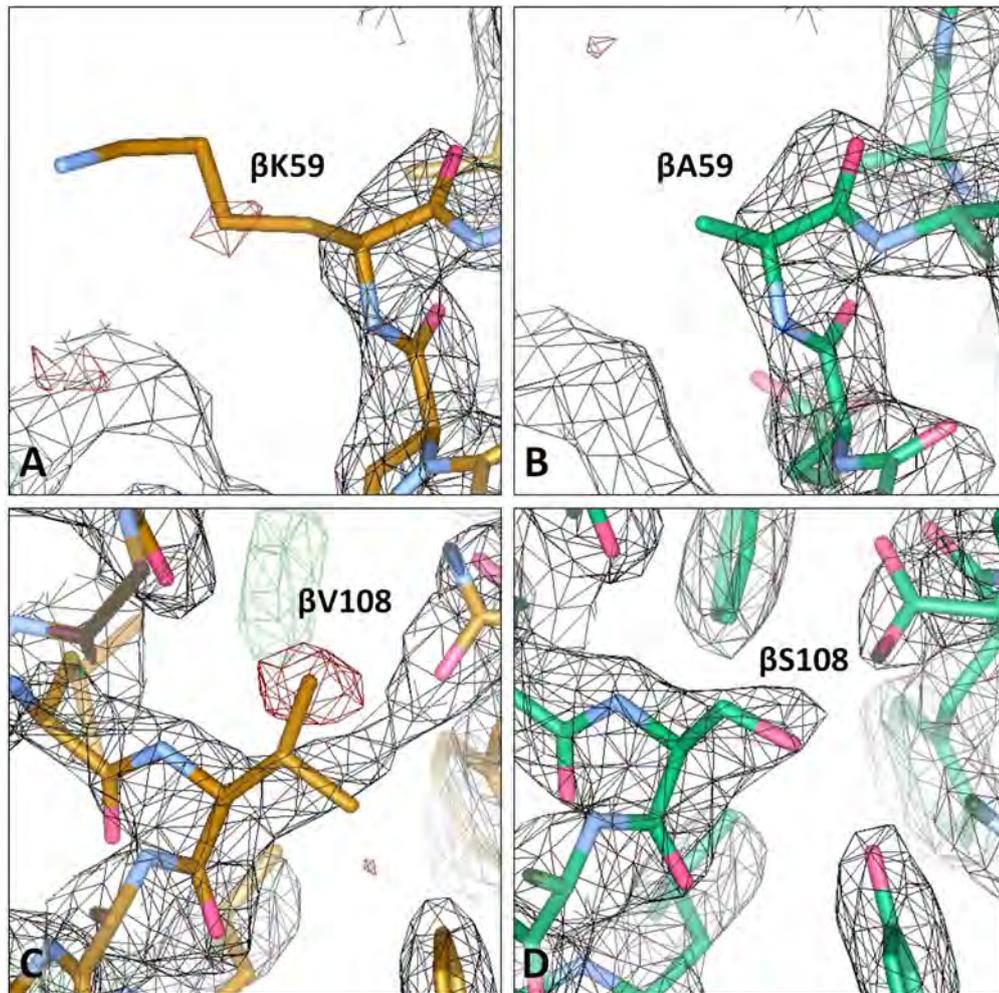


Abbildung 29: **Hinweis auf die Identität der Aminosäuresequenz der β -Untereinheit.** Die Aminosäuren β Lys59 (A) und β Val108 (C), so wie sie die Sequenz der Isoform HBB2 vorsieht, verursachen eine negative Differenzdichte (rot). Die Aminosäuren β A59 (B) und β S108 (D) der Isoform HBB1 liefern ein deutlich besseres Ergebnis nach Neuberechnung der Elektronendichte (schwarz). Wasseratome nicht dargestellt. Kontur der Elektronendichte = $1,5 \sigma$. Kontur der Differenzdichte = $3,0 \sigma$. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: **Coot**.

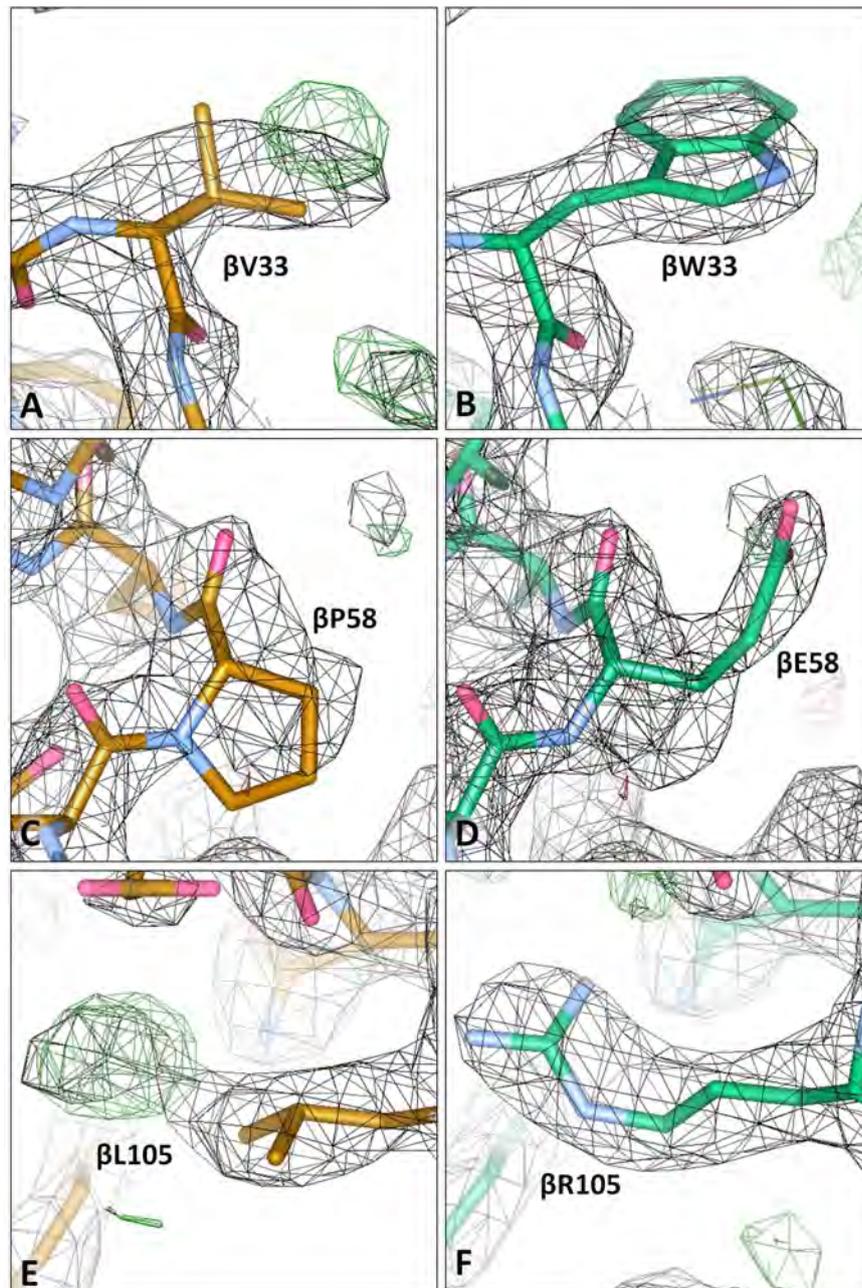


Abbildung 30: **Refinement der β -Untereinheit des HbXI.** Die Aminosäuren der Ausgangsstruktur (gelb) in **A** (β Val33), **C** (β Pro58) und **E** (β Leu105) sind falsch platziert und verursachen eine positive Differenzdichte. Bei den AS in **B** (β Trp33), **D** (β Glu58) und **F** (β Arg105) handelt es sich um die laut Aminosäuresequenz richtigen AS an diesen Positionen. Das Einfügen dieser Reste und die anschließende Neuberechnung der Elektronendichte (schwarz) führt zu einem Verschwinden der positiven Differenzdichte. Kontur der Elektronendichte= $1,5 \sigma$. Kontur der Differenzdichte= $3,0 \sigma$. Wasseratome nicht dargestellt. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: COOT.

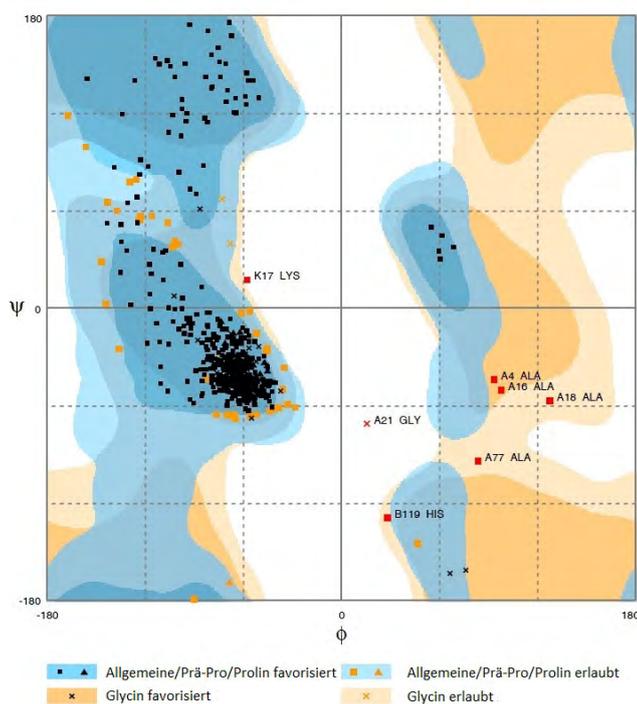


Abbildung 31: **Ramachandran-Plot der finalen Kristallstruktur des HbXI.** 91% der Aminosäurereste befinden sich in den favorisierten Regionen der phi(ϕ) und psi(ψ)-Winkel (schwarze Quadrate/ schwarze Dreiecke). 7,7% der Reste befinden sich in erlaubten Regionen (orangene Quadrate) und 1,2% der Reste (hauptsächlich Alanin) konnten nicht verbessert werden und bilden die Ausreißer (rote Quadrate). Plot erstellt mit RAMPAGE (LOVELL ET AL., 2003).

Tabelle 17: **Auswirkungen der Strukturverbesserung auf die R-Faktoren**

Verbesserung	R-Faktor (R_{free} -Faktor)
nach Molecular Replacement	0,3252 (0,3988)
nach 1. Refmac5-Lauf	0,4509 (0,4488)
Korrektur Aminosäuresequenz $\alpha 1$	0,2982 (0,3788)
Korrektur Aminosäuresequenz $\alpha 2$	0,2758 (0,3608)
Rotamer/Geometry/Density Fit Kontrolle	0,2671 (0,3578)
Korrektur Aminosäuresequenz $\beta 1$	0,2430 (0,3327)
Korrektur Aminosäuresequenz $\beta 2$	0,2281 (0,3066)
Rotamer/Geometry/Density Fit Kontrolle	0,2238 (0,3044)
Wassermoleküle eingefügt	0,2197 (0,3051)
phi-psi-Winkel Kontrolle 1	0,2186 (0,2976)
phi-psi-Winkel Kontrolle 2	0,2077 (0,2926)
Wassermoleküle eingefügt (15 Stk.)	0,2066 (0,2894)
Rotamer/Geometry/Density Fit Kontrolle	0,2042 (0,2844)

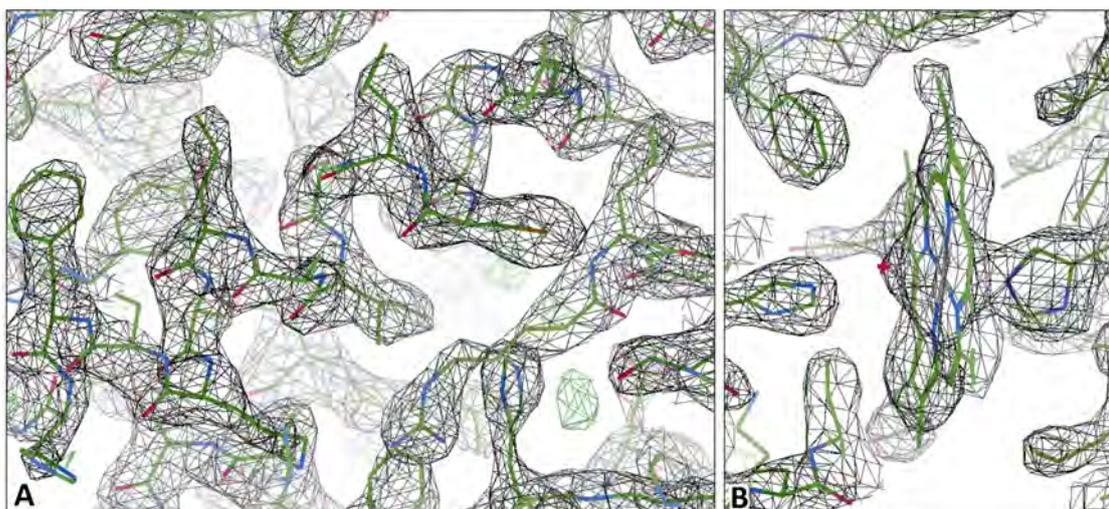


Abbildung 32: **Übereinstimmung der Elektronendichte mit der fertigen Struktur des HbXI.** **A:** Überblick auf einen Teil der α_1 -Untereinheit der fertigen Hämoglobinstruktur. Die Aminosäuren passen sich sehr gut in die Elektronendichte ein. Positive (rot) und negative Differenzdichten (grün) sind nur noch vereinzelt vorhanden. **B:** Die Hämgruppe der α_1 -Untereinheit. Kontur der Elektronendichte= $1,5 \sigma$. Kontur der Differenzdichte= $3,0 \sigma$. Berechnung der Elektronendichte und Darstellung: **Coot**.

Abb. 32 zeigt einen Überblick der α_1 -Untereinheit (Abb. 32.A) zusammen mit der Hämgruppe (32.B). Die meisten Aminosäuren konnten gut in der Elektronendichte platziert werden und es erscheint nur noch sehr wenig positive (grüne Flächen) bzw. negative Differenzdichte (rote Flächen). In die grünen Differenzdichten an den vier Hämgruppen wurde ein Wassermolekül eingepasst (Abb. 32B, rotes Kreuz), da Hämoglobin bei diesen Bedingungen üblicherweise im Met-Zustand kristallisiert (PAIRET & JAENICKE, 2010).

3.3.5 Finale Kristallstruktur des HbXI

Beim Hämoglobin des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (HbXI) handelt es sich um ein für Hämoglobine typisches Tetramer, welches aus jeweils zwei α - (gelb) und β -Untereinheiten (petrol) aufgebaut ist (Abb. 33). Jede der Untereinheiten besitzt die charakteristische Globinfaltung und trägt eine Hämgruppe als aktives Zentrum (weiß). Ähnlich wie das Hämoglobin des Breitmaulnashorns (s. Kapitel 3.2.5, S. 50), ist auch dieses Hämoglobin im Met-Zustand kristallisiert.

Um herauszufinden, ob die Struktur in einem T- oder einem R-Zustand vorliegt, wurden RMSD-Vergleiche mit bekannten Hämoglobinstrukturen berechnet. Es handelt sich dabei um die durchschnittliche Abweichung der c_α -Atome des Peptidrückgrats zweier Strukturen. Die RMSD-Berechnungen erfolgten mit dem Programm **Chimera** und der

Option „*Match Maker*“ (PETTERSEN ET AL., 2004). Diese Option ermöglicht das *Superimpose*ment der vier Untereinheiten des HbXl mit den äquivalenten Untereinheiten anderer Hämoglobine, sowie die automatische Berechnung des RMSD-Wertes. Die Ergebnisse sind Tab. 18 zu entnehmen. Die höchste Abweichung liegt im Vergleich mit dem R3- (2,9 Å) und dem T-Zustand (2,5 Å) vor. Letzterer war zu erwarten, da die Kristallstruktur im Met-Zustand vorliegt. Die niedrigsten RMSD-Unterschiede liegen beim R-Zustand (durchschnittlich 1,2 Å) und dem RR2-Zustand (1,6 Å) vor, dicht gefolgt vom R2-Zustand mit 2,1 Å Unterschied. Aufgrund dieser Werte wird angenommen, dass die Kristallstruktur des HbXl im R-Zustand vorliegt.

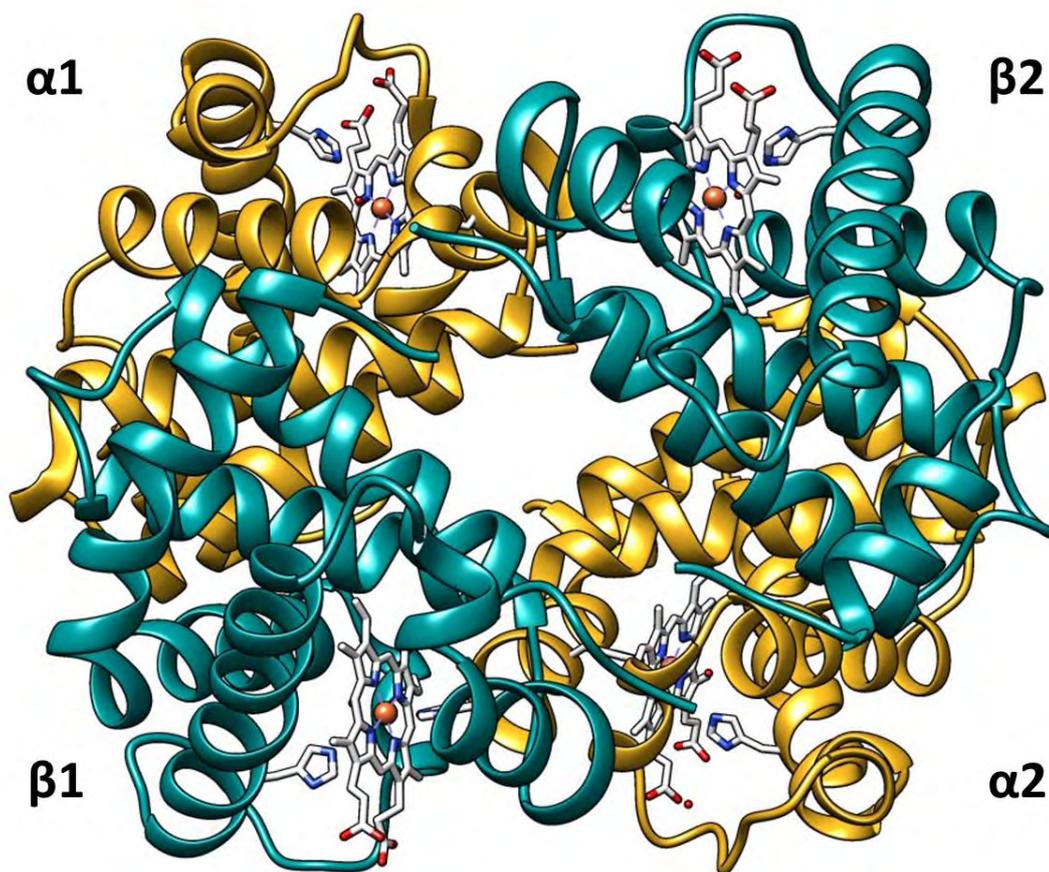


Abbildung 33: **Kristallstruktur des *Xenopus laevis* Hämoglobins.** Typisches tetrameres Hämoglobin, welches aus zwei α -Untereinheiten (gelb) und zwei β -Untereinheiten (petrol) aufgebaut ist. Jede der Untereinheiten trägt ein Häm (weiß), welches in der Met-Form vorliegt. Das Hämoglobin liegt im R-Zustand vor.

Tabelle 18: RMSD-Unterschiede zwischen den verschiedenen Beladungszuständen des humanen Hbs und dem HbXI

Zustand	pdb	Organismus	RMSD (Å)	Atompaare
T	1A3N	Mensch	2,549	567
R	1HHO	Mensch	1,326	569
	1LJW	Mensch	1,263	569
	1HBR	Huhn	1,102	568
R2	1BBB	Mensch	2,090	569
RR2	1MKO	Mensch	1,574	569
R3	1YZI	Mensch	2,916	569

Das HbXI besitzt zu 49% andere Aminosäuren als das humane Hämoglobin, welches als Referenz für das *Molecular Replacement* diente. Trotzdem bildet das HbXI eine nahezu identische Quartärstruktur aus. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit den Aminosäuren, welche diese beiden Hämoglobine voneinander unterscheidet.

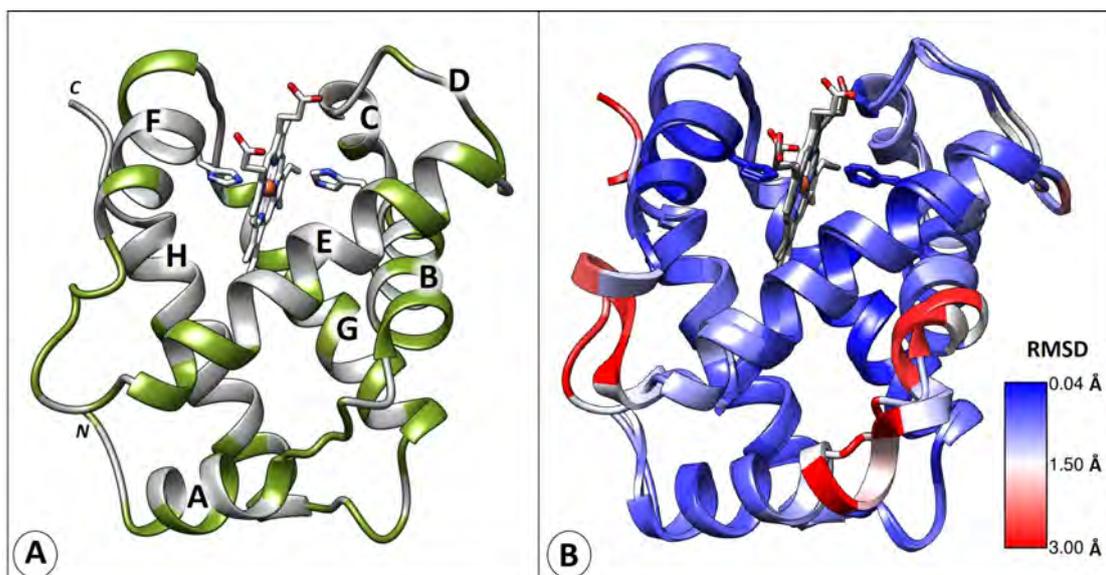


Abbildung 34: **Kristallstruktur der α -Untereinheit des HbXI.** **A:** Die Untereinheit besitzt die typische helikale Struktur und trägt eine Hämgruppe (weiß). Die 61 Aminosäuren, welche von der Sequenz des humanen Hämoglobins abweichen und im Zuge des Refinements ausgetauscht wurden, sind grün eingefärbt. **B:** Lokale RMSD-Unterschiede der c_{α} -Atome des HbXI (abgerundete Struktur) im Vergleich zur menschlichen α -UE (eckige Struktur, pdb: 1HHO). Beide Strukturen wurden entsprechend des RMSD-Wertes eingefärbt. Konservierte Bereiche sind blau und abweichende AS weiß (1,5 Å) bzw. rot (> 1,5 Å) eingefärbt.

α -Untereinheit: Abb. 34 und Tab. 19 verdeutlichen die Veränderungen in der α -UE des HbXI im Vergleich zum humanen Hb. Abb. 34A zeigt die 61 Aminosäuren die im Verlauf des Refinements ausgetauscht wurden (grün). Abb. 34B zeigt die lokalen RMSD-Werte der c_{α} -Atome des HbXI (abgerundete Struktur) im Vergleich zum humanen Hb (eckige Struktur, pdb: 1HHO). Blau eingefärbte Strukturelemente zeigen konservierte Bereiche, die nur max. 1 Å voneinander entfernt liegen. Dies ist besonders in der Umgebung der Hämgruppe der Fall und auch die Position der meistens Helices weicht nicht von der Referenzstruktur ab, weshalb die unterschiedliche graphische Darstellung der Strukturen an diesen Stellen nur schwer sichtbar ist.

Leichte Abweichungen treten an den Enden einiger Helices und in Loop-Bereichen auf (weiß, 1,5 Å). Hohe RMSD-Unterschiede (rot, >1,5 Å) befinden sich z.B. am C-terminalen Ende, allerdings sind Abweichungen der terminalen Enden zwischen Kristallstrukturen, aufgrund ihrer hohen Flexibilität, nichts Ungewöhnliches.

Tabelle 19: **AS-Sequenzunterschiede der α -Untereinheit zwischen humanem Hb und HbXI**

Nr.	Hb human	HbXI	Nr.	Hb human	HbXI	Nr.	Hb human	HbXI
1	Val	Leu	39	Thr	Lys	89	His	Tyr
4	Pro	Ala	45	His	Ser	90	Lys	Asp
5	Ala	Asp	48	Leu	Phe	96	Val	Gly
8	Thr	Ala	49	Ser	His	99	Lys	Pro
9	Asn	His	51	Gly	Asn	102	Ser	Ala
10	Val	Ile	53	Ala	Lys	104	Lys	Ala
13	Ala	Ile	56	Lys	Ser	105	Leu	Ile
14	Trp	Met	57	Gly	Ala	108	Thr	Val
15	Gly	Pro	63	Ala	Val	109	Leu	Val
16	Lys	Ala	67	Thr	Asn	111	Ala	Met
17	Val	Ile	68	Asn	Glu	112	His	Asn
18	Gly	Ala	70	Val	Ser	113	Leu	Phe
21	Ala	Gly	71	Ala	Asn	115	Ala	Lys
22	Gly	Asp	73	Val	Leu	116	Glu	Gln
23	Glu	Lys	75	Asp	Asn	118	Thr	Asp
24	Tyr	Phe	76	Met	Ile	121	Val	Thr
26	Ala	Gly	77	Pro	Ala	123	Ala	Lys
30	Glu	Tyr	78	Asn	Gly	124	Ser	Ala
34	Leu	Ile	79	Ala	Ser	131	Ser	Thr
35	Ser	Val	80	Leu	Met			
36	Phe	Asn	82	Ala	Lys			

Interessant ist die hohe Abweichung an den Positionen $\alpha 73$ bis $\alpha 79$. Es handelt sich dabei um einen Loop, jedoch sollte hier eigentlich Helix F beginnen. Vermutlich wird die Nukleation der Helix durch das Asparagin α Asn75, da es helixbrechende Eigenschaften

besitzt. Auch der hohe RMSD-Wert im Loop zwischen Helix A und B ist auf solch einen Austausch zurückzuführen. Es handelt sich um ein Prolin an Position $\alpha 15$, welches einen verfrühten Abbruch von Helix A herbeiführt. Es handelt sich hier um die in Kapitel 3.3.4 und Abbildung 28 beschriebene Region, welche neu in die Differenzdichte eingepasst werden musste, da eine zu große Abweichungen zwischen der Ausgangsstruktur und der gemessenen Elektronendichte bestand. Die Unterschiede in diesem Bereich sowie eine eventuelle Salzbrücke an Position $\alpha 22$ (siehe Kapitel 3.3.6) führen vermutlich zum hohen RMSD-Wert zu Beginn von Helix B. Sie ist im Vergleich zur Struktur des menschlichen Hämoglobins in Richtung Helix D verschoben.

β -Untereinheit: Abb. 35 und Tab. 20 verdeutlichen die Veränderungen in der Struktur der β -UE. Abb. 35A zeigt die 80 AS, die im Verlauf des Refinements ausgetauscht wurden (violett). Ebenso wie bei der α -UE bildet sich auch hier eine nahezu identische Quartärstruktur aus. Abb. 35B zeigt die lokalen RMSD-Werte der c_{α} -Atome des HbX1 (abgerundete Struktur) im Vergleich zum humanen Hb (eckige Struktur, pdb:1HHO).

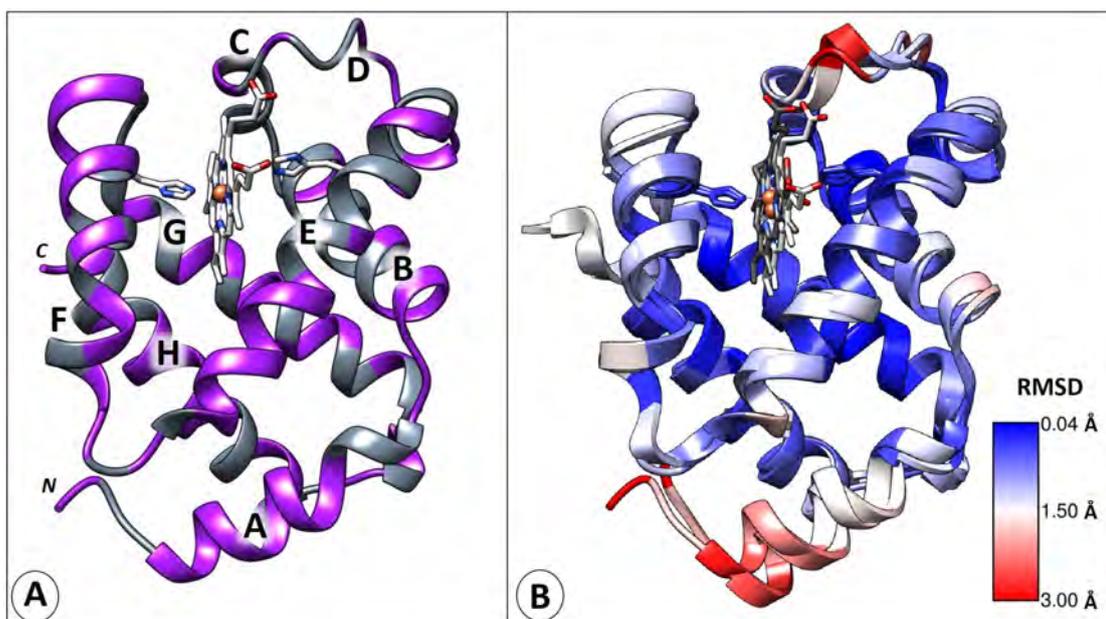


Abbildung 35: **Kristallstruktur der β -Untereinheit des *Xenopus*-Hämoglobins.** **A:** Die Untereinheit besitzt die typische helikale Struktur und trägt eine Hämgruppe (weiß). Die 80 Aminosäuren welche von der Sequenz des menschlichen Hämoglobins abweichen und im Zuge des Refinements ausgetauscht wurden sind violett eingefärbt. **B:** Lokale RMSD-Unterschiede der c_{α} -Atome des HbX1 (abgerundete Struktur) im Vergleich zur menschlichen α -Untereinheit (eckige Struktur, pdb:1HHO). Beide Strukturen wurden entsprechend des RMSD-Wertes eingefärbt. Konservierte Bereiche sind blau und abweichende AS weiß (1.5 Å) bzw. rot (über 3 Å) dargestellt.

Blau eingefärbte Bereiche zeigen konservierte Bereiche, die nur max. 1 Å voneinander entfernt liegen. Dies ist besonders in der Umgebung der Hämgruppe der Fall und auch die Position der meistens Helices weicht nur minimal von der Referenzstruktur ab (weiß, 1,5 Å), weshalb an diesen Positionen die unterschiedliche graphische Darstellung des Strukturen nur bei genauem Hinsehen deutlich wird.

Tabelle 20: **AS-Sequenzunterschiede der β -Untereinheit zwischen humanem Hämoglobin und HbXI**

Nr.	Hb human	HbXI	Nr.	Hb human	HbXI	Nr.	Hb human	HbXI
1	Val	Met	55	Met	Phe	104	Arg	Lys
2	His	Gly	56	Gly	His	105	Leu	Arg
5	Pro	Ala	58	Pro	Glu	106	Leu	Phe
6	Glu	His	59	Lys	Ala	108	Asn	Gly
7	Glu	Asp	61	Lys	Ala	109	Val	Cys
8	Lys	Arg	65	Lys	Glu	111	Val	Ser
9	Ser	Gln	68	Leu	Val	112	Cys	Ile
10	Ala	Leu	69	Gly	Thr	113	Val	Ala
11	Val	Ile	70	Ala	Ser	116	His	Arg
12	Thr	Asn	71	Phe	Ile	119	Gly	His
13	Ala	Ser	72	Ser	Gly	120	Lys	Glu
14	Leu	Thr	73	Asp	Glu	122	Phe	Tyr
18	Val	Leu	74	Gly	Ala	125	Pro	Glu
19	Asn	Cys	75	Leu	Ile	126	Val	Leu
20	Val	Ala	76	Ala	Lys	127	Gln	His
21	Asp	Lys	78	Leu	Met	131	Gln	Glu
22	Glu	Thr	80	Asn	Asp	132	Lys	His
23	Val	Ile	81	Leu	Ile	133	Val	Leu
25	Gly	Gln	84	Thr	Tyr	134	Val	Phe
33	Val	Trp	85	Phe	Tyr	135	Ala	Asp
34	Val	Thr	87	Thr	Gln	136	Gly	Ala
41	Phe	Tyr	90	Glu	Lys	137	Val	Ile
43	Glu	Ser	91	Leu	Tyr	139	Asn	Asp
47	Asp	Asn	93	Cys	Ser	142	Ala	Gly
49	Ser	Asn	94	Asp	Glu	143	His	Lys
50	Thr	Ser	95	Lys	Thr	144	Lys	Gly
51	Pro	Ala	101	Glu	Leu			

Im Gegensatz zur α -Untereinheit befinden sich diesmal erhöhte Unterschiede am N-Terminus und zu Anfang von Helix A. Dieser Bereich liegt etwas weiter zum Proteininneren geneigt als die Referenzstruktur. Es ist möglich, dass dies durch zwei Salzbrücken zwischen Helix A und Helix H bedingt ist. Auf die Position dieser Salzbrücken (SB 3, 4 und 8) wird im folgenden Kapitel 3.3.6 näher eingegangen. Auch das Alanin an Position β 5 ist hydrophober als das Prolin in der menschlichen Untereinheit, was zur Neigung der Kette ins Proteininnere beitragen kann.

Eine leicht höhere Abweichung befindet sich am Anfang von Helix B. Hier liegt eine frühere Nukleation der Helix vor, vermutlich verursacht durch ein β Lys21, welches das bessere Potential für die Bildung einer α -Helix besitzt als die Asparaginsäure an dieser Stelle in der menschlichen β -Untereinheit (CHOU & FASMAN, 1978).

Eine stärkere Abweichung liegt in Helix C vor. Sie ist stark verkürzt, vermutlich eingeleitet durch ein helixbrechendes Tyrosin an Position β 41. Die anschließend folgenden Serine an den Positionen β 43 und β 44 verhindern ebenfalls eine erneute Ausbildung der Helix und weisen einen hohen RMSD-Wert auf.

3.3.6 Salzbrücken

Kapitel 3.3.4 (S. 61) und Tab. 16 haben deutlich gemacht, dass das HbXl nur eine ca. 50%ige Gesamtsequenzidentität mit dem menschlichen Hämoglobin aufweist. Auch im Vergleich mit Hämoglobinen anderer Tiergruppen ist die Sequenzidentität nicht höher. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht jede veränderte Aminosäure auf ihre Funktion hin untersucht werden kann, soll hier zunächst ein Blick auf die ionischen Bindungen (Salzbrücken) geworfen werden. Dazu wurden die positiv und negativ geladenen Aminosäuren mit Hilfe des Programms **Chimera** markiert und der Abstand zwischen möglichen Bindungspartnern in der Umgebung gemessen. Die Ergebnisse sind Tab. 21 zu entnehmen. Als maximaler Abstand für die Salzbrücke wurden 4 Å angenommen (KUMAR & NUSSINOV, 2002). Abstände knapp über diesem Wert wurden trotzdem in die Tabelle aufgenommen und in Klammern eingefasst. Aufgrund der eher geringen Auflösung der Struktur ist es möglich, dass diese Reste nicht genau platziert werden konnten und der gemessene Abstand einem gewissen Fehler unterliegt und/oder, dass diese Reste sich in einem anderen Beladungszustand näher kommen und eine Salzbrücke ausbilden können.

Die Salzbrücken (SB) in Tab. 21 sind durchnummeriert und im folgenden Text und den dazugehörigen Abbildungen wird, der Übersichtlichkeit wegen, nur noch auf die Nummer der Bindung verwiesen.

Tab. 21 ist zu entnehmen, dass innerhalb der α -UE sechs mögliche Brücken vorkommen, die in α_1 und α_2 den nötigen Abstand aufweisen (SB 2, 5, 6, 7, 9, 10). Es existieren drei Brücken, welche in dieser Kristallstruktur dem Abstandskriterium nur in einer der beiden α -UE genügen (SB 3, 8, 11). In der β -UE existieren fünf Brücken mit dem erforderlichen Abstand in beiden Untereinheiten (SB 14, 15, 16, 17, 26) und acht, bei dem der Abstand nur in einer der beiden β -Untereinheiten erreicht wurde (SB 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27). Zwischen den α und β -Untereinheiten können zwei Salzbrücken ausgebildet werden, welche auch zwischen den äquivalenten Untereinheiten existieren (SB 29 und 31). Insgesamt handelt es sich also um 13 Salzbrücken, die in allen Untereinheiten

existieren. Im Folgenden wird die Position der Bindungen und ihre unmittelbare Umgebung betrachtet um eine Funktion oder eine Auswirkung der SB innerhalb der Struktur ableiten zu können.

Tabelle 21: Mögliche Salzbrücken im HbXI

Untereinheit	Nr	AS 1	AS 2	Distanz UE 1 (Å)	Distanz UE 2 (Å)
α	1	Asp5	His9	(6,67)	(5,48)
	2	Asp6	Lys127	3,75	3,21
	3	Asp22	Lys23	3,20	(8,55)
	4	Asp22	Lys60	(5,50)	(5,98)
	5	Glu27	Arg31	2,98	3,15
	6	Glu27	His50	3,71	2,90
	7	Asp47	His49	2,71	3,10
	8	Asp64	Lys60	3,02	(7,72)
	9	Glu68	His72	3,54	3,33
	10	Asp74	Lys7	3,33	2,48
	11	Asp85	Arg141	2,54	(4,75)
	12	Asp85	Lys139	(4,27)	(5,03)
	13	Asp118	His9	(4,67)	(4,43)
β	14	Asp7	His132	3,487	3,44
	15	Glu26	Arg116	2,86	3,42
	16	Glu26	Arg30	2,92	3,10
	17	Asp52	His56	3,19	3,34
	18	Glu58	Lys21	3,10	(9,00)
	19	Glu65	Lys21	(5,11)	(5,86)
	20	Glu65	Lys66	3,15	(5,08)
	21	Glu73	Lys76	(4,43)	3,95
	22	Glu73	His77	3,65	(4,94)
	23	Asp79	Arg8	(4,84)	3,27
	24	Glu121	His119	3,57	(6,30)
	25	Glu125	His6	2,95	(6,47)
	26	Glu131	His127	2,93	2,57
	27	Asp135	Lys104	(4,89)	2,56
α - β	28	α 2Lys38	β 1Asp99	(4,91)	
α - β	28	α 1Lys38	β 2Asp99		(6,96)
α - β	29	α 1Lys23	β 1Glu120	3,35	
α - β	29	α 2Lys23	β 2Glu120		3,20
α - β	30	α 2Asp94	β 1Arg105	(5,61)	
α - β	30	α 1Asp94	β 2Arg105		(4,75)
α - β	31	α 2His103	β 2Glu131	3,05	
α - β	31	α 1His103	β 1Glu131		2,93

Salzbrücken der α -Untereinheit: Die Salzbrücken 1, 2, 10 und 13 (s. Tab. 21) scheinen die Helix A und somit das N-terminale Ende in Position zu halten (Abb. 36A). Helix A wird dabei zwischen Helix E (SB 10) und Helix H (SB 1, 2, 13) fixiert. Der Abstand zwischen α His9 und α Asp118 (SB 13) liegt dabei nur leicht über dem maximalen Abstand von 4 Å. SB 13 wird vermutlich durch die Nähe des α Asp5 beeinflusst, da es einen Teil der positiven Ladung des α His9 an sich zieht (SB 1).

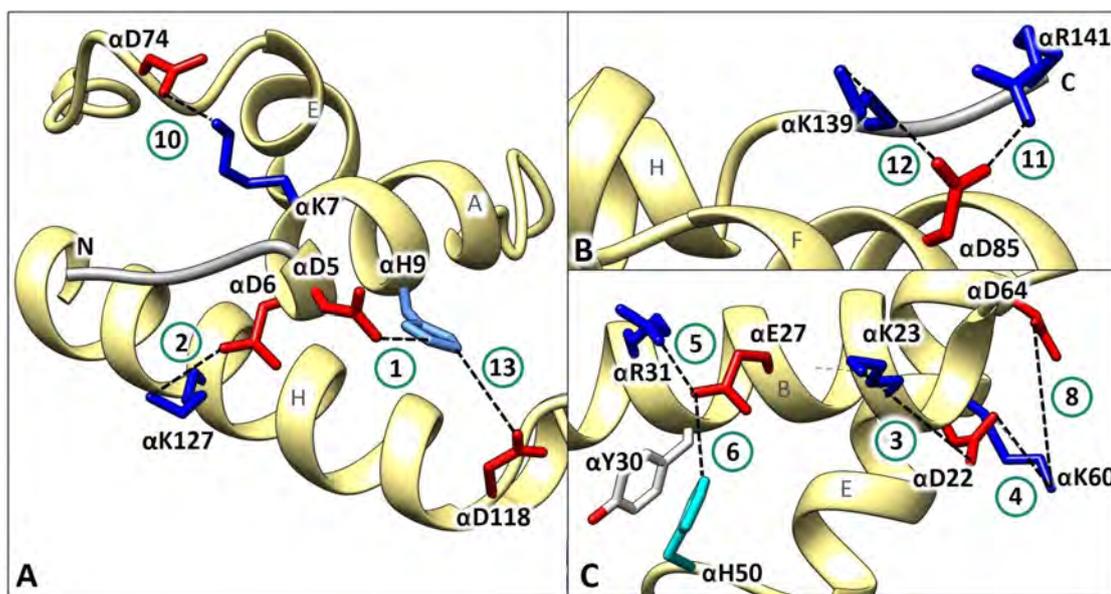


Abbildung 36: **Einige Salzbrücken der α -Untereinheit.** **A:** Die SB mit der Nummer 1, 2, 10 und 13 halten Helix A und somit das N-terminale Ende auf seiner Position. **B:** Auch das C-terminale Ende wird möglicherweise durch die Anziehung gegensätzlicher Ladungen fixiert (SB 11 und 12). **C:** α Glu27 liegt im richtigen Abstand zu α His50 und α Arg31 für die Ausbildung der SB. Die Aminosäuren α Lys23, α Asp22, α Lys60 und α Asp64 befindet sich ebenfalls in ausreichendem Abstand zu einander, jedoch variieren die Abstände innerhalb der zwei α -Untereinheiten. Negativ geladene AS (rot), positiv geladene AS (blau), ionische Bindung (Salzbrücken, gestrichelt). Nummerierung der Salzbrücken grün. Details siehe Tabelle 21.

Auch das C-terminale Ende wird durch solch eine „Dreiecks“-Brücke (SB 11, 12) stabilisiert (Abb. 36B), sowie der Loop D zwischen Helix C und E (SB 5, 6) (Abb. 36C). Abb. 36c zeigt außerdem ein interessantes Wechselspiel zwischen positiven und negativen Ladungen, welche Helix B und E verbinden. Die Abstände zwischen den beteiligten Aminosäuren (s. Tabelle 21) sind alle ausreichend für die Bildung einer ionischen Bindung, jedoch variieren diese Abstände zwischen den beiden α -Untereinheiten stark.

Bei SB 7 und 9 handelt es sich um simple Bindungen, bei denen die Reste in unmittelbarer Nähe nebeneinander liegen und einen Loop (SB 7) oder eine Helix (SB 9) innerhalb des gleichen Strukturelements stabilisieren.

Salzbrücken der β -Untereinheit: Auch in den beiden β -Untereinheiten wird Helix A und somit das N-terminale Ende durch drei ionische Bindungen stabilisiert. Es handelt sich um die SB mit der Nummer 14, 23 und 25 (s. Tabelle 21 und Abb. 37A). SB 14 besitzt den erforderlichen Abstand von $< 4 \text{ \AA}$ in beiden β -UE, während bei 23 und 25 dieser nur in jeweils einer Untereinheit erreicht wird. Die Salzbrücken mit Nummer 15 und 16 besitzen die korrekte Entfernung zueinander obwohl sie sich ein und denselben negativ geladenen Rest (βGlu26) teilen. Diese Dreiecks-Brücke fixiert Helix B und G miteinander (Abb. 37B). Die Bindungspartner von SB 17 sitzen auf einem kurzen Stück Helix auf Loop D. Die SB trägt dabei sicherlich zur Stabilität der Helix bei, jedoch ist unklar ob sie auch maßgeblich zu ihrer Faltung beiträgt (Abb. 37B). Bei den SB 18, 19 und 20 liegt erneut ein ähnliches Wechselspiel der Bindungen vor, wie es schon für die α -Untereinheit beobachtet werden konnte. Es scheint, als ob die Salzbrücken alternierend zwischen den Bindungspartnern ausgebildet sind, weshalb sich auch die Abstände in beiden β -Untereinheiten stark verändern. Bei den Bindungen 21 und 22 handelt es sich um eine Dreiecks-Bindung und die Reste liegen in der Sequenz dicht nebeneinander. Durch diese Bindung erfolgt eine Stabilisierung von Helix E (Abb. 37A).

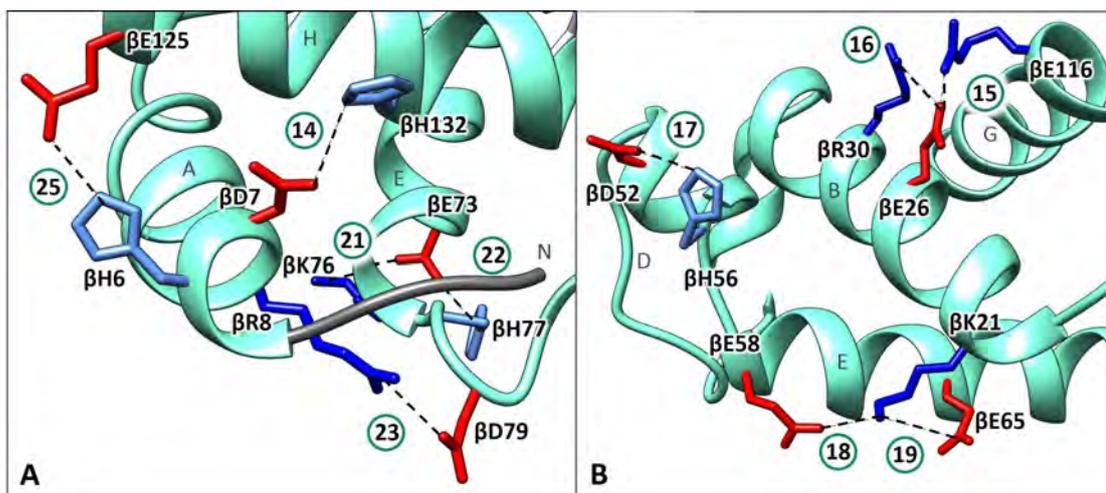


Abbildung 37: **Einige Salzbrücken der β -Untereinheit des HbX1.** **A:** In den beiden β -UE wird Helix A und somit das N-terminale Ende (grau) durch drei ionische Bindungen stabilisiert (14, 23 und 25). Zwischen SB 15 und 16, sowie zwischen 21 und 22 kann eine Dreiecks-Brücke ausgebildet werden. **B:** SB 17 stabilisiert ein kurzes Stück Helix auf Loop D. Die Abstände der SB 18, 19 und 20 variieren innerhalb der beiden β -UE (s. Tabelle 21). Negativ geladene AS (rot), positiv geladene AS (blau), ionische Bindung bzw. SB (gestrichelt). Nicht relevante Strukturelemente entfernt.

Auch die Reste der ionischen Bindung Nummer 24 sitzen eng nebeneinander und stabilisieren den Loop, der von Helix G in H überleitet (Abb. 38). Die Bindung kommt

allerdings nur in einer der beiden β -UE vor. Dies ist auch bei Bindung 27 der Fall, welche eine Brücke zwischen Helix G und H in einer β -UE ausbildet, in der zweiten jedoch nicht. Sie ist in Abb. 39A in einem anderen Kontext zu sehen. Auf die SB Nummer 26 soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden, da der beteiligte Histidinrest ebenfalls eine Bindung zu einer α -UE ausbilden kann.

Salzbrücken zwischen der α - und β -Untereinheit: Tabelle 21 listet vier mögliche Stellen auf, an denen sich Salzbrücken zwischen α - und β -Untereinheiten ausbilden könnten. Nur zwei davon (SB 29, 31) erreichen den erforderlichen Maximalabstand an der äquivalenten Stelle in der Struktur. Da die anderen beiden (SB 28, 30) sich jedoch in der *Switch*-Region befinden, welche bei der Sauerstoffbindung eine besondere Rolle spielt (siehe Kapitel 1.2.3, S. 12), wird hier trotzdem näher auf sie eingegangen.

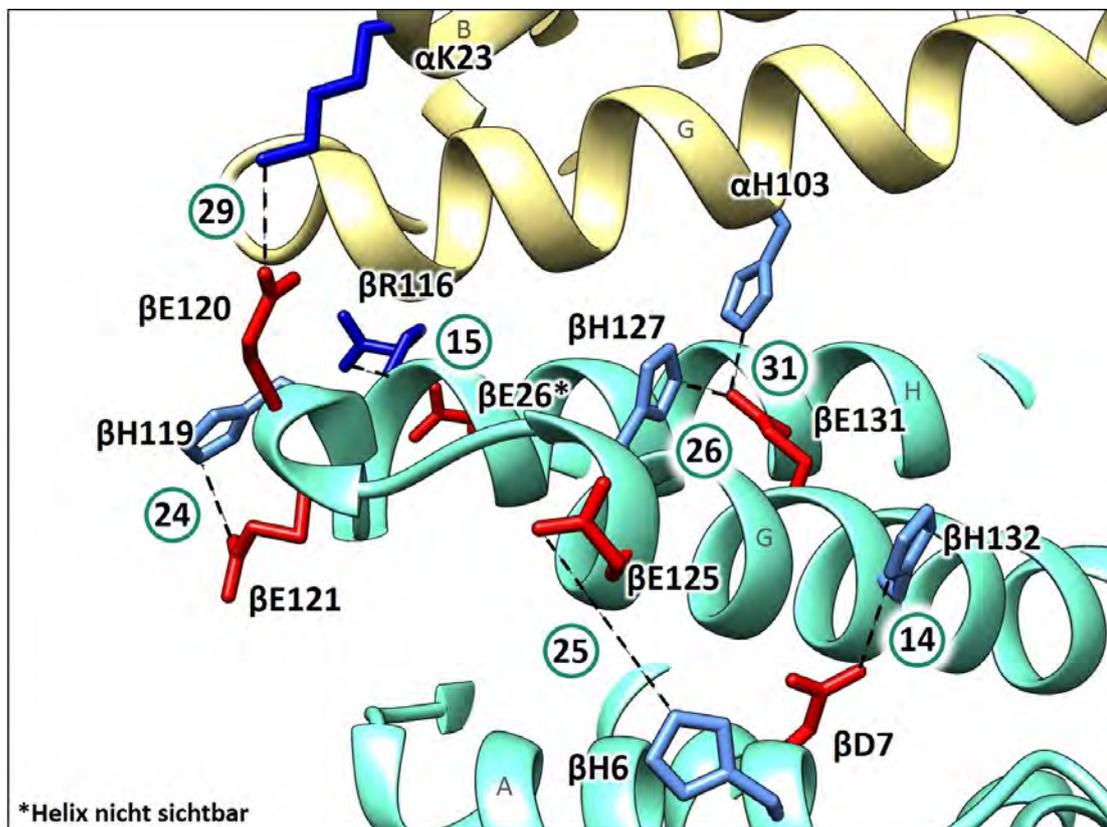


Abbildung 38: **Salzbrücken im $\alpha\beta$ -Interface des *Xenopus laevis* Hämoglobins.** Die SB (gestrichelt) 29 und 31 verbinden α - und β -UE miteinander. Bei SB 31 handelt es sich zusammen mit 26 um einen Bestandteil einer Dreieckbrücke, dessen positive Reste (blau) jeweils ein Histidin darstellen. Auch in der näheren Umgebung dieser Bindestelle befinden sich einige ionische Bindungen, die Histidine als Bindungspartner aufweisen (SB 14, 24 und 25).

Die beiden erstgenannten Salzbrücken befinden sich im Interface zwischen Helix G (SB 31) bzw. Helix B (SB 29) der α -UE und Helix H der β -UE (Abb. 38). Brücke 29 befindet sich am äußeren Rand des Interfaces während SB 31 sich weiter im Inneren der Struktur befindet. Interessant ist, dass es sich bei SB 31 und 26 um eine Dreiecks-Brücke handelt, die zwischen zwei Histidinen und einer Glutaminsäure besteht. Abb. 38 zeigt außerdem die Umgebung dieser beiden Interfacebrücken und es ist hervorzuheben, dass sich in dieser Region fünf ionische Bindungen befinden (SB 14, 24, 25, 26, 31), deren positiver Rest jeweils ein Histidin darstellt. Histidine sind die einzigen Aminosäuren, deren Ladung sich aufgrund des pH-Wertes im physiologischen Bereich ändern kann (BERG ET AL., 2014).

Zwei weitere mögliche ionische Bindungen (SB 28 und 30) zwischen der α - und β -Untereinheit (Abb. 39) befindet sich in der unmittelbaren Umgebung der sog. *Switch*-Region (s. Kapitel 1.2.3, S. 12). Bei beiden konnte der erforderliche Abstand nicht erreicht werden, doch aufgrund der Beweglichkeit dieser Region sollen sie trotzdem analysiert werden.

Als Nächstes soll die SB mit Nummer 30 betrachtet werden. Es handelt sich dabei um eine mögliche SB zwischen den Aminosäuren α Asp94 und β Arg105 statt. Die Abstände betragen 4,8 Å (Abb. 39A) und 5,6 Å (Abb. 39B). Aufgrund der hohen Beweglichkeit der *Switch*-Region, durch die Drehung der beiden Dimere bei Sauerstoffbeladung (s. Kapitel 1.2.1), ist es wahrscheinlich, dass die Bindungspartner ihren Abstand unter anderen Bedingungen vergrößern bzw. verkleinern. Im Falle einer Verkleinerung des Abstands ist die Ausbildung der Salzbrücke möglich. In dieser Kristallstruktur ist dies jedoch nicht der Fall.

Bei Nummer 28 handelt es sich um eine mögliche Salzbrücke zwischen α Lys38 und β Asp99. Im α_2/β_1 -Interface beträgt der Abstand 4,9 Å (Abb. 39B, orange, gestrichelte Linie). Im α_1/β_2 -Interface bildet α Lys38 stattdessen eine Wasserstoffbrücke zu β Ser93 mit einer Länge von 3,0 Å (Abb. 39A, orange, gestrichelte Linie). Der Abstand zu β Asp99 vergrößert sich auf 7,0 Å. Die SB 28 wird vermutlich innerhalb dieser Konformation, in beiden Kontaktflächen der Untereinheiten nicht ausgebildet.

Um auszuschließen, dass es sich bei der unterschiedlichen Orientierung des α Lys38 um einen Modellierungsfehler handelt, wurde die Elektronendichte dieses Restes genauer betrachtet. Abbildung 40A zeigt, dass der Rest des α Lys38 der α_1 -Untereinheit sich in eine andere Richtung neigt als der des Lysins der α_2 -Untereinheit (Abb. 40B). Auch durch die anschließende Erstellung einer OMIT-Map in diesem Bereich zeigte sich keine andere Ausprägung der Elektronendichte. Es handelt sich daher um keinen Modellierungsfehler und dem α Lys38 ist es möglich, je nach Konformation des Hämoglobins, eine Wasserstoffbrückenbindung mit β Ser93 einzugehen.

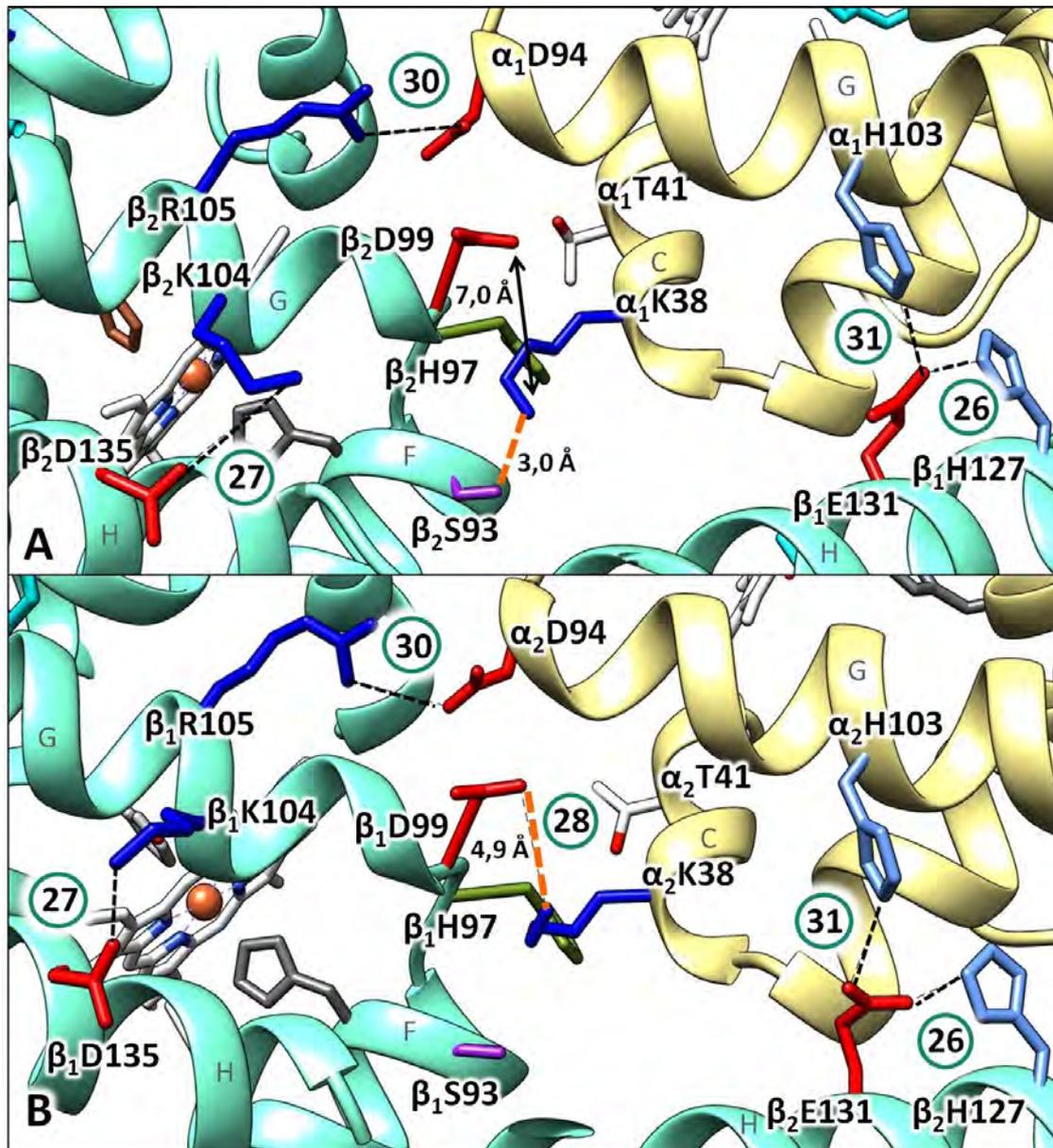


Abbildung 39: *Switch-Regionen* des HbXI. **A:** *Switch-Region* zwischen der α_1 (gelb) und β_2 (türkis) Untereinheit. Das α Lys38 bildet eine Wasserstoffbrücke (orange, gestrichelte Linie) mit β Ser93 (violett) aus. Der Abstand zum negativen β Asp99 ist mit 7 Å zu groß für die Ausbildung einer Salzbrücke. **B:** *Switch-Region* der α_2 - (gelb) und β_1 -Untereinheit (türkis). Der Abstand zwischen α Lys38 und β Ser93 ist diesmal zu groß für die Ausbildung der Wasserstoffbrücke. Stattdessen verringert sich der Abstand zu β Asp99 auf 4.9 Å (orange, gestrichelte Linie)

Beide Kontakte des α Lys38 zur β -Untereinheit stabilisieren den R2-Zustand des Hämoglobins, wobei es unklar ist, wieso es in der $\alpha_1\beta_2$ -*Switch*-Region zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke mit β Ser93 kommt und in der $\alpha_2\beta_1$ -*Switch*-Region nicht. Es ist entweder möglich, dass die Wasserstoffbrücke in der $\alpha_2\beta_1$ -*Switch*-Region generell nicht ausgebildet werden kann, oder dass das Hämoglobin des Krallenfroschs in einem intermediären Zustand kristallisiert ist. Die Ausbildung der zweiten Wasserstoffbrücke wäre daher möglich und würde einen noch stabilisierten R2-Zustand verursachen.

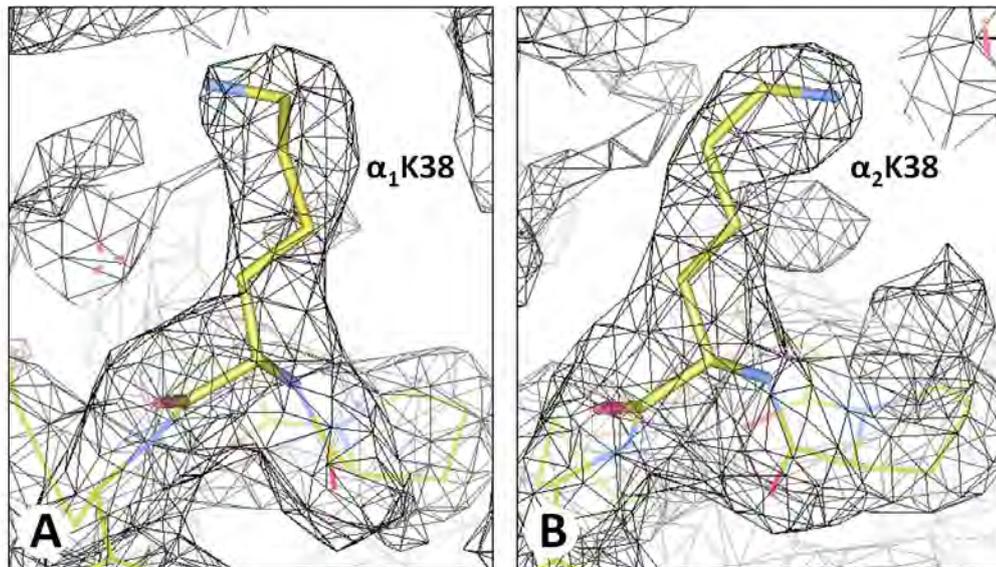


Abbildung 40: **Elektronendichte um Lysin38 in beiden α -Untereinheiten.** Die Differenzdichte des Lysin 38 zeigt, dass es tatsächlich in zwei unterschiedliche Richtungen ausgerichtet ist. Es handelt sich daher um keinen Modellierungsfehler. **A:** Lysin 38 der α_1 -Untereinheit. **B:** Lysin 38 der α_2 -Untereinheit. Kontur der Elektronendichte= $0,5 \sigma$.

Die Aminosäuren β Ser93 und β Asp99 werden innerhalb der Literatur direkt mit dem Root-Effekt der Hämoglobine der Knochenfische in Verbindung gebracht (s. Kapitel 5.6, S. 106). Dieser Zusammenhang und die Bindung zu α Lys38 wird in den Kapiteln 5.4 (S. 101) und 5.6.2 (S. 113) der Diskussion näher betrachtet.

3.3.7 Die 2,3-BPG Bindestelle des HbXl

Abb. 41 zeigt die Bindestelle des 2,3-Biphosphoglycerats (2,3-BPG) in der β_1/β_2 Kontaktfläche im Vergleich zum humanen Hämoglobin (pdb:1B86). Typischerweise wird das 2,3-BPG durch vier Histidine und zwei Lysine in Position gehalten (Abb. 41A, türkis). Beim HbXl sind vier dieser sechs Reste mutiert. $\beta_1\text{His}2$ und $\beta_2\text{His}2$ werden durch Glycine ersetzt und $\beta_1\text{His}143$ und $\beta_2\text{His}143$ durch Lysine. Da Glycin keine Ladung besitzt, wird die Bindungsfähigkeit vermindert. Da Lysin und Histidin beide eine positive Ladung besitzen ist es fraglich, ob der zweite Austausch einen Einfluss auf die Bindung des 2,3-BPGs besitzt. Diese Frage wird in Kapitel 5.3 näher diskutiert.

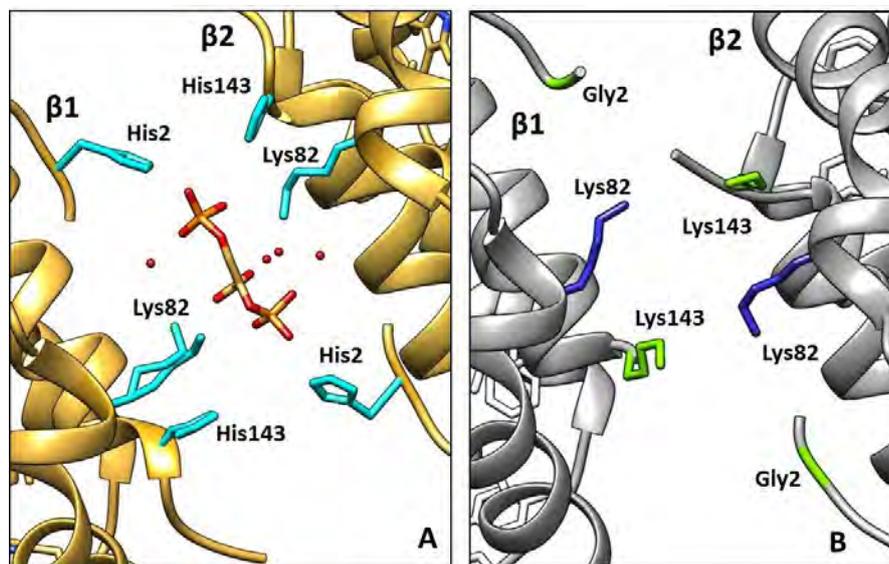


Abbildung 41: **2,3-BPG Bindestellen des HbXl im Vergleich mit humanem Hb.**
A: Die konservierte Bindestelle des 2,3-BPGs mit gebundenem Substrat des humanen Hämoglobins (pdb: 1B86). Sie wird zwischen den beiden β -Untereinheiten gebildet durch die positiven Reste $\beta\text{His}2$, $\beta\text{Lys}82$ und $\beta\text{His}143$ (cyan). **B:** 2,3-BPG Bindestelle des HbXl. Das $\beta\text{His}2$ ist durch einen Glycin und $\beta\text{His}143$ durch ein Lysin ersetzt worden (grün). Die Bindung des Substrates ist nun vermutlich nicht mehr effektiv möglich.

4 Diskussion - *Ceratotherium simum* Hämoglobin (HbCs)

Die Kristallstruktur des Hämoglobins des Breitmaulnashorns *Ceratotherium simum* war bisher unbekannt und wird in diesem Kapitel im Hinblick auf ihre Qualität, den Einfluss der gefundenen Salzbrücken, eine Veränderung in der 2,3-BPG-Bindestelle sowie den Einfluss dieser Veränderung auf die Sauerstoffbindung des Proteins untersucht und in einen übergeordneten Zusammenhang mit bekannter wissenschaftlicher Literatur gesetzt.

4.1 Qualität des Datensatzes

Um die Qualität der Kristallstruktur des HbCS festzustellen, wird diese mit Statistiken der RCSF Protein-Datenbank verglichen (Stand 15.11.2016). So beträgt die durchschnittliche Auflösung aller dort verzeichneten Proteinstrukturen 2,21 Å. Die Struktur des HbCs liegt mit einer Auflösung von 2,1 Å also leicht unter dem Durchschnitt. Ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal einer Kristallstruktur ist der Wert des R_{free} , welcher angibt, wie gut die verfeinerte Struktur mit den Messdaten bzw. der Elektronendichte übereinstimmt. In der RCSB-Protein Datenbank beträgt der durchschnittliche R_{free} 0,24, während die Kristallstruktur des Rhinoceros einen Wert von 0,3 aufweist und so etwas über dem Durchschnitt liegt.

In Kapitel 3.2.4 (S. 46) wurde zur Überprüfung der ϕ - und ψ -Winkel der Struktur ein Ramachandran-Plot erstellt (Abb. 20). Nur zwei der insgesamt 574 Aminosäuren liegen außerhalb der klassischen Winkelkombination ($\beta_1\text{Glu2}$ und $\beta_2\text{Glu2}$). Abb. 42 zeigt das Ergebnis der Strukturvalidation der Software SFCHECK durch einen Bildschirmausschnitt. Bei der Betrachtung der Daten fällt auf, dass es Differenzen zwischen den R-Faktoren des Programms Refmac5 und SFCHECK gibt. Refmac5 bezieht nicht lokalisierte Wassermoleküle in die Berechnung mit ein, während SFCHECK nur Wassermoleküle berücksichtigt die dem Strukturmodell angehören. Die berechneten R-Faktoren von Refmac5 sind aufgrund der Berücksichtigung des diffusen Wassers stets niedriger und es handelt sich dabei um die üblicherweise von Kristallographen angegebene Berechnungsart des R-Faktors.

Da es sich beim HbCs um ein typisches Säugerhämoglobin handelt, wäre es möglich gewesen, dessen Struktur zu simulieren, indem die Aminosäuresequenz auf eine bekannte Kristallstruktur eines verwandten Hbs (z.B. Pferd) übertragen wird (Homologiemodell). Die Gewinnung von Proteinstrukturen über die Kristallstrukturanalyse ist allerdings, wenn möglich, immer einer Homologiemodellierung vorzuziehen. Bei letzterer werden wichtige Informationen über die Lage der Seitenketten der Aminosäuren nicht korrekt wiedergegeben, da sie von der Strukturvorlage kopiert werden. Mit einem Homologiemodell wäre eine Analyse von Salzbrücken und anderen intra- bzw. intermolekularen Bindungen, von denen wichtige Schlüsse auf die Eigenschaften des Proteins gezogen werden können, nicht möglich.

"Judge not, that you be not judged" Bible, Matthew, ch.7

Structure Factor Check

XXXX

Title: THE STRUCTURE OF RHINOCEROS OF METHAEMOGLOBIN AT 2.1 Date: 18-NOV-16 PDB code: XXXX	
<p style="text-align: center;">Crystal</p> Cell parameters: a: 53.00 A b: 119.43 A c: 53.34 A α : 90.00 β : 113.42 γ : 90.00 Space group: P 1 21 1	<p style="text-align: center;">Structure Factors</p> <p>Input</p> Nominal resolution range: 15.7 – 2.10 A Reflections in file: 29557 Unique reflections above 0: 29557 above 1 σ : 29505 above 3 σ : 24300
<p style="text-align: center;">Model</p> 4827 atoms (127 water molecules) Number of chains: 11 Volume not occupied by model: 34.0 % (for atomic model): 17.7 A ² σ (B): 7.75 A ² Matthews coefficient: 2.29 Corresponding solvent % : 45.92	<p style="text-align: center;">SFCHECK</p> Nominal resolution range: 15.7 – 2.10 A <small>\05max. from input data, min. from author\05</small> Used reflections: 29557 Completeness: 83.5 % R_stand(F) = $\langle \sigma(F) \rangle / \langle F \rangle$: 0.048 Anisotropic distribution of Structure Factors ratio of eigen values: 1.0000 0.9908 0.9789 B_overall (by Patterson): 27.A ² Optical resolution: 1.58 A Expected opt. resol. for complete data set: 1.58 A Estimated minimal error: 0.035 A
<p style="text-align: center;">Refinement</p> Program: REFMAC 5.8.0073 Nominal resolution range: 59.7 – 2.10 A Reported R-factor: 0.223 Number of reflections used: 28116 Reported Rfree: 0.30 Sigma cut-off: N.A.	<p style="text-align: center;">Model vs. Structure Factors</p> R-factor for all reflections: 0.254 Correlation factor: 0.875 R-factor: 0.257 for F > 2.0 σ nom. resolution range: 59.71 – 2.10A reflections used: 29505 Rfree: 0.327 Nfree: 1438 R-factor without free-refl.: 0.253 Non free-reflections: 28067 <u> (error in coords by Luzzati plot): 0.294 A Estimated maximal error: 0.137 A DPI: 0.267 A
<p style="text-align: center;">Scaling</p> Scale: 1.002 Bdiff: -1.90 Anisothermal Scaling (Beta): 1.4196 1.2400 1.4156 0.0000 0.5034 -0.0000 Solvent correction – Ks.Bs: 0.900 149.104	

SFCHECK 7.03.24

Abbildung 42: **Ergebnis der Validationssoftware SFCHECK**. Die Abbildung zeigt die erste Seite des Ergebnisses als Bildschirmfoto und beinhaltet alle wichtigen Strukturdaten im Überblick. Die weiteren Daten sind dem Anhang zu entnehmen.

4.2 Einfluss des Austauschs geladener Aminosäuren auf die Struktur des HbCs

An einigen Positionen der Aminosäuresequenz des HbCs befinden sich, im Vergleich zum Hämoglobin des Pferdes (HbEc), einige Aminosäuren, die aufgrund ihrer Ladung Bindungspartner für ionische Bindungen (sog. Salzbrücken) darstellen und somit zur Stabilität des Proteins beitragen könnten. Es wäre somit möglich, dass im Vergleich zum HbEc im HbCs zusätzliche Salzbrücken ausgebildet werden. Es ist aber auch möglich, dass beim HbEc vorhandene Salzbrücken, durch eine Veränderung der Bindungspartner, im HbCs nicht mehr ausgebildet werden. Beides soll im Folgenden betrachtet werden.

Tab. 11 (S. 53) zeigt, dass in der α -Untereinheit des HbEc nur ein geladener Rest existiert, welcher beim HbCs zum Lösungsmittel orientiert (siehe Abb. 22). Betrachtet man die Kristallstruktur des HbEc (pdb: 2MHB), so wäre es möglich, dass α Lys16 eine Salzbrücke zum benachbarten α Asp116 ausbildet, jedoch ist der Abstand mit 4,4 Å zu groß für die Ausbildung dieser Bindung. Die α -Untereinheit des HbCs besitzt dafür ein zusätzliches Histidin an Position α His113, welches eine ionische Bindung mit besagtem α Asp116 eingehen könnte, jedoch ist auch hier der Abstand zu groß. In beiden Fällen sind die Reste auch nicht zueinander orientiert, was dafür sprechen könnte, dass diese Salzbrücken nicht existieren. Die Substitutionen von α Lys16 und α His113 in der α -Untereinheit haben somit vermutlich keinen Einfluss auf die Struktur und aufgrund ihrer Lage auch nicht auf die Sauerstoffbindung des Proteins. In der α -Untereinheit des HbCs liegen sonst keine weiteren Veränderungen von geladenen Aminosäuren im Vergleich zum HbEc vor.

In der β -Untereinheit wurde ebenfalls nur eine geladene Aminosäure durch eine ungeladene ersetzt. Es handelt sich dabei um β Asp121, welches im HbCs ein Glutamin β Gln121 darstellt. Diese Reste sind in beiden Fällen deutlich zum Lösungsmittel orientiert und bilden keine Bindungen aus (siehe Abb. 23, S. 54). Diese Substitution scheint somit vermutlich ebenfalls keinen Einfluss zu haben. Tab. 12 (S. 54) zeigt, dass drei geladene Aminosäuren (β Glu21, β Glu73 und β Arg116) durch solche ausgetauscht wurden, welche ähnliche Ladungen besitzen (β Asp21, β Asp73 und β Lys116), weshalb davon ausgegangen wird, dass diese Änderungen ebenfalls keine signifikanten Änderungen in Form und Funktion verursachen.

An den Positionen β 2 und β 19 besitzt das HbCs geladene Aminosäuren, an denen sich beim HbEc ungeladene Aminosäuren befinden. Es handelt sich um eine negativ geladene Glutaminsäure (β Glu2) und ein positiv geladenes Lysin (β Lys19). Ein Vergleich mit Tab. 13 (S. 55) zeigt, dass diese beiden Reste an der Bildung von Salzbrücken beteiligt sind. β Glu2 bildet eine Brücke mit β Lys8 und dies führt nicht nur zur Stabilisierung des N-Terminus, sondern beeinflusst vor allem die Bindung des Liganden 2,3-BPG im $\beta_1\beta_2$ -Zwischenraum. Dies soll im nächsten Kapitel näher analysiert werden. Die Salzbrücke

zwischen β Lys19 und β Glu22 dagegen stabilisiert zwar Helix B, ist jedoch zum Lösungsmittel ausgerichtet und hat keinen weiteren Einfluss auf die Bindung von Liganden an das Hämoglobin. Die Salzbrücke zwischen α Arg92 und β Asp43, welche die beiden Untereinheitstypen verbindet, ist konserviert und liegt an dieser Position ebenfalls in anderen Hämoglobinen vor. Beim menschlichen Hämoglobin z.B. befindet sich an dieser Stelle eine Salzbrücke zwischen α Arg92 und β Glu43 (Abstand 3,1 Å, siehe pdb:1A3N). Das Fehlen aller weiteren Brücken zwischen den Untereinheiten ist durch den R2-Zustand des Hämoglobins zu erklären (siehe Kapitel 3.2.5, S. 50), da durch die relative Drehung der Dimere gegeneinander die Salzbrücken aufgebrochen werden und in den verschiedenen R-Zuständen nicht existieren (PERUTZ, 1970).

4.3 Die 2,3 Biphosphoglycerat Bindestelle des HbCs

Die Bindestelle des allosterischen Faktors 2,3-BPG (siehe Kapitel 1.2.2, S. 10) wird üblicherweise bei allen Hämoglobinen im *Interface* zwischen den beiden β -Untereinheiten ausgebildet und basiert auf den konservierten Resten β His2, β Lys82 und β His143 (BERG ET AL., 2014). Sie halten aufgrund ihrer positiven Ladung das 2,3-BPG in Position und stabilisieren so den T-Zustand des Proteins (siehe Kapitel 1.2.2, S. 10).

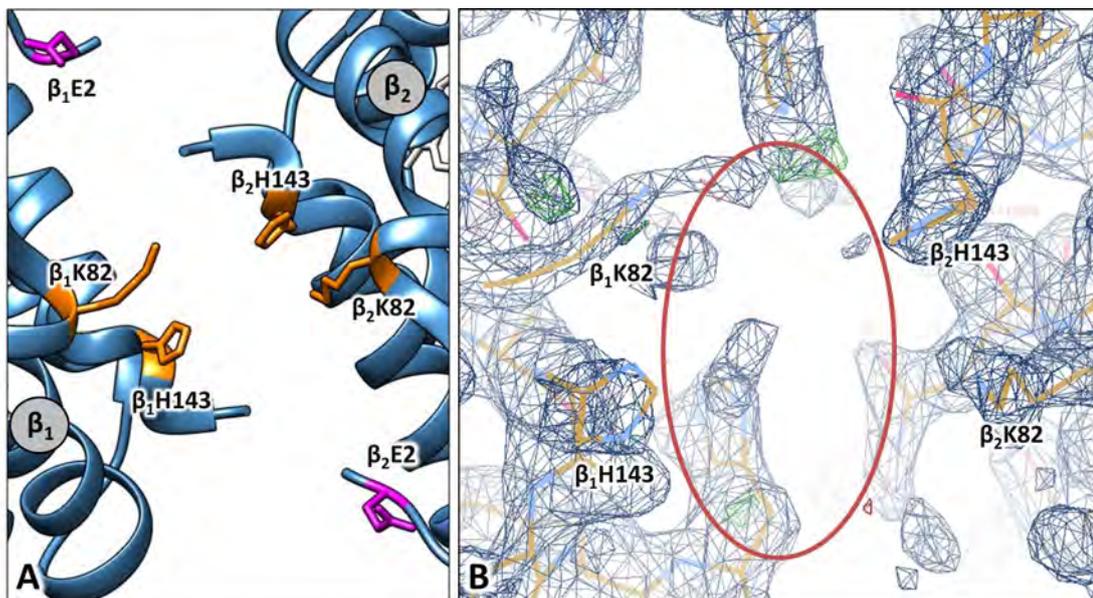


Abbildung 43: **2,3-BPG Bindestellen im Vergleich.** **A:** 2,3-BPG Bindestelle des HbCs. Das β His2 ist durch einen Glutaminsäurerest (magenta) ersetzt worden. Die Bindung des Substrates ist nun nicht mehr, bzw. nicht mehr effektiv möglich. **B:** Elektronendichte (blau) des HbCs (gelb) in der $\beta_1\beta_2$ Kontaktfläche. Sie zeigt keine positive Differenzdichte (grün) an der 2,3-BPG-Bindestelle. Kontur der Elektronendichte = 1,5 σ . Kontur der Differenzdichte = 3,0 σ .

Die Primärstruktur des HbCs weist an der Stelle des β His2 allerdings eine Glutaminsäure (β Glu2) auf (Abb. 43A, magenta), welche negativ geladen ist (MAZUR ET AL., 1982). Eine Bindung des 2,3-BPGs ist nun nicht mehr möglich, was durch (BAUMANN ET AL., 1984) anhand von Sauerstoffbindungskurven gezeigt worden ist.

Die Kristallstruktur des HbCs eröffnet nun erstmals Einblicke in die 2,3-BPG-Bindestasche (Abb. 43B). Zu beachten ist, dass die β -UE in der Kristallstruktur des HbCs verschoben sind, da sie im R2-Zustand vorliegen. Die Bindung des 2,3-BPGs ist nur im unbeladenen T-Zustand möglich. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit keine deoxy-Struktur (T-Zustand) des HbCs angefertigt werden konnte, wurde sie mit Hilfe von **Chimera** simuliert (Abb. 44). Die vier UE des HbCs (gelb) wurden dabei, unabhängig voneinander, auf die entsprechenden UE des humanen deoxy-Hämoglobins (pdb: 1B86, grau) positioniert. Für die Bindung des Effektors sind die Abstände zwischen dem 2,3-BPG und der beteiligten Aminosäuren von Bedeutung.

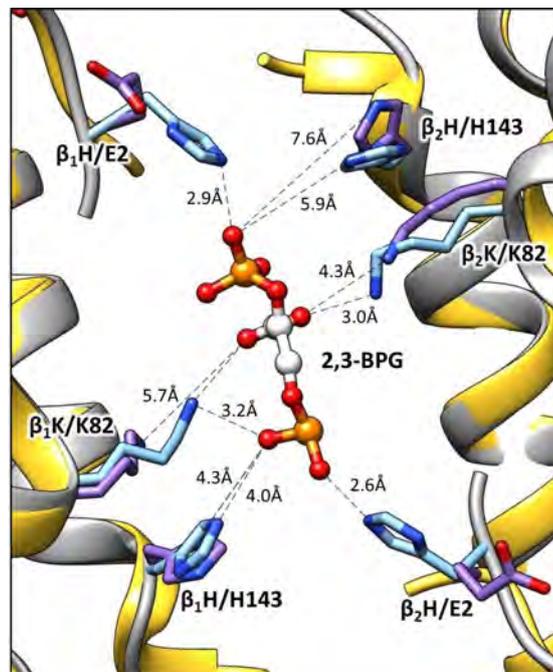


Abbildung 44: **Simulierte deoxy-Struktur der 2,3 BPG-Bindestelle. A:** Die Kristallstruktur des HbCs (gelb) wurde mit Hilfe von **Chimera** an die deoxy Form des humanen Hbs (grau, pdb: 1B86) angepasst um die deoxy-Form des HbCs zu simulieren. Beteiligte AS an der Bindung des 2,3-BPGs: violett = HbCs, hellblau = humanes Hb. 2,3-BPG in CPK Farben. Abstände zwischen den beteiligten AS wurden gemessen (unterbrochene Linien). Bei Abständen unter 4,0 Å handelt es sich um ionische Bindungen, bei Abständen darüber wird keine Bindung ausgebildet. Abstände mit **Chimera** gemessen.

Die Aminosäuren des humanen Hämoglobins (hellblau) bilden dabei mind. fünf Wasserstoffbrückenbindungen, welche den Effektor in Position halten. Der Abstand zwischen β_2 His143 und dem 2,3-BPG ist zu groß für die Bindung, jedoch ist bekannt, dass dieser Rest ebenfalls in die Bindung des Effektors involviert ist (BERG ET AL., 2014). Das fünffach negativ geladene BPG ist also vollständig von positiven Aminosäuren umgeben.

Im Vergleich dazu fehlen dem HbCs zwei Bindungen, da das β Glu2 sich vermutlich aufgrund seiner Ladung vom Effektor abwendet. Der Abstand zwischen den beiden β Lys143 zum Effektor ist zu groß für die Bindung, jedoch ist hier davon auszugehen, dass dies aufgrund der Simulation der Fall sein könnte und sie dazu in der Lage sind, sich in Richtung des Liganden zu orientieren und der Abstand dementsprechend verringert wird.

4.4 Vergleich der Aminosäure an Position $\beta 2$ im Hämoglobin verwandter Arten des Breitmaulnashorns und anderer großer Tiere.

Schon MAZUR ET AL. (1982) vermuteten nach der Analyse der Hämoglobin Sequenzdaten, dass durch den Austausch des β His2 zu einer Glutaminsäure die Bindungsfähigkeit des 2,3-BPG herabgesetzt ist und die Sauerstoffaffinität des *Ceratotherium simum* Hämoglobins hoch sein muss. Später angefertigte Sauerstoffbindungskurven bestätigten diese Thesen und zeigten sogar, dass die Bindung von 2,3-BPG nur minimalen Einfluss auf die Bindung des Sauerstoffs besitzt (BAUMANN ET AL., 1984). Bei dem enormen Gewicht und der Größe des Breitmaulnashorns liegt die Vermutung nahe, dass dies den Transport des Sauerstoffes positiv beeinflusst. Durch die hohe Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird gewährleistet, dass der Sauerstoff im ganzen Körper in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Eine positive Korrelation zwischen Körpergröße und Sauerstoffaffinität wurde schon im Jahre 1958 gezeigt (SCHMIDT-NEILSEN & LARIMER, 1958). Bei Tieren mit sehr hohen Sauerstoffaffinitäten zeigt sich außerdem, dass die Bindungsfähigkeit zu 2,3-BPG reduziert ist (BAUMANN ET AL., 1984). Es stellt sich daher die Frage, ob andere Spezies, in der Größenordnung des Nashorns bzgl. seiner Masse, ebenfalls eine Veränderung in der Position $\beta 2$ aufweisen. Tab. 22 listet einige der in Frage kommenden Tiere und den Aminosäurerest an Position 2 der β -Kette auf.

Die Tabelle zeigt, dass sich die Aminosäure an Position $\beta 2$ tatsächlich stark variieren. Die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D) kommen allerdings nur bei den beiden Nashornspezies und dem Tapir vor. Tapire (Tapiridae) sind neben den Pferden (Equidae) die nächst verwandte Familie der Nashörner (Rhinocerotidae)(TOUGARD ET AL., 2001). Bei Pferd und Zebra liegt ein Glutamin an $\beta 2$ vor und beim Elefant ein Asparagin, welche beide zu den neutralen AS gehören. Beim Wasserbüffel und beim Yak befindet sich an dieser Position ein ungeladenes Leucin. Bei allen anderen Tieren dieser Tabelle liegt das konservierte Histidin vor.

Tabelle 22: Position $\beta 2$ in verwandten Arten des Nashorns und anderen Säugetieren mit einer Körpermasse > 200 kg

Tier	lateinischer Name	AS Position $\beta 2$	Ladung
Breitmaulnashorn	<i>Ceratotherium simum</i>	E	negativ
Panzernashorn	<i>Rhinoceros unicornis</i>	D	negativ
Pferd	<i>Equus caballus</i>	Q	neutral
Zebra	<i>Equus zebra</i>	Q	neutral
Tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	E	negativ
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	N	neutral
Nilpferd	<i>Hippopotamus amphibius</i>	H	positiv
Wasserbüffel	<i>Bubalus bubalis</i>	L	ungeladen
Yak	<i>Bos mutus</i>	L	ungeladen
Pottwal	<i>Physetes catodon</i>	H	positiv
Delphin	<i>Tursiops truncatus</i>	H	positiv
Manatee	<i>Trichechus inunguis</i>	H	positiv
Klippschliefer	<i>Procavia habessinica</i>	H	positiv
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	H	positiv
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	H	positiv

Beim Austausch des positiven $\beta\text{His}2$ in die gegenteilige Ladung, also einem negativ geladenen Aminosäurerest, handelt es sich demnach nicht um eine allgemeingültige Veränderung innerhalb Tierklassen mit großer Körpermasse, sondern er ist eventuell auf die nahe Verwandtschaft zwischen Nashorn und Tapir zurückzuführen. Bei Pferd, Zebra, Elefant, Wasserbüffel und Yak sind an dieser Position allerdings ungeladene Aminosäuren, was ebenfalls auf eine abgeschwächte 2,3-BPG-Bindungseigenschaft dieser Hämoglobine hinweist. Die geringe Stichprobe außer Acht gelassen, lässt sich also mutmaßen, dass die positive Korrelation zwischen Körpergröße und Sauerstoffaffinität (SCHMIDT-NEILSEN & LARIMER, 1958) in Verbindung mit den schlechten 2,3-BPG-Bindungseigenschaften der Hämoglobine stehen könnte.

4.4.1 Die Kristallisation des HbCs im R2-Zustand

Die Hämoglobine der Säugetiere können nach BUNN (1971) in zwei Gruppen eingeteilt werden: Hämoglobine mit einer intrinsisch hohen Sauerstoffaffinität, welche durch das 2,3-BPG herabgesenkt wird und in Hämoglobine, welche eine intrinsisch niedrige Affinität ausweisen und von 2,3-BPG nur wenig beeinflusst werden. Die Hämoglobine des Nashorns, der Pferde und der Kamele lassen sich allerdings zu keiner dieser beiden Gruppen zuordnen, denn sie besitzen von Natur aus eine hohe Sauerstoffaffinität, welche sich durch organische Phosphate nur wenig herabsenken lässt (BAUMANN ET AL., 1984).

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln über die Natur der 2,3-BPG Bindungsschwäche diskutiert wurde, soll nun die hohe Sauerstoffaffinität des HbCs näher betrachtet werden. Überraschend ist in diesem Zusammenhang die Kristallisation des Proteins im R2-

Zustand, da dieser bisher nur in Kristallisationsbedingungen mit niedrigem Salzgehalt gewonnen wurde. Eine Ausnahme dazu bildet die Kristallstruktur des Meerschweinchen Hämoglobins, welches eine Höhenadaptation aufweist (PAIRET & JAENICKE, 2010).

In Kapitel 4.2 (S. 86) wurde schon festgestellt, dass die Aminosäuren, welche das HbEc und das HbCs unterscheiden, keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur des Nashorn-Hämoglobins auszuüben scheinen. Da aber auch das HbEc über eine intrinsisch hohe Sauerstoffaffinität verfügt, wurde anschließend nach Salzbrücken gesucht, die das HbCs und das HbEc voneinander unterscheiden. Die meisten der in Tab. 13 aufgeführten Salzbrücken sind im humanen Hb und im HbEc gleichermaßen konserviert. Tatsächlich existiert nur eine einzige ionische Bindung, die das HbCs und das HbEc aufweisen, das menschliche Hb jedoch nicht. Es handelt sich dabei um die Salzbrücke zwischen der β Glu20 auf Helix E und dem β His69 auf Helix B (Abb. 45A, türkis). Die Helix E wird dadurch ganz leicht in Richtung Helix B und in Richtung des Lösungsmittels verschoben.

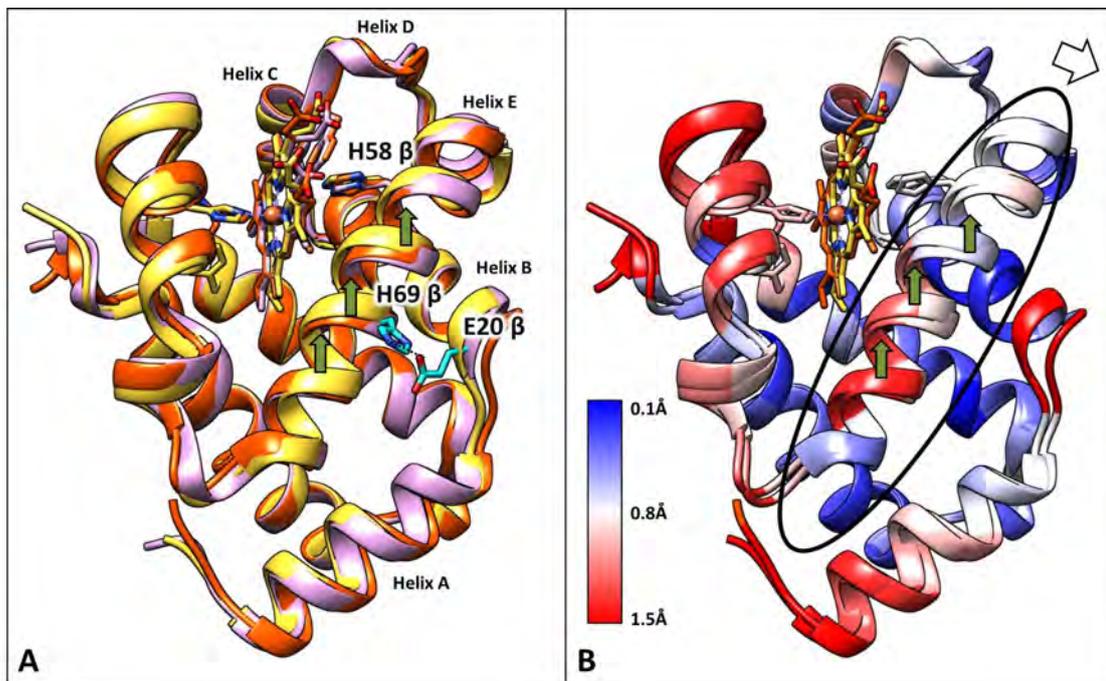


Abbildung 45: β -Untereinheiten des humanen Hbs im T- und R2-Zustand und Position der Salzbrücke β H69- β E20 des HbCs. **A:** Superposition der β -Untereinheit des humanen Hbs im deoxygenierten T-Zustand (gelb, pdb: 1A3N) und oxygenierten R2-Zustand (orange, pdb: 1BBB) und der β -UE des HbCs im R2 Zustand (rosa). Die SB zwischen β His69 und β Glu20 im HbCs (türkis) zieht Helix E in Richtung Helix B (siehe grüne Pfeile) und stabilisiert diese Position. **B:** RMSD-Unterschiede zwischen der T- und R2-Struktur des humanen Hbs. Helix E (eingekreist) wird während der Beladung um ca. 1 Å (weiß) in Richtung des Lösungsmittels (schwarzer Pfeil) und Helix B verschoben (grüne Pfeile).

Vergleicht man nun die Positionsänderung der β -Untereinheit durch den Übergang vom unbeladenen T-Zustand des humanen Hbs (Abb. 45A, gelb, pdb: 1A3N) in den beladenen, affinen R2-Zustand des humanen Hbs (orange, pdb: 1BBB), so zeigt sich, dass sich auch hier die Helix E (eingekreist) leicht in Richtung des Lösungsmittels und Helix B verschiebt (grüne Pfeile). Abbildung 45B zeigt dies noch einmal besser veranschaulicht durch Einfärbung anhand des RMSD-Unterschiedes zwischen diesen beiden Zuständen (Helix E eingekreist).

Die Verschiebung (weißer Pfeil) ist zwar mit ca. 1 Å minimal (weiß) und es existieren größere Strukturänderungen auf Tertiärstrukturebene (rot), welche durch den Übergang der Beladungszustände verursacht werden, jedoch sitzt auf Helix E das distale Histidin58, welches unmittelbar an der Sauerstoffbindung der Hämgruppe beteiligt ist. Es ist somit möglich, dass die Salzbrücke zwischen β Glu20 und β His69 den R2 Zustand des HbCs stabilisiert und die höhere Sauerstoffaffinität durch die Verschiebung des distalen His58 ausgelöst wird.

4.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erfolgreich die Kristallstruktur des Hämoglobins aus dem Breitmaulnashorn *Ceratotherium simum* mit einer Auflösung von 2,1 Å, aufgeklärt. Das Hämoglobin befindet sich in seiner met-Form und liegt im R2-Zustand vor. Die Kristallisation des Proteins im R2-Zustand ist unter den genutzten Bedingungen ungewöhnlich und konnte auf eine Salzbrücke zwischen β His69 und β Glu20 zurückgeführt werden, welche den R2-Zustand fixiert. Des Weiteren liefert die Kristallstruktur Einblicke in die 2,3-BPG-Bindestelle und die Veränderung der bindungsbeteiligten Aminosäure β Glu2, welche vermutlich für die hohe Sauerstoffaffinität des Proteins verantwortlich ist (BAUMANN ET AL., 1984; MAZUR ET AL., 1982). Erste Vergleiche mit den Hämoglobinen anderer großer Säugetiere zeigen, dass auch dort Mutationen in der 2,3-BPG Bindestelle vorliegen. Es ist daher legitim zu mutmaßen, dass die von SCHMIDT-NEILSEN & LARIMER (1958) gezeigte Korrelation zwischen Körpergröße und Sauerstoffaffinität in direktem Zusammenhang mit der Mutation der 2,3-BPG-Bindestelle dieser Hämoglobine steht.

5 Diskussion - *Xenopus laevis* Hämoglobin (HbXI)

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist seit Jahrzehnten ein anerkannter Modellorganismus in Medizin und Forschung (CANNATELLA & DE SA, 1993). Angefangen mit dem sogenannten Froschtest, mit dem bis in die 1960er Jahre der Schwangerschaftsfrühtest durchgeführt wurde (ELKAN, 1938) bis zur Vergabe des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2012 an den Japaner Shinya Yamanaka und den Briten John Gurdon für die Entdeckung, dass differenzierte Zellen aus adulten Organismen in Stammzellen zurückverwandelt werden können (GURDON, 1962; TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Die in dieser Arbeit gewonnene Kristallstruktur des Hämoglobins des Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist bis dato die erste und einzige Kristallstruktur eines Hämoglobins einer Amphibie und soll in diesem Kapitel auf ihre Qualität und ihre strukturellen Eigenschaften hin untersucht und in den Kontext bereits bekannter wissenschaftlicher Literatur gesetzt werden.

5.1 Qualität der Messdaten und der Kristallstruktur

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Kristallstruktur des Hämoglobins aus dem adulten Krallenfrosch *Xenopus laevis* (HbXI) ermittelt. Das tetramere Protein besteht aus zwei Dimeren, welche sich wiederum aus einer α -Untereinheit des Typs HBA1 und einer β -Untereinheit des Typs HBB1 zusammensetzen. Es ist erstaunlich, dass bisher noch keine Kristallstruktur des Hämoglobins des Krallenfroschs *Xenopus laevis* existierte, da es sich beim Krallenfrosch um einen bekannten Modellorganismus handelt. Vermutlich schreckte die hohe Anzahl an Hämoglobin-Isoformen in den Anuren die Kristallographen ab, da dieser Isomorphismus die Kristallisation erschwert.

Zunächst wurde die Kristallisation mit Hämoglobin aus gewaschenen und anschließend aufgebrochenen Erythrozyten begonnen. Bei dieser Probe handelte es sich somit um einen Pool aus verschiedenen Isoformen. Trotz des Isomorphismus war die Kristallisation des tetrameren Proteins erfolgreich und es konnte auf eine Trennung der einzelnen Isoformen durch z.B. säulenchromatographische Schritte verzichtet werden. Nach der Ermittlung der Kristallstruktur ergaben sich allerdings Schwierigkeiten bei der Zuordnung der bekannten Aminosäuresequenzen. Die Isoformen der α -Untereinheit HBA 3,4 und 5 konnten schnell ausgeschlossen werden, da es sich dabei um α -Untereinheiten aus Krallenfroschlarven handelt (BANVILLE & WILLIAMS, 1985). Die Zuordnung zu HBA1 oder HBA2, welche in adulten Tieren vorkommen, ist anhand der gemessenen Elektrodendichte nicht möglich. Da es sich bei HBA1 um die häufigere Isoform handelt (KAY ET AL., 1983), wird bei der Verfeinerung der Kristallstruktur von dieser Isoform HBA1 der α -Untereinheit ausgegangen. Klarheit darüber soll ein Massenspektrum des Proteinkristalls liefern, dessen Ergebnis in diese Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr

einfließt. Im Falle der β -Untereinheit konnte die Untereinheit der HBB1 Sequenz zugeordnet werden. Auch dies soll durch Massenspektroskopie endgültig bestätigt werden. Die Länge der beiden Aminosäureketten unterscheidet sich mit 141 (α -UE) und 146 Aminosäuren (β -UE) nicht von der des menschlichen Hbs und anderen typischen Hämoglobinen. Das Methionin an erster Stelle der Hb-Sequenzen wurde nicht mitgezählt, da es sich dabei um das Startcodon handelt.

Die ermittelte Kristallstruktur des HbXL besitzt eine Auflösung von 2,7 Å und einen R_{free} von 0,28 (Abb. 46). Die durchschnittliche Auflösung von Proteinstrukturen in der RCSB Protein Datenbank beträgt 2,21 Å und der durchschnittliche R_{free} beläuft sich auf 0,24 (Stand 15.11.2016). Es ist dabei wichtig zu bemerken, dass der R_{free} dabei mit der Auflösung korreliert: je schlechter die Auflösung, desto höher ist auch der R_{free} . Gründe für die Schwierigkeiten der Kristallisation des Proteins waren die geringen Mengen vorhandener Blutproben und die physikalisch-chemische Veränderung der aufgereinigten Hämoglobine, welche im Laufe der Experimente immer häufiger in den Kristallisationslösungen und später auch in der Stammlösung ausfielen (siehe Kapitel 3.3.1, S. 56). Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der Validation des HbXL auf der Basis der Validationssoftware **SFCHECK** und fasst nochmal alle wichtigen Strukturdaten zusammen. Bei der Betrachtung der Daten fällt auf, dass es Differenzen zwischen den R-Faktoren des Programms **Refmac5** und **SFCHECK** gibt. Refmac5 bezieht nicht lokalisierte Wassermoleküle in die Berechnung mit ein, während **SFCHECK** nur Wassermoleküle berücksichtigt die dem Strukturmodell angehören. Die berechneten R-Faktoren von **Refmac5** sind aufgrund der Berücksichtigung des diffusen Wassers stets niedriger und es handelt sich dabei um die üblicherweise von Kristallographen angegebene Berechnungsart des R-Faktors.

Die Gewinnung einer Kristallstruktur ist wenn möglich einer Homologiemodellierung immer vorzuziehen, da bei letzterer wichtige Informationen über die Lage der Seitenketten der Aminosäuren nicht korrekt wiedergegeben werden, weil sie von der Strukturvorlage dupliziert werden. Dies ist z.B. wichtig bei der Analyse von Salzbrücken und anderen intra- bzw. intermolekularen Bindungen, von denen wichtige Schlüsse auf die Eigenschaften des Proteins gezogen werden können. Im Falle des HbXL handelt es sich dabei um die Sauerstoffaffinität und den Root-Effekt.

"Judge not, that you be not judged" Bible, Matthew, ch.7

Structure Factor Check

Title: STRUCTURE OF XENOPUS LAEVIS METHAEMOGLOBIN AT 2.7 Date: 16-NOV-16 PDB code:	
Crystal Cell parameters: a: 53.16 A b: 66.83 A c: 79.01 A α : 90.00 β : 92.30 γ : 90.00 Space group: P 1 21 1	Structure Factors Input Nominal resolution range: 24.5 – 2.70 A Reflections in file: 15297 Unique reflections above 0: 15297 above 1 σ : 15158 above 3 σ : 11056 SFCHECK Nominal resolution range: 24.5 – 2.70 A 05max. from input data, min. from author05 Used reflections: 15297 Completeness: 99.6 % R_stand(F) = $\langle \sigma(F) \rangle / \langle F \rangle$: 0.106 Anisotropic distribution of Structure Factors ratio of eigen values: 0.9950 1.0000 0.9769 B_overall (by Patterson): 37.A ² Optical resolution: 1.93 A Expected opt. resol. for complete data set: 1.93 A Estimated minimal error: 0.080 A
Model 4671 atoms (15 water molecules) Number of chains: 9 Volume not occupied by model: 28.2 % $\langle B \rangle$ (for atomic model): 31.1 A ² $\sigma(B)$: 12.13 A ² Matthews coefficient: 2.14 Corresponding solvent % : 42.19	Model vs. Structure Factors R-factor for all reflections: 0.259 Correlation factor: 0.854 R-factor: 0.261 for $F > 2.0\sigma$ nom. resolution range: 78.95 – 2.70A reflections used: 15158 Rfree: 0.332 Nfree: 766 R-factor without free-refl.: 0.258 Non free-reflections: 14392 $\langle u \rangle$ (error in coords by Luzzati plot): 0.363 A Estimated maximal error: 0.242 A DPI: 0.425 A Scaling Scale: 0.931 Bdiff: -5.75 Anisothermal Scaling (Beta): 0.4349 0.4506 0.3715 -0.0000 -0.0193 -0.0000 Solvent correction – Ks,Bs: 0.802 250.013
Refinement Program: REFMAC 5.8.0073 Nominal resolution range: 78.9 – 2.70 A Reported R-factor: 0.204 Number of reflections used: 14528 Reported Rfree: 0.28 Sigma cut-off: N.A.	

SFCHECK: 7.00.34

Abbildung 46: **Validation des HbXL mittels SFCHECK.** Die Abbildung zeigt die erste Seite des Ergebnisses als Bildschirmfoto und beinhaltet alle wichtigen Strukturdaten im Überblick. Die weiteren Daten sind dem Anhang zu entnehmen.

5.2 Haltbarkeit des HbXl

Die Kristallisation des *Xenopus laevis* Hämoglobins (HbXl) konnte nicht weiter verbessert werden, da die Protein-Stammlösung nach einigen Wochen nicht mehr in die üblichen Kristallisationsbedingungen überführt werden konnte, ohne dass das Protein ausfiel (siehe Kapitel 3.3.1, S. 56). In der Stammlösung selbst zeigte sich, trotz der hohen Konzentration (60 mg/ml), zunächst kein Niederschlag und das Absorptionsspektrum wies keine Auffälligkeiten auf. Nach einigen Monaten wurde jedoch auch die Stammlösung trüb und dickflüssig, was ungewöhnlich ist, da gereinigtes Hämoglobin üblicherweise eine sehr gute und lange Haltbarkeit aufweist. Dies konnte im Rahmen dieser Dissertation durch den Umgang mit Nashorn und menschlichem Hämoglobin bestätigt werden. Da das Protein dieses Löslichkeitsverhalten nicht von Anfang an gezeigt hat, ist die Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des HbXl ein zeitliches Problem. Vermutlich hatte die Lagerung des Proteins und die hohe Konzentration der Stammlösung einen negativen Effekt auf die Stabilität des Hämoglobins, sodass es bei physikalischem Stress, z.B. der Überführung in die Kristallisationsbedingungen, zerstört wurde. Im folgenden Unterkapitel wird daher zunächst auf die Oberflächenbeschaffenheit des Proteins eingegangen, welche einen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins ausübt. In einem weiteren Unterkapitel wird die Existenz einer Disulfidbrücke diskutiert, die für eine Zusammenlagerung der Tetramere verantwortlich sein könnte. Die Zusammenlagerung durch Disulfidbrücken zu Oktameren wurde schon von PERUTZ & BRUNORI (1982) und BRUNORI ET AL. (1987) erwähnt.

5.2.1 Hydrophober Charakter des HbXl

Die Aminosäuren an den Außenseiten des Proteins bestimmen die Löslichkeit des Moleküls im polaren Lösungsmittel, üblicherweise wässriger Natur. Proteine die frei in der Zelle vorliegen sind meist globulär aufgebaut und besitzen hydrophile Aminosäuren an ihrer Oberfläche wie z.B. Threonin, Glutamin und Serin. Die Oberfläche von Membranproteinen, die fest in der Lipidmembran verankert sind, bestehen dagegen aus hydrophoben Aminosäuren wie z.B. Phenylalanin, Leucin und Valin (TAN ET AL., 2008).

Es ist möglich, dass größere hydrophobe Flächen auf der Oberfläche die Stabilität des Proteins negativ beeinflussen und somit dessen Löslichkeit herabsetzen. Um dies zu überprüfen wurde der hydrophobe Charakter der Proteinoberfläche des HbXl mit Hilfe des Programms **Chimera** mit der Oberfläche des humanen Hämoglobins verglichen (Abb. 47). Die Einfärbung der Aminosäuren erfolgte nach der Skalierung von KYTE & DOOLITTLE (1982) mit Arginin als hydrophilste Aminosäure (-4,5, blau) und Isoleucin als hydrophobste (4,5, rot). Vergleicht man die beiden Hämoglobine so zeigen sich zwischen dem humanen Hämoglobin (Abb. 47A) und dem HbXl (Abb. 47B) zunächst keine großen Unterschiede.

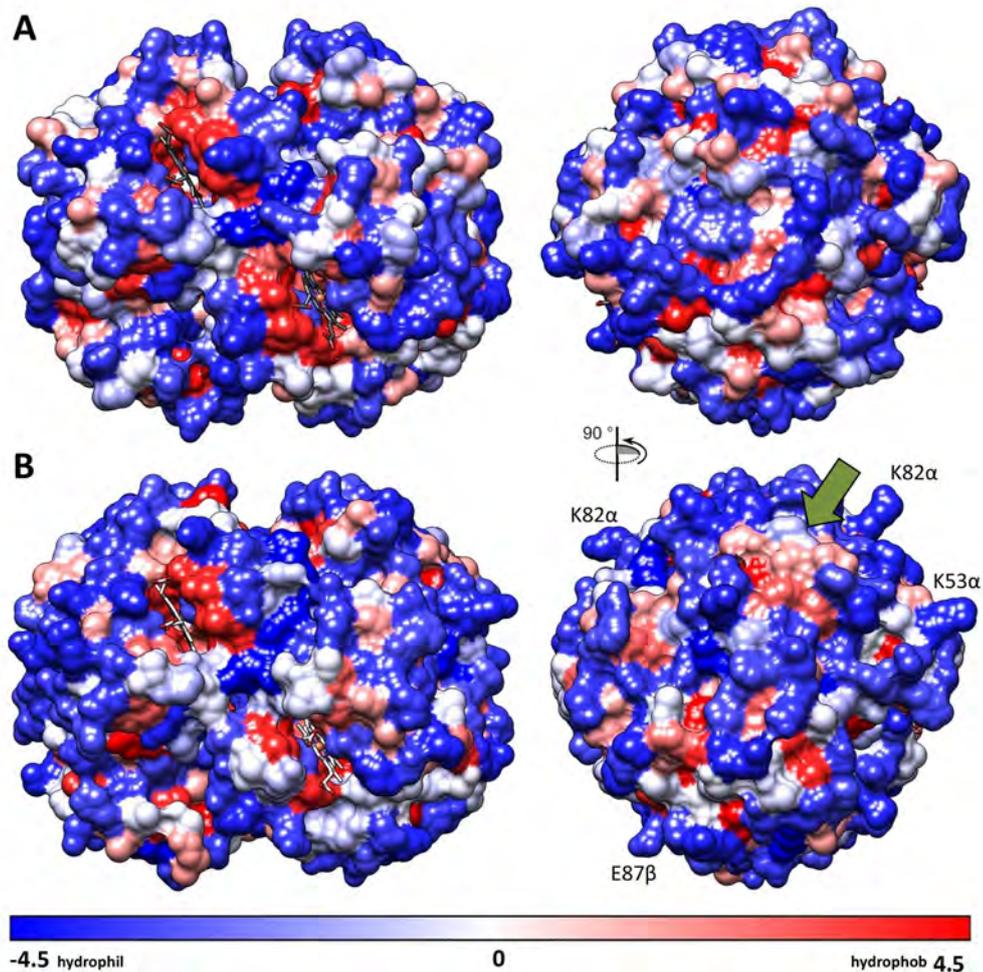


Abbildung 47: **Oberflächenhydrophobizität des HbXL im Vergleich mit humanem Hämoglobin.** Eingefärbt mit Hilfe des Programms **Chimera** nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Hämgruppen in Stick-Darstellung. **A:** Humanes Hämoglobin (pdb: 1HHO, Biologic Assembly) **B:** HbXL. Grüner Pfeil indiziert die größere hydrophobe Fläche.

Der Großteil der auf der Oberfläche lokalisierten Aminosäuren ist hydrophil, was für globuläre Proteine, wie dem Hämoglobin, zu erwarten war. Lediglich um die aktiven Zentren (Stick-Darstellung) befinden sich hydrophobere Zonen.

Auf der Oberfläche des HbXL befindet sich ein größerer hydrophober Bereich (ca. 15 \AA^2) in der Kontaktfläche von Helix A und G der α -Untereinheit (Abb. 47, grüner Pfeil). Ausschlaggebend dafür sind u.a. die Reste α Ile13, α Ala16, α Ile17 und α Phe113. Außerdem verfügt das HbXL über einige, zwar hydrophile, aber langkettige Aminosäuren an der Außenfläche, die beim menschlichen Hb nicht vorliegen. Es handelt sich dabei um α Lys82 und α Lys53 der α Untereinheit. Lysine sind wegen ihrer positiven Ladung potentielle Bindungspartner für Salzbrücken und es ist denkbar, dass diese Aminosäuren

bei einer hohen Konzentration der Proteine, wie z.B. in der Stammlösung (60 mg/ml), in Kontakt mit negativ geladenen Aminosäuren (z.B. mit β Glu87, s. Abb.47B) auf der Oberfläche eines benachbarten Hämoglobins kommen und die Salzbrücke ausgebildet werden kann. Verknüpft sich mit der Zeit eine Vielzahl an tetrameren Hämoglobinen, so könnte dies schlussendlich zum Ausfall der Proteine führen.

5.2.2 Disulfidbrücke als Auslöser einer Polymerisation des HbXI

Bei Disulfidbrücken handelt es sich um kovalente Bindungen zwischen zwei Schwefelatomen. Bei Proteinen werden sie zwischen den Schwefelatomen zweier Cystein-Aminosäuren ausgebildet und liefern einen wichtigen Beitrag zur Faltung und zur Stabilität von Proteinen. Obwohl Hämoglobine durchaus über Cysteine verfügen bilden sie üblicherweise keine intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken aus, was aufgrund der unzugänglichen Position der Cysteine innerhalb des Proteins der Fall ist. Das humane Hb verfügt z.B. insgesamt über ein Cystein pro α -Untereinheit (α Cys104) und zwei Cysteine pro β -Untereinheit (β Cys112, β Cys93). Die Aminosäuren α Cys104 und β Cys112 sind ins Proteininnere geneigt und können aufgrund der Entfernung nicht miteinander interagieren. β Cys93 liegt dagegen eher an der Oberfläche des Proteins, jedoch wird es durch Helix H verdeckt, was die Ausbildung einer Disulfidbrücke verhindert.

Beim HbXI existieren zwei Cysteine pro β -Untereinheit. Es handelt sich dabei um β Cys109, welches ins Proteininnere ragt (Abb. 48, grün) und β Cys19, welches auf Loop AB positioniert ist (magenta). Dieses β Cys19 liegt damit sehr exponiert und flexibel an der Oberfläche des Tetramers. Es ist möglich, dass die β Cys19 Cysteine zweier benachbarter Hämoglobin-Tetramere bei großer räumlicher Nähe eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden (Abb. 48).

Da jedes Tetramer über zwei dieser Bindestellen verfügt, ist somit die Bildung einer langen Hämoglobin-Kette denkbar. Bei BRUNORI ET AL. (1987) wurde nur die Bildung von Oktameren erwähnt. Die Ausbildung dieser langkettigen Hämoglobinpolymere ist dabei abhängig von der Konzentration des Hämoglobins in der Lösung und der Zeit, die benötigt wird um durch Diffusion die richtige Orientierung und räumliche Nähe zu den benachbarten Tetrameren einzunehmen.

Die Bildung dieser Disulfidbindungen ist die wahrscheinlichste Ursache zur schlechten Haltbarkeit des HbXI. Vermutlich führte das Pipettieren der Stammlösung in die Kristallisationsbedingungen zu einer starken Herabsenkung der Löslichkeit dieser langkettigen Hämoglobin-Polymere und führte dort zum sofortigen Ausfall der Proteine. Ein ähnlicher aber langwieriger Prozess fand in der Stammlösung statt, welche mit längerer Standzeit immer dickflüssiger und klumpiger wurde (s. Kapitel 3.3.1, S. 56).

Inwieweit die Fähigkeit der Bildung dieser Hämoglobinpolymere *in vivo* für den Kralenfrosch *Xenopus laevis* ein Problem darstellt, ist unklar. Abb. 48 lässt vermuten, dass

die Sauerstoffbindung der verbundenen Hämoglobine durch die Disulfidbrücke nicht eingeschränkt ist. Die Gelelektrophoresen, welche zu Anfang der Experimente durchgeführt wurden, zeigen, dass die Hämoglobine zu Anfang als Tetramere bzw. kürzere Polymerketten vorliegen (s. Kapitel 3.1 und Abb. 14). Aufgrund der Gelbilder und da das Blut aus vitalen Tieren entnommen wurde, ist eine gesundheitliche Beeinträchtigung des Krallefroschs durch die Polymerisation der Hämoglobine, wie es bei der Sichelzellenanämie des Menschen der Fall ist (BERG ET AL., 2014), unwahrscheinlich. Es wird daher davon ausgegangen, dass dieses Phänomen ein Laborartefakt darstellt und *in vivo* z.B. durch die ständige Erneuerung der Hämoglobine oder andere Effekte verhindert wird.

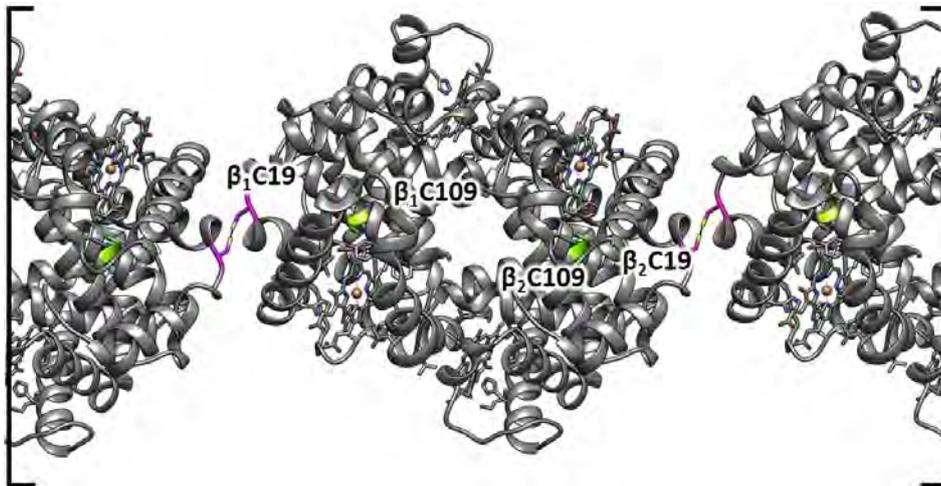


Abbildung 48: **Polymerisation der HbXL-Tetramere durch Disulfidbrückenbindungen.** Durch das exponierte Cystein β Cys19 (magenta) ist die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken möglich. Die Polymerisation, welche die Bildung sehr langer Hämoglobinpolymere möglich macht, ist höchstwahrscheinlich die Ursache für die Überschreitung der Löslichkeitsgrenze des Proteins und somit für die schlechte Haltbarkeit des HbXL verantwortlich.

5.3 Die 2,3-BPG Bindestelle des HbXL und ihr Einfluss auf die O₂-Bindung

In Kapitel 3.3.7 (Seite 83) und Abb. 41 wurde gezeigt, dass das HbXL interessante Veränderungen im Bereich der $\beta_1\beta_2$ -Schnittstelle aufweist (s. Kapitel 1.2.2 der Einleitung, S. 10). Es handelt sich um vier von sechs AS der 2,3-BPG Bindestelle: β_1 His2 zu Gly, β_1 His143 zu Lys und deren Äquivalente in der β_2 -Untereinheit. Es stellt sich also die Frage, ob die Bindung des 2,3-BPG mit diesen Veränderungen überhaupt möglich ist.

Da im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit keine deoxy-Struktur des HbXL angefertigt werden konnte, wurde sie mit Hilfe von **Chimera** simuliert um einen groben Eindruck zu erhalten (Abb. 49A). Dies erfolgte durch eine Superposition der einzelnen Untereinheiten des HbXL (rosa) auf die Untereinheiten des humanen Deoxy-Hämoglobins (pdb: 1B86,

grau). Für die Bindung des Liganden sind dabei die möglichen Abstände zwischen dem 2,3-BPG und der beteiligten Aminosäuren von Bedeutung. Die AS der humanen Hb Struktur (hellblau) bilden dabei mindestens fünf Wasserstoffbrückenbindungen, welche den allosterischen Liganden in Position halten. Der Abstand zwischen β_2 His143 und dem 2,3-BPG ist mit 5,9 Å zu groß für eine ionische Bindung (Abb. 49A), jedoch ist bekannt, dass dieses Histidin in die Bindung des Liganden involviert ist (BERG ET AL., 2014). Das negativ geladene 2,3-BPG ist also vollständig von positiven Aminosäuren umringt.

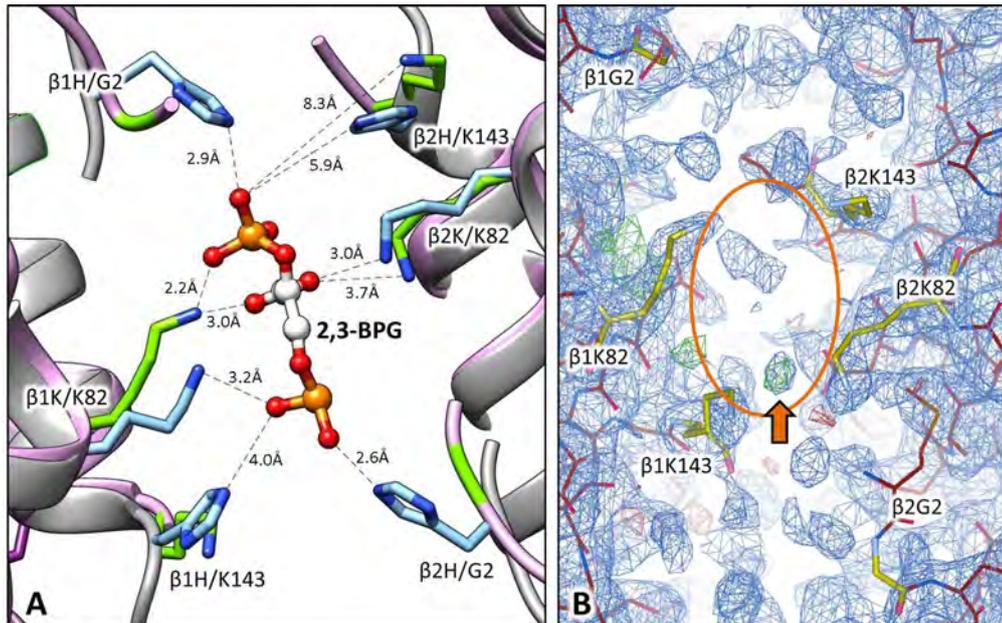


Abbildung 49: **Simulierte deoxy-Struktur der 2,3 BPG-Bindestelle und Elektronendichte der Met-Form.** **A:** Die Hämoglobinstruktur des HbXL (rosa) wurde mit Hilfe von **Chimera** an die deoxy-Form des humanen Hbs (grau, pdb: 1B86) angepasst um dessen deoxy-Struktur zu simulieren. Beteiligte AS an der Bindung des 2,3-BPGs: grün = HbXL, hellblau = humanes Hb. 2,3-BPG in CPK Farben. Bei Abständen (gestrichelt) unter 4.0 Å handelt es sich um Wasserstoffbrückenbindungen. **B:** Elektronendichte (blau, 0,51 σ) der Met-Hb Kristallstruktur (rot) des HbXL. Im zentralen Hohlraum (orangener Kreis) befindet sich keine ausreichend große Differenzdichte (2,99 σ). Lediglich eine kleine ist vorhanden (orangener Pfeil), bei der es sich vermutlich um ein Wassermolekül handelt. gelb = beteiligte AS der 2,3-BPG-Bindung.

Im Vergleich dazu fehlen dem HbXL zwei Bindungen, da das Glycin an Stelle β_2 keine Bindungen ausbilden kann. Die Lysine an Position 143 β des HbXL besitzen allerdings eine stärkere positive Ladung als das dort übliche Histidin, weil ihre Ladung pH-unabhängig ist. Dies verbessert vermutlich die Bindung des BPGs. In der Simulation ist der Abstand zwischen den beiden Lysininen an Position 143 zum Liganden ist jedoch zu groß für

die Bindung. Allerdings ist hier davon auszugehen, dass dies aufgrund der Simulation bedingt ist und sie trotzdem dazu in der Lage sind, sich in Richtung des Liganden zu orientieren und die Bindung einzugehen.

Betrachtet man die Elektronendichte des HbXl (Abb. 49B, blau), so befindet sich an der Bindestelle des BPGs (orangener Kreis) keine positive Differenzdichte (grün), welche auf das Fehlen eines Moleküls hinweisen könnte. Lediglich eine kleine Differenzdichte (orangener Pfeil) ist vorhanden, bei der es sich vermutlich um ein Wassermolekül handelt. Unter ähnlichen Versuchsbedingungen (gleiche Aufreinigung, ebenfalls Met-Zustand) wurde bei TEXTOR (2011) eine erheblich größere positive Differenzdichte beobachtet. Allerdings konnte sie keinem passenden Molekül zugeordnet werden, jedoch wurde die Differenzdichte beschrieben als „zu groß für ein Wassermolekül oder ein Chlorid-Ion, andererseits schien sie aber auch zu klein für ein Phosphatanion“. Das Alpaka-Hämoglobin aus TEXTOR (2011) besaß keine Mutationen im Bereich der 2,3-BPG-Bindestelle und somit eine größere Bindungskraft als das HbXl an dieser Stelle.

Aus diesen Erkenntnissen ist der Schluss zu ziehen, dass 2,3-BPG zwar gebunden werden kann, jedoch aufgrund des Fehlens des β His2 in beiden β -Untereinheiten nicht mehr vollständig von positiven Aminosäuren umringt ist und somit leichter wieder dissoziieren kann. Die Stabilisierung des T-Zustandes sollte dementsprechend abgeschwächt werden und der Einfluss dieses Liganden auf die Sauerstoffaffinität geringer sein als es z.B. beim menschlichen Hb der Fall ist. Tatsächlich haben KISTER ET AL. (1989) dies anhand von Sauerstoffbindungskurven des HbXl gezeigt. Der Effekt von 2,3-BPG und Inositolhexaphosphat (IHP) auf die Sauerstoffaffinität des HbXl war in ihren Versuchen, im Vergleich zum menschlichen Hb, um ca. 50% reduziert. Auch diese Autoren postulierten, dass daran vermutlich das mutierte β Gly2 am Eingang des zentralen Hohlraums der $\beta_1\beta_2$ -Schnittstelle verantwortlich ist (KISTER ET AL., 1989). Diese Annahme kann nun durch die Kristallstruktur des HbXl bestätigt werden.

5.4 Die *Switch*-Region des HbXl

Die *Switch*-Region (Abb. 50A) befindet sich im $\alpha_1\beta_2$ bzw. $\alpha_2\beta_1$ *Interface*, sie ist hochkonserviert und involviert die Aminosäuren α Pro37, α Thr38, α Thr41, α Pro44 der Helix C und das gegenüberliegende β His97 auf Loop FG (BALDWIN & CHOTHIA, 1979). Beim Übergang vom T- in die R-Zustände des Proteins, rotiert das $\alpha_2\beta_2$ Dimer um ca. 15°, was sich in der *Switch*-Region sehr gut verfolgen lässt (BALDWIN & CHOTHIA, 1979).

Abb. 50 zeigt diese Region in der Struktur des HbXl (grün) im Vergleich zu den bisher bekannten Konfigurationen des humanen Hämoglobins: T (dunkelblau, pdb: 2HHB), R (rot, pdb: 1HHO), RR2 (orange, pdb: 1MKO), R2 (hellblau, pdb: 1BBB) und R3 (dunkelgrau, pdb: 1YZI). Die Drehung der β -Untereinheit wird anhand der Position des

β His97 deutlich (SHAANAN, 1983; FERMI & PERUTZ, 1984; ARNONE & SILVA, 1993; SAFO & ABRAHAM, 2002, 2005). Das β His97 verschiebt sich bei der Sauerstoffbeladung vom T- in den R-Zustand und passiert dabei die Aminosäuren α Thr41 und α Thr38 (weiße α -Helix), mit denen es Wasserstoffbrücken bilden kann (SAFO ET AL., 2011). Auf die verschiedenen Zustände und die *Switch*-Region wurde in Kapitel 1.2.3 (S. 12) der Einleitung näher eingegangen.

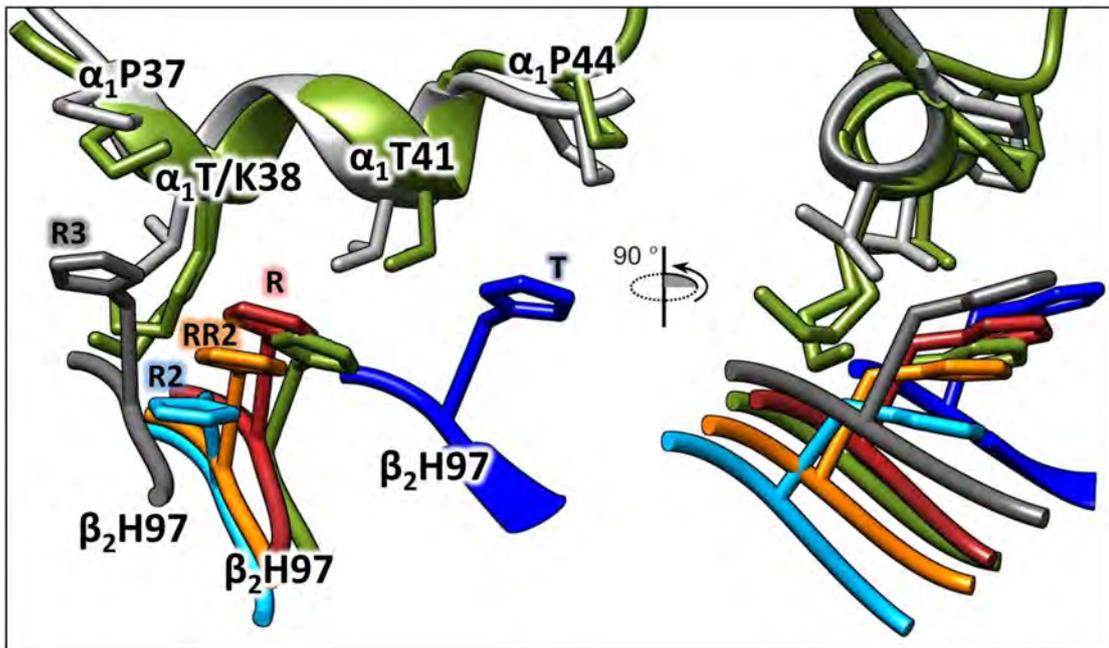


Abbildung 50: Die *Switch*-Region des HbXl im Vergleich zu humanem Hb mit anderen Beladungszuständen. Die *Switch*-Region ist hochkonserviert und wird durch P37, T38, T41, P44 und der α 1 Untereinheit und H97 der β 2-Untereinheit gebildet. Die verschiedenen α 1 β 1-Dimere des HbXl (grün) wurden mit den Strukturen der bekannten Ladungszustände überlagert. Dunkelblau: T-Zustand (pdb: 2HHB), rot: R Zustand (pdb: 1HHO), orange: RR2-Zustand (pdb: 1MKO), hellblau: R2-Zustand (pdb: 1BBB), dunkelgrau: R3-Zustand (pdb: 1YZI). Die β 2-Untereinheit verschiebt sich bei Beladung des Häms mit Sauerstoff (siehe Kapitel 1.2.3, S. 12). An Stelle des hochkonservierten Threonins38 (siehe weiße α -Helix) besitzt das HbXl an dieser Stelle ein Lysin (grüne α -Helix). Es sind die Lysine an Position α 38 beider α -Untereinheiten eingeblendet.

Anstelle des hochkonservierten α Thr38 befindet sich in der Struktur des HbXl ein Lysin, dessen Volumen deutlich größer ist als das des Threonins. Abb. 50 zeigt die Ausrichtung der Lysine an Position α 38 beider α -Untereinheiten. In dieser Abbildung, welche die Aminosäuren in der sog. *Ribbon*-Darstellung zeigt, wird das Größenproblem zunächst nicht deutlich, doch wenn man die vollständige Struktur betrachtet (Abb. 51A) wird sichtbar, dass die Atome des α Lys38 sich mit denen des β His97 des R3-Zustandes über-

schneiden (roter Kreis). Die Abbildung zeigt, der Vollständigkeit halber, das α_1 Lys38 und α_2 Lys38 (grüne Reste im roten Kreis), da sich diese in den beiden unterschiedlichen α -Untereinheiten des HbXl unterschiedlich ausrichten.

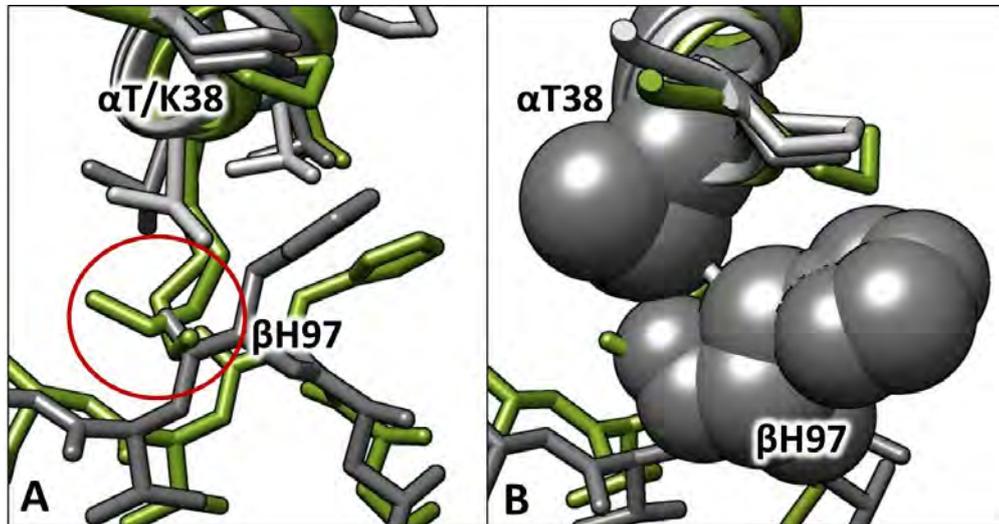


Abbildung 51: **Sterische Komplikationen im vermutlichen R3-Zustand des HbXl.** **A:** Die atomare Darstellung der β -Untereinheit des R3-Zustandes (dunkelgrau) und des R-Zustandes des HbXl (grün), zeigt eine Überschneidung (roter Kreis) des α K38 und des β H97 des R3-Zustandes. Das α T38 des humanen R-Zustandes (weiß) verschiebt sich beim Übergang in den R3-Zustand leicht nach hinten. **B:** Die Verschiebung des α T38 im R3-Zustand macht es für das β H97 möglich, diese Position einzunehmen. Beide Aminosäuren in spherischer Darstellung um die Ausdehnung der Reste sichtbar zu machen.

Abb. 51B zeigt α Thr38 und β His97 des R3-Zustandes (dunkelgrau) in der spherischen Darstellung. Es zeigt sich, dass diese beiden Aminosäuren nur einen sehr knappen Raum zwischen sich aufweisen. Im Vergleich zur R-Struktur (weiß), biegt sich das α Thr38 dabei leicht nach hinten, was die Konformationsänderung wahrscheinlich erst möglich macht. Für β His97 ist es bei einer Konformationsänderung vermutlich nicht mehr möglich das α Lys38 des HbXl zu passieren.

Zu bedenken ist außerdem, dass bei saurem pH-Wert diese beiden Reste positiv geladen sind und sich bei zu nahem Kontakt gegenseitig abstoßen. Der hochaffine R3-Zustand kann somit, aufgrund der sterischen Hinderung und der Ladung der Aminosäuren, nur sehr schwer oder gar nicht erreicht werden.

Vermutlich behindern die positiven Ladungen des α Lys38 und des β His97 ebenfalls das Erreichen des R2- und RR2-Zustandes, wobei dieser Effekt abhängig von der Ladung des Histidins ist und somit vom pH-Wert.

Folgende Thesen können somit formuliert werden:

1. Das HbXl sollte, aufgrund der sterischen Hinderung, insgesamt weniger sauerstoffaffin sein als Hämoglobine, welche die Mutation α Lys38 nicht besitzen.
2. Bei niedrigem pH-Wert sollte sich die Sauerstoffbindung, aufgrund der positiven Ladung des β His97, noch weiter verringern.

Diese Vermutungen sollen in den nächsten Kapiteln im Zusammenhang mit dem sogenannten Root-Effekt und den Eigenschaften des larvalen HbXl näher diskutiert werden. Der Vollständigkeit halber soll in diesem Kapitel noch erwähnt werden, dass sich in der *Switch*-Region des (adulten) HbXl eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen α Lys38 und β Ser93 auszubilden kann (siehe Kapitel 3.3.6, S. 75). Auf diese Wasserstoffbrücke wird in Kapitel 5.6.2 näher eingegangen.

5.5 Unterschiede zwischen larvalem und adultem HbXl und der Einfluss der Aminosäure auf Position β 38 auf die Physiologie der Sauerstoffbindung

Wie bei Froschlurchen (Anura) üblich, findet auch beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* während der Metamorphose ein Wechsel zwischen larvalem zu adultem Hämoglobin statt (MACLEAN & JURD, 1971; SULLIVAN, 1974; HENTSCHEL ET AL., 1979). Bisher wurden jeweils zwei Sequenzen pro Untereinheit in adulten Tieren gefunden (HBA1, HBA2, HBB1, HBB2), sowie drei Sequenzen der α -Untereinheit (HBA3-5) und eine Sequenz der β -Untereinheit (HBBL) in Larven des Krallenfroschs. (WILLIAMS ET AL., 1980; BANVILLE & WILLIAMS, 1985; MEYERHOF ET AL., 1984; KAY ET AL., 1983; KNOCH ET AL., 1983; PATIENT ET AL., 1983).

Das Hämoglobin von adulten Krallenfröschen besitzt einen P50-Wert von 22 Torr und ist bei ca. 65 Torr maximal gesättigt (EMILIO & SHELTON, 1974; FEDER & WASSERSUG, 1984). Messungen am nordamerikanischen Ochsenfrosch weisen bei Larven eine höhere O₂-Affinität auf als bei adulten Tieren und es ist davon auszugehen, dass dieses Modell auf andere Anuren übertragen werden kann (BROYLES, 1981). Genaue Daten über den P50-Wert des larvalen Hämoglobins existieren bis heute nicht. Die Affinität scheint jedoch so hoch zu sein, dass FEDER & WASSERSUG (1984) zeigen konnten, dass *Xenopus*-Larven mehrere Tage ohne Luftkontakt unter Wasser überleben. Sie erklärten sich dies durch einen niedrigen P50 des Larven Hämoglobins, was den Verlust des Sauerstoffes über die Haut nicht nur verhindert, sondern gegenteilig sogar die Aufnahme von O₂ ermöglicht. Auf die aerobe Atmung können die Tiere jedoch auf Dauer nicht verzichten, da diese existentiell für Nahrungsaufnahme, Bewegung und die Regulierung des Auftriebs unter Wasser ist (FEDER & WASSERSUG, 1984).

Höchst interessant ist die Tatsache, dass adulte Tiere, bei denen der anämische Zustand durch Blutverlust herbeigeführt wurde, erneut das Larvenhämoglobin HbF₁ exprimieren (Tetramer) (MACLEAN & JURD, 1971), um diesen Zustand auszugleichen. Auch dies lässt auf eine hohe Sauerstoffaffinität des Larven-Hämoglobins schließen.

Abb. 26 in Kapitel 3.3.4 (S. 61) zeigt den Vergleich der verschiedenen Sequenzen. Betrachtet man die Sequenzen im Bereich der *Switch*-Region (Helix C), so zeigt sich, dass dort auch in der larvalen Form eine Mutation des α Thr38 vorliegt (siehe vorheriges Kapitel). In allen drei larvalen Typen dieser Untereinheit befindet sich dort ein Glutamin. Die Aminosäure Glutamin ist zwar ebenfalls größer als das dort typische Threonin, ist jedoch kleiner als das Lysin des adulten Typs und noch dazu elektrisch neutral (Abb. 52). Es ist also theoretisch möglich, dass der kleinere Glutaminrest die Beweglichkeit der *Switch*-Region erhöht und somit auch die Affinität des larvalen Hämoglobins. Auch Wasserstoffbindungen zwischen β His97 und β Gln38 sind denkbar, welche den R-Zustand zusätzlich stabilisieren würden.

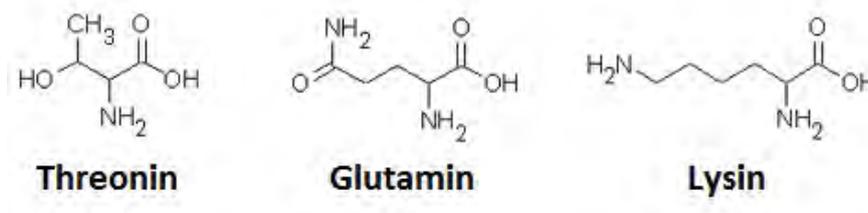


Abbildung 52: **Struktur der Aminosäuren Threonin, Glutamin und Lysin.** Die Darstellung der Moleküle macht die unterschiedliche räumliche Ausdehnung der Aminosäurereste deutlich.

BRUNORI ET AL. (1985) zeigen durch Kinetiken der Carbonmonoxid-Bindung der Hämoglobine von beiden Stadien des Krallenfroschs, dass bei Larven der sogenannte Root-Effekt nicht vorliegt (siehe Kapitel 1.2.5, S. 15). Sie bestätigen damit indirekt die Theorie von PERUTZ & BRUNORI (1982), dass β Ser93 eine wichtige Rolle beim Root-Effekt spielt, da es mit der Carboxylgruppe des endständigen β His146 eine Wasserstoffbrücke bildet. Das β His146 kommt nur in diese räumliche Position, wenn es positiv geladen ist und eine ionische Bindung mit β Glu94 eingeht. Diese Aminosäuren β Ser93 und β His146 sind bei der Larvenform mutiert und zu Alanin (β 93) und Phenylalanin (β 146). Alanin ist nicht dazu in der Lage eine Wasserstoffbrücke zu bilden. Auf diese Theorie soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

5.6 Das HbXI und der Root Effekt

Hämoglobine, die den sogenannten Root- Effekt aufweisen, besitzen eine signifikant niedrigere Sauerstoffaffinität im sauren physiologischen Milieu und sie können nicht vollständig oxygeniert werden, selbst dann nicht, wenn reiner Sauerstoff vorliegt (ROOT, 1931; SCHOLANDER & VAN DAM, 1954). Zusätzlich verlieren sie bei einem pH-Wert unter 6,5 fast vollständig ihre Kooperativität (s. Kapitel 1.2.5, S. 15). Der Root-Effekt tritt hauptsächlich bei marinen Knochenfischen auf, jedoch postulierten PERUTZ & BRUNORI (1982) aufgrund von Sequenzvergleichen ihn auch für das Hämoglobin des Krallenfroschs *Xenopus laevis*. Der tatsächliche Nachweis gelang jedoch nicht eindeutig, da die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsgruppen sich widersprachen oder unterschiedlich interpretiert wurden (PERUTZ & BRUNORI, 1982; BRIDGES ET AL., 1985; BRUNORI ET AL., 1987; BRITAIN, 1987; KISTER ET AL., 1989).

Dies war z.B. bei der Messung der Kooperativität der Fall. Während PERUTZ & BRUNORI (1982) den nahezu vollständigen Verlust der Kooperativität (Hillkoeffizient $n_H < 1$) bei Zugabe des Inhibitors IHP (Inositolhexaphosphat) nachwiesen, wie es bei den Root-Effekt-Hämoglobinen der Knochenfische der Fall ist, zeigten KISTER ET AL. (1989), dass die Kooperativität bei saurem pH und nicht unter einen Hillkoeffizienten von ~ 2 sinkt (gemessen in roten Blutkörperchen, Abb. 53A).

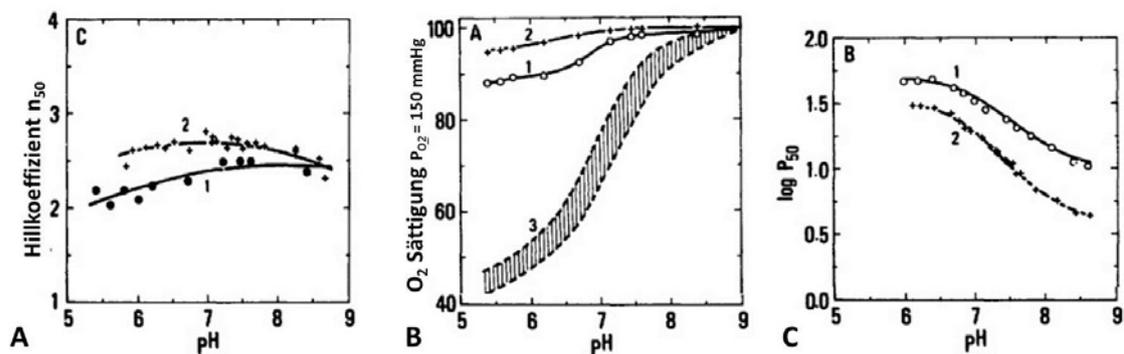


Abbildung 53: Vergleich zwischen frischen Erythrozyten (RBK) des Menschen und des Krallenfroschs.. 1= *Xenopus laevis* RBK, 2 = humane RBK und 3 = typischer Bereich von RBK, die den Root-Effekt aufweisen. Abbildung nach KISTER ET AL. (1989).

Eine weitere Bedingung ist, dass Root-Effekt-Hämoglobine bei einem pH-Wert unter 7 einem Sauerstoffpartialdruck von 150 mmHg (Raumlufte) nicht vollständig oxygeniert werden können. Dies ist beim HbXI der Fall, die Sättigung des Hbs sinkt bei pH-Werten unter 7 im Vergleich zum menschlichen Hb (97% Sättigung) um fast 10% (gemessen in roten Blutkörperchen) (KISTER ET AL., 1989). Es erreicht jedoch nicht die Werte von typischen Root-Effekt-Hämoglobinen, welche bei gleichem Sauerstoffpartialdruck ($pO_2 =$

150 mmHg) unter 50% Sättigung fallen (Abb. 53B) (KISTER ET AL., 1989).

Das HbXl (gemessen in Erythrozyten) zeigt ebenfalls keinen signifikanten Abfall der Sauerstoffaffinität bei einem pH-Wert < 7 (KISTER ET AL., 1989). Die Affinität ist zwar um ein 2,5 faches geringer als beim menschlichen Hb, jedoch zeigt sich dieser Unterschied in Vergleichskurven des P_{50} als pH-unabhängig, da die Kurve des HbXl (1) fast identisch zur Kurve des menschlichen Hbs (2) verläuft (Abb. 53C).

Als Problem stellte sich auch die Definition des Root-Effektes dar, denn das HbXl besitzt nicht alle Eigenschaften, welche bei Knochenfischen mit dem Root-Effekt in Verbindung gebracht werden. So ist der Root-Effekt bei Knochenfischen ein Ergebnis aus zwei verschiedenen pH-abhängigen Konformationsänderungen: Zum einen die Stabilisation des T-Zustandes und zum Anderen die funktionalen Differenzen zwischen den beiden Untereinheiten α und β (PERUTZ & BRUNORI, 1982). Während bei den Knochenfischen letztere Heterogenität der Untereinheiten mal mehr und mal weniger stark ausgeprägt ist, konnte beim HbXl diese Inequivalenz zwischen den Untereinheiten nicht nachgewiesen werden (PERUTZ & BRUNORI, 1982; BRUNORI ET AL., 1987). Klassischerweise wird auch dies als Voraussetzung für den Root-Effekt angesehen (s. Kapitel 1.2.5, S. 15).

Da das Hämoglobin des Krallenfrosches nicht alle charakteristischen Eigenschaften der Root-Effekt-Hämoglobine besitzt, schlossen KISTER ET AL. (1989), dass das HbXl nicht den „wahren“ Root-Effekt aufweist. Eventuell handelt es sich bei der extremen Stabilisierung des T-Zustandes des Hbs, welche anhand der unvollständigen Sättigung mit Sauerstoff bei Raumluft zu erkennen ist, um einen evolutionär verkümmerten Root-Effekt, der sich bei Amphibien in dieser Weise noch nachweisen lässt (KISTER ET AL., 1989). In nachfolgenden Kapiteln werden daher die Eigenschaften des HbXl als „rudimentärer“ Root-Effekt bezeichnet.

Im folgenden Unterkapitel soll die im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Kristallstruktur des tetrameren HbXl mit Fokus auf den Root-Effekt untersucht werden. Ziel ist es Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu den Kristallstrukturen der Knochenfisch-Hämoglobine zu finden. Dabei sollen speziell die möglichen strukturellen Auslöser für den Root Effekt betrachtet werden. In einem weiteren Kapitel folgt die Vorstellung eines Mechanismus, welcher die beschriebenen Sauerstoffbedingungsseigenschaften des HbXl erklären könnte.

5.6.1 Die strukturellen Auslöser des Root-Effektes bei Knochenfischen im Vergleich mit der Struktur HbXI

Viele hochrangige Hämoglobinforscher haben sich der Aufklärung des strukturellen Phänomens des Root-Effektes angenommen. Im Fokus lag dabei die Analyse der Knochenfisch-Hämoglobine und die Suche fing zunächst vielversprechend an, da z.B. bei den antarktischen Fischen *Trematomus* (vormals *Pagothenia*) *bernacchii* und seinem nahen Verwandten *Trematomus newnesi* nur 14 ausgetauschte Aminosäuren über die Ausprägung des Root-Effektes entscheiden (MAZZARELLA ET AL., 1999). Doch der Mechanismus des Root-Effektes ist nicht so einfach wie erhofft und bietet bis heute Diskussionsstoff. Folgende Hypothesen wurden im Laufe der Zeit formuliert:

Die β Ser93- β His146 Wasserstoffbrückenbindung. Zunächst schlugen PERUTZ & BRUNORI (1982) vor, dass ein Austausch des Serin β Ser93 zu einem Cystein ausschlaggebend für den Root-Effekt bei den Knochenfischen sei. Die Aminosäure Serin ist deutlich hydrophiler als Cystein und nimmt daher bevorzugt eine nach außen gerichtete Position ein. Es bildet deshalb im T-Zustand zwei Wasserstoffbrücken: Zur Carboxylgruppe des endständigen β His146 und zum NH dessen Peptidbindung (BELLELLI & BRUNORI, 2011). Des Weiteren begünstigt diese Konformation eine Salzbrücke des β His146 zu β Glu92 bei niedrigerem pH-Wert (Abb. 54).

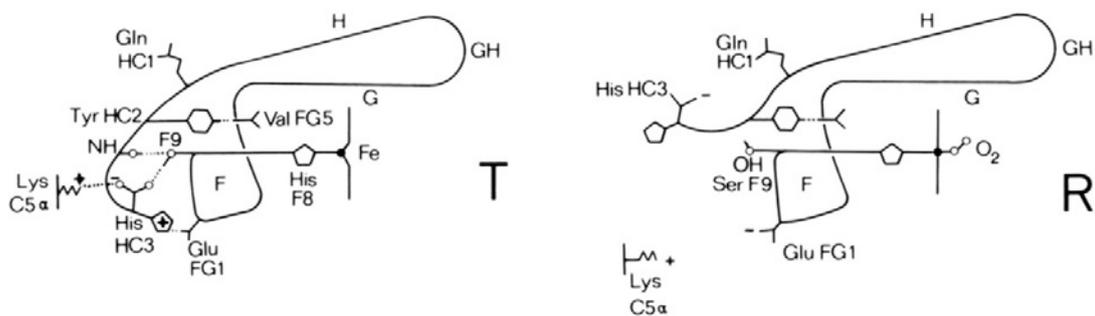


Abbildung 54: **Vorgeschlagener Mechanismus des Root-Effektes von Perutz & Brunori (1982).** Bei diesem Vorschlag spielt das C-terminale β His146 (HC3) eine wichtige Rolle. Es unterstützt im T-Zustand und bei niedrigem pH-Wert durch eine Bindung an β Glu94 (GluFG1) die beiden Wasserstoffbrücken von β Ser93 (SerF9) zur Carboxylgruppe des C-Terminus und des NH des Peptidrückgrats an Position β His146. Im R-Zustand und bei höherem pH finden diese Bindungen, aufgrund von Konformationsänderungen des β His146 nicht statt. Abbildung verändert nach PERUTZ & BRUNORI (1982).

PERUTZ & BRUNORI (1982) rechtfertigten diese Theorie durch den Nachweis des Root-Effekts beim Hämoglobin des HbXL, welcher ebenfalls ein Serin an Position $\beta 93$ aufweist (s. Alignment auf Abb. 26). Das β His146 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Erklärung des Bohr-Effektes (PERUTZ & BRUNORI, 1982). Da der Root-Effekt einen Spezialfall des Bohr-Effektes darstellt, liegt es nahe anzunehmen, dass dessen Mechanismen ähnlicher Natur sind.

Eine Punktmutation des β Cys93 zu einem Serin im menschlichen Hämoglobin widerlegt jedoch die β Ser93- β His146-Wasserstoffbrücke als Auslöser für den Root-Effekt, da die Mutation nicht zur Ausprägung des Root-Effekts beim humanen Hb führte (NAGAI ET AL., 1985).

Die ungewöhnliche α Asp95- β Asp101-Bindung. Durch die Aufklärung der deoxy-Hämoglobinstruktur des Fisches *Pagothenia bernacchii* wurde eine unübliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Resten α Asp95 und β Asp101 im $\alpha_2\beta_1$ -Interface für den Auslöser des Root-Effektes ins Spiel gebracht. Die Asparaginsäuren liegen im T-Zustand so dicht zusammen (2,7 Å), dass sie sich zwischen ihren Carboxylgruppen ein Proton teilen (ITO ET AL., 1995). Für beide Untereinheiten wären das schon zwei von den insgesamt vier Protonen, die den maximalen Wert von n_{H^+} beim Root-Effekt von *Pagothenia bernacchii* ausmachen (CAMARDELLA ET AL., 1992; ITO ET AL., 1995). Mit n_{H^+} wird die Differenz der gebundenen Protonen an das komplett unbeladene Hb und der an das komplett oxygenierte Hb bezeichnet.

Die Asp-Asp-Bindung ist in anderen Root-Effekt-Hämoglobinen konserviert, doch es taucht z.B. auch im Hämoglobin von *Trematomus newnesi* auf, welches keinen Root-Effekt aufweist (ITO ET AL., 1995; PERUTZ, 1996). In *Trematomus newnesi* kommt noch ein weiteres Hb vor, welches aufgrund seiner gelelektrophoretischen Eigenschaften als kathodische Hämoglobin-Komponente (HbCTn) bezeichnet wird und, im Gegensatz zum dominanten Hämoglobin dieser Spezies, einen Root-Effekt besitzt. Das HbCTn zeichnet sich außerdem durch einen sehr geringen Anteil an Histidinen aus, sowie dem Fehlen des endständigen β His146 (MAZZARELLA ET AL., 2006a). Zunächst wurde vermutet, dass die α Asp95- β Asp101 Bindung dort durch die Anwesenheit von α Ile41 und α Ser97 verhindert wird und daher nicht den Grund für den Root-Effekt darstellen kann (D'AVINO & DE LUCA, 2000). Die Kristallstruktur des HbCTn zeigt jedoch, dass es trotz der beiden Reste zur Bindung zwischen α Asp95 und β Asp101 kommt, welche durch β Asp99 noch zusätzlich stabilisiert wird (MAZZARELLA ET AL., 2006a). Die Autoren postulieren daher die Asp-Asp Bindung als minimale Strukturanforderung für die Ausprägung des Root-Effekts.

Im HbXL befindet sich das α Asp95 äquivalent an Position $\alpha 94$ (Sequenzverschiebung), an Position $\beta 101$ befindet sich dagegen ein Leucin. Abb. 55A zeigt die Aminosäuren des

HbXL (grün) im Vergleich zu denen der Asp-Asp-Bindung aus der deoxy-Struktur des Fisches *Pagothenia bernacchii* (pdb: 1HBH, violett). Da sich die Struktur des HbXL im R-Zustand befindet und die des Fisches im T-Zustand, wurden in Abb. 55B die Untereinheiten des HbXL, zum besseren Vergleich, auf die Strukturen des T-Zustandes überlagert. Leucin ist eine hydrophobe Aminosäure und aufgrund der niedrigen Elektronegativität des Kohlenstoffs (im Vergleich zu Stickstoff und Sauerstoff) unbeteiligt an der Bildung von Wasserstoffbrücken. Des Weiteren ist es nicht dazu in der Lage ein Proton zwischen sich und einer Asparaginsäure zu binden, wie es bei der Asp-Asp-Bindung der Fall ist (siehe oben) und kommt daher nicht als Ursprung für die sog. Root-Protonen in Frage. Aus diesen Gründen wird die Asp-Asp-Bindung für die Ursache des rudimentären Root-Effekt des Krallenfrosch-Hämoglobins ausgeschlossen.

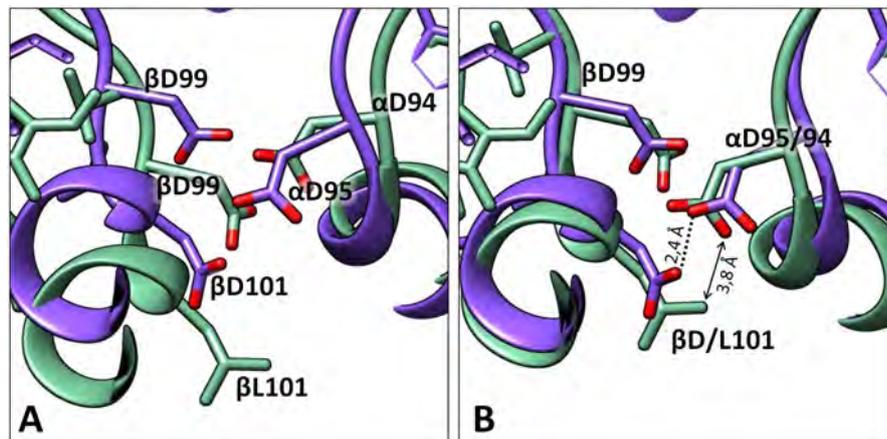


Abbildung 55: **Die $\alpha 95$ Asp- $\beta 101$ Asp-Bindung.** **A:** Der Bereich der Asp-Asp-Bindung im α_2/β_1 -Interface des Fisches *Pagothenia bernacchii* (violett, T-Zustand, pdb: 1HBH) im Vergleich zur HbXL-Struktur (grün, R-Zustand). **B:** Überlagerung der HbXL-UE auf die Struktur des Fisches.

Das positiv geladene Cluster. Ein positiv geladenes Cluster im $\beta_1\beta_2$ Interface der Kristallstruktur des Hämoglobins von *Leiostomus xanthurus* steht ebenfalls in der Diskussion den Root-Effekt auszulösen (MYLVAGANAM ET AL., 1996). Es besteht aus den Resten β Arg144, β Lys82 und dem endständigen β His147 der benachbarten β -Untereinheit. Dieses Cluster wird im R-Zustand ausgebildet, da eine, im Vergleich zum menschlichem Hb, um 3° größere relative Drehung der $\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$ -Dimere dazu führt, dass beide β -Untereinheiten näher zusammenliegen (MYLVAGANAM ET AL., 1996). Dieses Cluster wird außerdem durch β Trp3 unterstützt, welches den C-Terminus der β -Untereinheit zusätzlich näher zur benachbarten β -Kette drückt. Bei saurem pH-Wert soll die stärkere Protonierung des Clusters dasselbige destabilisieren und dadurch das $\beta_1\beta_2$ Interface auseinanderdrücken (MYLVAGANAM ET AL., 1996). Mazzarella und seine Mitarbeiter zweifeln diese Theorie an, denn nach Erhalt der Kristallstruktur des Hämoglobins von

Trematomus newnesi (besitzt keinen Root-Effekt) zeigt sich, dass diese Struktur ebenfalls diese positiven Cluster aufweist und auch generell sehr hohe Übereinstimmungen mit der R-Struktur von *Pagothenia bernacchii* besitzt (MAZZARELLA ET AL., 1999). MYLVAGANAM ET AL. (1996) berichten zwar, dass auch beim Hb von *Pagothenia bernacchii* die relative Drehung vergrößert ist, jedoch nicht, dass bei diesem Fisch das positive Cluster nicht ausgebildet werden kann, da an Stelle $\beta 144$ ein Glutamin sitzt ($\beta \text{Arg}144\text{Gln}$) und an $\beta 82$ ein Glycin ($\beta \text{Lys}82\text{Gly}$). Beim HbXl finden sich an den besagten Stellen ein Glycin ($\beta 144$), das Lysin $\beta(82)$ stimmt überein und das $\beta \text{His}147$ befindet sich an Position 146. An Stelle des $\beta \text{Trp}3$ liegt ebenso wie beim menschlichen Hb ein Leucin vor. Da somit vier der acht beteiligten Aminosäuren verändert vorliegen wird das positive Cluster beim HbXl vermutlich nicht im erforderlichen Maße ausgebildet und kommt nicht als Ursache des rudimentären Root-Effekt des HbXl in Frage.

Die Aminosäure-Unterschiede zwischen zwei verwandten Barscharten. MAZZARELLA ET AL. (1999) untersuchten stattdessen die 14 verschiedenen Aminosäuren, welche das Hämoglobin von *Trematomus newnesi* (HbTn, kein Root-Effekt) und das Root-Effekt-Hämoglobin von *Pagothenia bernacchii* (HbPb) unterscheiden. Sie konnten durch den Ausschluss von Aminosäuren die z.B. in unbeteiligten Regionen liegen (Oberfläche), die Reste auf drei wesentliche reduzieren: $\alpha \text{Ile}41\text{Thr}$, $\alpha \text{Ser}97\text{Ala}$ und $\beta \text{Tyr}41\text{His}$ (bzg. des HbTn). Sie konnten sich nicht erklären, wie diese Austausch mit dem Root-Effekt in Zusammenhang stehen und schlugen vor, dass eine generelle Erklärung für den Root-Effekt nicht existiert, sondern dass verschiedene Faktoren dazu beitragen und diese von Spezies zu Spezies unterschiedlich sind. In der Sequenz des HbXl sowie in der Sequenz des humanen Hb befindet sich an diesen Stellen ein Threonin (41α), ein Asparagin (97α) und ein Tyrosin (41β).

Die Flexibilität der α -Untereinheit. Bei der Analyse der Kristallstruktur des deoxygenierten Hämoglobins von *Trematomus newnesi* zeigt sich jedoch, dass die starke Asp-Asp Wasserstoffbrückenbindung dort ebenfalls existiert und dadurch den T-Zustand stabilisiert. Da dieses Hämoglobin keinen Root-Effekt besitzt und offensichtlich in beiden Zuständen die $\alpha \text{Asp}95$ - $\beta \text{Asp}101$ Bindung aufweist, widerspricht dies der bisherigen Annahme (VERGARA ET AL., 2010). Die Autoren beobachteten stattdessen eine ungewöhnlich hohe Flexibilität der beiden α -UE und hohe B-Faktoren bei sonst gut definierten Bereichen, was letztendlich zu unüblichen Abständen innerhalb der Hämtasche führt.

B-Faktoren (Debye-Waller-Faktoren) werden genutzt um zwischen beweglichen und starren Bereichen einer Röntgenkristallstruktur zu unterscheiden (DEBYE, 1913; WALLER, 1923). VERGARA ET AL. (2010) schlagen daher vor, dass aufgrund der Flexibilität eine hohe Destabilisierung des T-Zustandes vorliegt und der Root-Effekt verhindert wird, unabhängig davon ob die Asp-Asp Wasserstoffbrückenbindung existiert oder nicht

(VERGARA ET AL., 2010). Die Auflösung des HbXL ist, aufgrund der Ungenauigkeit der B-Faktoren, nicht ausreichend genug um eine solche Flexibilität nachzuweisen bzw. zu untersuchen.

Die Salzbrücke zwischen α Asp48 und α His55. Auch bei der Analyse des deoxy-Hämoglobins aus *Pagothenia bernachhi* (HbPb) bei pH 6,2 und 8,4 zeigt sich unter anderem der CD α -Übergang als wichtiger Bereich, zusammen mit einer Salzbrücke zwischen α Asp48 und α His55 (Abb. 56, hellblau, gestrichelt), die durch die pH-Erniedrigung aufgebrochen wird (MAZZARELLA ET AL., 2006b) (Abb. 56, beige). Diese Bindung wird ebenfalls als Position der Root-Protonen postuliert (BOECHI ET AL., 2011). Im HbXL existiert diese Salzbrücke jedoch nicht (Abb. 56, rosa), da sich an Position 55 ein Isoleucin befindet. Tabelle 21 (S. 76) zeigt zudem, dass sich in diesem Bereich stattdessen eine Salzbrücke zwischen den Resten α His49 und α Asp47 befindet (Nr. 7). Diese hat jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität des Bereiches, da sie auf dem Loop sitzt und keinerlei Kontakt mit Helix D besteht (Abb. 56, rosa, gestrichelt).

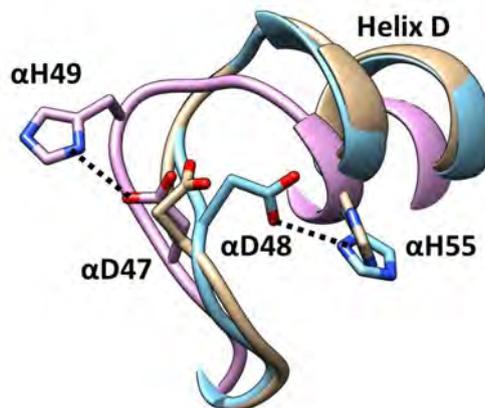


Abbildung 56: **Die α Asp48- α His55 Salzbrücke des HbPb im Vergleich mit HbXL.** Die Salzbrücke α D48- α H55 des *Pagothenia bernachhi* Hämoglobins (HbPb) (hellblau, gestrichelte Linie) wird durch die Absenkung des pH-Wertes aufgebrochen (beige). Im HbXL (rosa) sitzt an Position α 55 ein Isoleucin, weshalb diese Bindung nicht ausgebildet werden kann. Zudem befindet sich zwar eine Salzbrücke zwischen α H49 und α D47 in näherer Umgebung, jedoch hat diese keinerlei Kontakt zu Helix D.

Fazit: Die lange Geschichte der Erforschung des Root-Effekts macht zweierlei deutlich: Es ist bis heute unklar, wodurch der Root-Effekt exakt ausgelöst wird. Alle bisher formulierten Vorschläge lassen sich nicht auf das Hämoglobin des Krallenfroschs *Xenopus laevis* übertragen. Die Vermutung liegt nahe, dass sich der Root-Effekt beim Krallenfrosch

unabhängig von den Knochenfischen entwickelt hat und daher durch einen vollkommen anderen Mechanismus ausgelöst wird. Dies wurde schon von PERUTZ & BRUNORI (1982) aufgrund von Sequenzvergleichen und Sauerstoffbindungskurven vorgeschlagen. Im Gegensatz zu den Knochenfisch Hbs bleibt beim HbXL die Kooperativität erhalten (siehe Anfang Kapitel 5.6).

5.6.2 Schaltermechanismus als Erklärung für den rudimentären Root-Effekt des HbXL

Die Kristallstruktur des HbXL ermöglicht den Vorschlag eines neuen Mechanismus zur Erklärung des rudimentären Root-Effektes beim Krallenfrosch. Er basiert auf der Wasserstoffbrückenbindung zwischen β Ser93 und α Lys38 in der *Switch*-Region (siehe Kapitel 5.4, S. 101). Wie schon in Kapitel 5.4 erwähnt, wird diese Bindung in einer der beiden *Switch*-Regionen ausgebildet und in der anderen nicht. Bei β Ser93 handelt es sich um das gleiche Serin, welches schon PERUTZ & BRUNORI (1982) als ausschlaggebend für den Root-Effekt postulierten. Nach ihrem Vorschlag ist eine Wasserstoffbrücke zwischen β Ser93 und dem endständigen β His146 verantwortlich für den Root-Effekt. Eine *in vitro* Mutation des β Cys93 des menschlichen Hämoglobins zu einem Serin führte allerdings nicht zur Auslösung des Root-Effektes beim humanen Hb, weswegen diese Theorie verworfen wurde (NAGAI ET AL., 1985). Mit den neuen Erkenntnissen aus der HbXL Kristallstruktur lässt sich folgender Mechanismus formulieren:

Bei niedrigem pH: Das endständige Histidin β 146 ist positiv geladen und bildet im T-Zustand eine Wasserstoffbrücke mit β Glu94 und die Carboxylgruppe des C-terminalen Endes bildet eine weitere Wasserstoffbrücke mit β Ser93 (PERUTZ & BRUNORI, 1982) (Abb. 57A). Die *Switch*-Region bleibt beweglich, so wie es beim humanen Hb der Fall ist. Zusätzlich besteht zeitgleich die sterische Behinderung des β His97 durch α Lys38 und die positive Ladung des β His97 bei diesem pH-Wert, welche in Kapitel 5.4 diskutiert wurde (in Abb. 57 nicht dargestellt). Die *Switch-Region* ist also flexibel, die Sauerstoffaffinität aber generell erniedrigt.

Bei hohem pH: Das endständige Histidin β 146 ist neutral geladen und die Bindung mit β Glu94 liegt nicht mehr vor und auch die Wasserstoffbrücke der C-terminalen Carboxylgruppe wird gelöst, da sich das β His146 zum Lösungsmittel neigt. Das β Ser93 ist daher frei um eine Wasserstoffbrücke mit α Lys38 auszubilden (Abb. 57B). Diese Bindung stabilisiert den R-Zustand. Auch β His97 verliert seine positive Ladung und kann daher näher an α Lys38 rücken als zuvor. Die Stabilisierung des R-Zustandes führt zu einer höheren Sauerstoffaffinität.

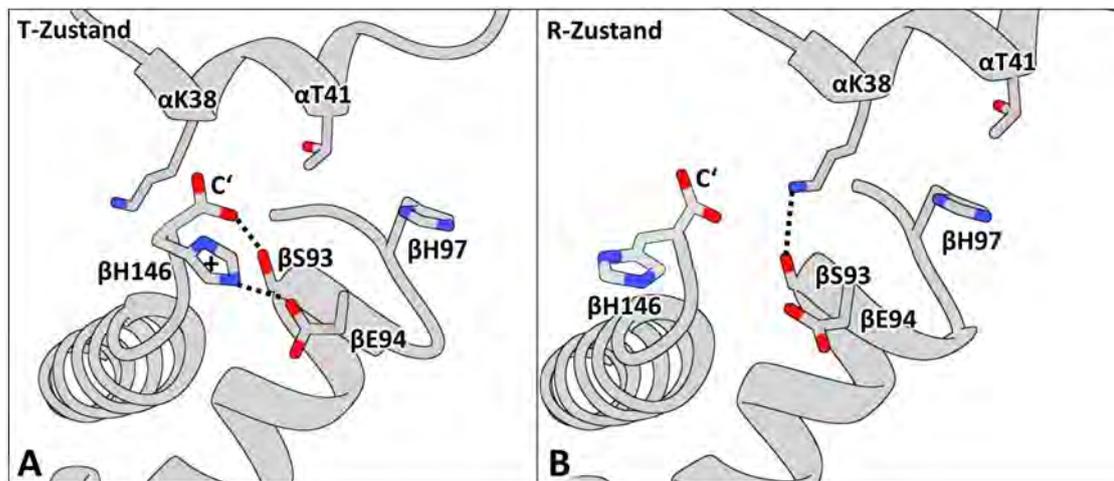


Abbildung 57: **Schematischer Vorschlag eines Mechanismus zur Erklärung der Sauerstoffbindungseigenschaften des HbXL.** Der Vorgang findet in der *Switch*-Region statt. **A:** Bei niedrigem pH-Wert sind die Histidine positiv geladen und das endständige β H146 bildet im T-Zustand eine Salzbrücke zu β E94. Zusätzlich kann so das Carboxylende der β -Untereinheit eine Wasserstoffbindung mit β S93 eingehen. Die *Switch*-Region bleibt flexibel. **B:** Im R-Zustand und bei hohem pH geht das positiv geladene α K38 eine Wasserstoffbindung mit β S93 ein und der R-Zustand wird stabilisiert. Die Sauerstoffaffinität ist dadurch erhöht. Abbildung schematisch und erstellt mit Photoshop.

Kurz zusammengefasst: Das endständige β His146 blockiert bei niedrigem pH-Wert die Bindungsfähigkeit von β Ser93. Erhöht sich der pH-Wert, wird diese Wasserstoffbrücke aufgehoben und β Ser93 ist frei für die Bildung der Wasserstoffbrücke zu α Lys38, welche den R-Zustand fixiert. Durch den pH-Wert und die daraus resultierende Ladungsänderung des β His146, „schaltet“ die Wasserstoffbrücke somit zwischen β His146, β Ser93 und α Lys38 hin und her.

Der hypothetische Mechanismus beschreibt, warum sich die O_2 -Transportkapazität bei niedrigem pH erniedrigt und gebundener Sauerstoff abgegeben wird. Für die Funktion dieses „molekularen Schalters“ sind somit drei Aminosäurereste entscheidend: β His146, β Ser93 und α Lys38. Dies würde auch erklären, wieso der Root-Effekt durch die alleinige *in vitro* Mutation des β Cys93 nicht beim menschlichen Hämoglobin ausgelöst werden konnte: Hier steht anstelle von α Lys38 ein Threonin welches zu kurz ist um eine Wasserstoffbrücke zu β Ser93 ausbilden zu können (Abstand ca. 8 Å).

Die Kristallstruktur des (adulten) HbXL gibt keinen Hinweis auf die Position des β His146, da die C- und N-terminalen Enden nicht gut in der Elektronendichte aufgelöst

sind und die Platzierung der entsprechenden Reste unmöglich war. Es ist allerdings zu bedenken, dass diese Kristallstruktur im R-Zustand vorliegt und noch dazu in einem Puffer mit $\text{pH} = 8,5$ gewonnen wurde. Die Histidine sind daher neutral und die Bildung der Salzbrücke des βHis146 zu βGlu94 ist unwahrscheinlich.

Das larvale HbXL besitzt keinen rudimentären Root-Effekt und hat zusätzlich eine deutlich höhere Sauerstoffaffinität als das Hämoglobin des adulten Krallenfroschs *Xenopus laevis* (BRUNORI ET AL., 1985). Dies wird gestützt durch die Sequenzen der α - und β -Untereinheiten an allen drei Positionen des molekularen Schalters andere Aminosäuren aufweisen. An Position αLys38 befindet sich ein Glutamin (s. Abb. 26), welches lang genug für die Ausbildung der Wasserstoffbrücke sein könnte, allerdings sind βSer93 zu einem Alanin und βHis146 zu einem Phenylalanin mutiert (MEYERHOF ET AL., 1984). Das Wegfallen der sterischen Behinderung durch αLys38 (s. Kapitel 5.5, S. 104), könnte die höhere Sauerstoffaffinität des larven Hbs erklären (FEDER & WASSERSUG, 1984) und das Fehlen der Wasserstoffbrückenbindung des Schaltermechanismus die Nichtausprägung des rudimentären Root-Effekts.

Es ist wahrscheinlich, dass auch andere Strukturelemente im HbXL einen zusätzlichen Einfluss auf die Ausprägung des rudimentären Root-Effekt nehmen. Dafür käme z.B. der Bereich im α - β -Interface, nahe der Switch-Region, welcher fünf Salzbrücken mit Beteiligung von Histidinen aufweist (siehe Abb. 38, S. 79) in Frage. Dieser Bereich könnte bei niedrigem pH-Wert die Beweglichkeit des HbXL bei der Beladung mit Sauerstoff verringern. Auch die Salzbrücke zwischen αHis50 und der αGlu27 , welche die Switch-Region stabilisiert, wird durch einen niedrigen pH-Wert aufgelöst (PAIRET & JAENICKE, 2010). Eventuell sind diese Bindungen für die sinkende Kooperativität des HbXL bei saurem pH-Wert verantwortlich, da sie die Flexibilität des Proteins herabsetzen. Klarheit würde die Kristallisation des deoxygenierten HbXL in einem sauren Puffer bringen, jedoch konnte diese aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

In der Literatur wurde davon ausgegangen, dass der Root-Effekt durch eine starke Stabilisierung des T-Zustandes bei saurem pH-Wert entsteht (KISTER ET AL., 1989). Dies wäre bei dem hier beschriebenen Mechanismus für die Erklärung des rudimentären Root-Effektes des HbXL nicht der Fall. Er geht viel mehr davon aus, dass die intrinsische Sauerstoffaffinität des HbXL generell niedrig ist und bei einem pH-Wert > 7 der R-Zustand durch die Wasserstoffbrücke zwischen αLys38 und βSer93 stabilisiert wird und die Sauerstoffaffinität steigt. Im Prinzip lassen sich die Eigenschaften des Root-Effektes durch die Stabilisierung des T-Zustandes bei saurem pH-Wert (KISTER ET AL., 1989) und durch die, in dieser Arbeit vorgeschlagenen, Stabilisierung des R-Zustandes bei alkalischem pH-Wert beschreiben. Beide Erklärungen führen zum gleichen Endergebnis: Erniedrigung der Sauerstoffaffinität bei einem pH-Wert < 7 .

5.6.3 Der molekulare Schalter und die Isoformen des adulten HbXI

Bemerkenswerterweise besitzt die zweite Isoform der β -Untereinheit des HbXI an den Positionen des molekularen Schalters zwei Mutationen (s. Abb. 26, S. 61). An Position β 93 befindet sich an Stelle des Serins ein Alanin, welches nicht dazu in der Lage ist eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Zusätzlich wurde das konservierte Histidin an Position β 146 durch ein Asparagin ersetzt. Daraus lässt sich Folgendes schließen: Ist die Hypothese des molekularen Schalters korrekt, so bilden Hämoglobine des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, welche aus der HBB2-UE aufgebaut sind, keinen rudimentären Root-Effekt aus.

Unter der Annahme, dass die Existenz des molekularen Schalters ausschlaggebend für die Ausprägung des Root-Effekt ist, besitzt der Krallenfrosch *Xenopus laevis* somit ein Hämoglobingemisch aus einer Isoform, die den Root-Effekt besitzt und einer Isoform, welche ihn nicht aufweist. Das Verhältnis zwischen diesen Isoformen ist nicht bekannt, ebenso wenig gibt es Informationen darüber, ob dieses Verhältnis durch unterschiedliche Lebensbedingungen, das Alter oder das Geschlecht des Tieres variiert.

Obwohl bekannt war, dass eine zweite Hämoglobin Komponente im *Xenopus laevis* existiert (WILLIAMS ET AL., 1980), wurden für die Untersuchungen des Root-Effekts und die Erstellung der Sauerstoffbindungskurven die Isoformen nicht getrennt. Teilweise wurde nur an gewaschenen Erythrozyten (KISTER ET AL., 1989; BRUNORI ET AL., 1987) gemessen oder das Vollblut des Krallenfroschs genutzt (BRIDGES ET AL., 1985). Allein PERUTZ & BRUNORI (1982), welche zuerst den Root-Effekt beim Krallenfrosch postulierten, nutzten aufgereinigtes Hämoglobin. Sie führten Gelelektrophoresen durch, die zumindest zeigten, dass keine Polymerisation der Hämoglobine stattfand. Von mehreren Isoformen war nicht die Rede und es wurde auch kein Gelbild abgebildet.

Es ist also möglich, dass die unterschiedlichen Messergebnisse der Sauerstoffbindungen (s. Kapitel 5.6, S. 106) daraus resultierten, dass unterschiedliche Hämoglobin-Isoform-Gemische (aufgrund unterschiedlicher Haltungsbedingungen, Alter der Tiere usw.) in den Blutproben der Messungen von KISTER ET AL. (1989), BRUNORI ET AL. (1987), BRIDGES ET AL. (1985) und auch PERUTZ & BRUNORI (1982) existierten. Es ist daher auch möglich, dass der Root-Effekt des HbXI eigentlich viel stärker ausgeprägt ist als angenommen, da die Sauerstoffbindungen durch das Vorhandensein einer zweiten Isoform verfälscht werden.

All diese Hypothesen lassen sich durch die Aufreinigung der Isoformen und die Erstellung weiterer Sauerstoffbindungskurven beantworten. Dies war leider, aus zeitlichen und experimentellen Gründen, im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr möglich und ist Gegenstand weiterführender Forschungsarbeiten.

5.6.4 Existenz des molekularen Schalters in den Root-Effekt Hbs der Knochenfische

Der neue Mechanismus für die Erklärung des rudimentären Root-Effekt des HbXl bietet sich auch deshalb an, weil alle anderen Strukturbesonderheiten, welche in Verbindung mit dem „wahren“ Root-Effekt der Knochenfische diskutiert wurden, nicht beim HbXl auftreten (Kapitel 5.4, S. 101). In Kapitel 5.6 wurde diskutiert, inwieweit die Eigenschaften des HbXl mit den Eigenschaften der Knochenfische verglichen werden können. KISTER ET AL. (1989) stellten die These auf, dass es sich beim Krallenfrosch um eine Art „evolutionär verkümmerten“ Root-Effekt handeln könnte, weshalb er in der vorliegenden Arbeit auch als rudimentärer Root-Effekt bezeichnet wird. Wäre dies der Fall und der vorgeschlagene Mechanismus korrekt, so müssten sich theoretisch strukturelle Zusammenhänge diesbezüglich ziehen lassen. Tab. 23 bietet daher einen vergleichenden Überblick über die Aminosäuren an den wichtigen Positionen des neuen Mechanismus bei Hämoglobinen mit (+) und ohne (-) Root-Effekt.

Tabelle 23: Sequenzvergleich zwischen Hämoglobinen mit und ohne Root-Effekt.

Root-Effekt	Spezies	α 38	α 41	β 93	β 146	Quelle für Root-Effekt
+	<i>Carassius auratus</i>	Gln	Thr	Ser	His	TORRACCA ET AL. (1977)
+	<i>Chelidonichthys kumu</i>	Gln	Thr	Ser	His	VERDE ET AL. (2007)
+	<i>Cygnodraco mawsoni</i>	Gln	Thr	Ser	His	VERDE ET AL. (2007)
+	<i>Cyprinus carpio</i>	Gln	Thr	Ser	His	BERENBRINK ET AL. (2005)
+	<i>Leiostomus xanthurus</i>	Gln	Ile	Ser	His	BONAVENTURA ET AL. (1974)
+	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Hb4	Gln	Ala	Ser	His	BRUNORI (1975)
+	<i>Thunnus thynnus</i>	Gln	Thr	Ser	His	BERENBRINK ET AL. (2005)
+	<i>Trematomus bernacchii</i>	Gln	Thr	Ser	His	VERDE ET AL. (2007)
(+)	<i>Xenopus laevis</i>	Lys	Thr	Ser	His	KISTER ET AL. (1989)
-	<i>Electrophorus electricus</i>	Glu	Thr	Ser	His	MYLVAGANAM ET AL. (1996)
-	<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Gln	Ile	Ser	His	VERDE ET AL. (2007)
-	<i>Latimeria chalumnae</i>	Gln	Val	Phe	His	BONAVENTURA ET AL. (1974)
-	<i>Lepidosiren paradoxus</i>	Gly	Ser	Ser	His	BERENBRINK ET AL. (2005)
-	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Hb1	Gln	Thr	Ala	Phe	BRUNORI (1975)
-	<i>Trematomus newnesi</i>	Gln	Ile	Ser	His	D'AVINO ET AL. (1994)
-	<i>Homo sapiens</i>	Thr	Thr	Cys	His	ROOT (1931)

Wenn man davon ausgeht, dass bei den Knochenfischen auch ein Glutamin an Stelle α 38 die Wasserstoffbrücke zu β Ser93 ausbilden kann (aufgrund seiner Länge), dann befinden sich die drei beteiligten Aminosäuren des molekularen Schalters in 8 von 8 Hämoglobinen mit Root-Effekt und in 5 von 7 Hämoglobinen ohne Root-Effekt finden sie sich nicht (s. Tab. 23). In den zwei Sequenzen, welche die Aminosäuren des Schalters

trotzdem aufweisen, befindet sich an Position $\alpha 41$ ein Isoleucin. Genau diese Aminosäure wurde schon von MAZZARELLA ET AL. (1999) als wichtiger Unterschied zur Ausprägung des Root-Effekts bezeichnet. Da dieser Rest ebenfalls in der *Switch*-Region liegt, ist eine Auswirkung auf die Sauerstoffbindung möglich, jedoch der genaue Vorgang nicht direkt ersichtlich. Auch das Root-Effekt Hämoglobin von *Leiostomus xanthurus* besitzt an dieser Stelle ein Isoleucin. Warum es in diesem Falle doch zur Ausprägung des Root-Effektes kommt ist unklar. Es muss daher untersucht werden, welchen Einfluss das Isoleucin an dieser Position besitzt und ob andere Mutationen in *Leiostomus xanthurus* Hämoglobin diesen Effekt aufheben könnten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der vorgeschlagene Mechanismus zur Erklärung des rudimentären Root-Effekt beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* auch an der Ausprägung des „wahren“ Root-Effekt der Hämoglobine der Knochenfische beteiligt sein könnte. Da sich die zwei Root-Effekte jedoch unterscheiden ist es sehr wahrscheinlich, dass noch weitere Aminosäuren am Root-Effekt der Knochenfische beteiligt sind. Die Richtigkeit des molekularen Schalters kann nur durch eine *in vitro* Punktmutationen bestätigt werden. Erst bei einer erfolgreichen Ausprägung des Root-Effektes beim menschlichen Hämoglobin durch Punktmutation gelten dessen minimale Strukturvoraussetzung als aufgeklärt (PERUTZ, 1996).

5.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erfolgreich die Kristallstruktur des Hämoglobins des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (HbXl) mit einer Auflösung von 2,8 Å aufgeklärt. Es handelt sich dabei um die erste und bisher einzige Kristallstruktur eines Hämoglobins aus einer Amphibie. Das Hämoglobin liegt in seiner met-Form vor und ist im R-Zustand kristallisiert. Obwohl das HbXl nur eine ca. 50%ige Gesamtsequenzidentität zu anderen Hämoglobinen aufweist, zeigt es trotz allem die typische Globinfaltung und die tetramere Struktur der Hämoglobine. Eine ungewöhnlich niedrige Haltbarkeit des Proteins wurde auf eine intermolekulare Disulfidbrücke zurückgeführt, die zu einer Verkettung der Hämoglobine führen kann. Es wurden außerdem Strukturbesonderheiten diskutiert, die in Verbindung mit der Sauerstoffaffinität des Proteins sowie dem Root-Effekt der marinen Knochenfische stehen. Das HbXl besitzt Sauerstoffbindungseigenschaften die als „rudimentärer Root-Effekt“ bezeichnet werden können und anhand der Struktur war es möglich einen strukturellen Mechanismus zu konstruieren, welcher diese speziellen Sauerstoffbindungseigenschaften des HbXl erklärt. Die Basis für diesen Mechanismus bilden die Aminosäuren α Lys38, β Ser93 und β His146. Sequenzvergleiche mit den „wahren“ Root-Effekt-Hämoglobinen der Knochenfische zeigen, dass der in dieser Arbeit vorgestellte SSchaltermechanismus auch bei den Knochenfischen eine Rolle bei der Ausprägung des Root-Effekts spielen könnte.

6 Quellenverzeichnis

- APPLEBY, C. A. (1962): *The oxygen equilibrium of leghemoglobin*. In: *Biochimica et biophysica acta*, **60**, 2: 226–235.
- ARNONE, A. & SILVA, M. M. (1993): *A third quaternary structure of human hemoglobin at 1.9- angstroms resolution*. In: *J.Biol.Chem.*, **267**: 17248–17256.
- ASHERIE, N. (2004): *Protein crystallization and phase diagrams*. In: *Methods* (San Diego, Calif.), **34**, 3: 266–272.
- ATHA, D. H. & INGHAM, K. C. (1981): *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume*. In: *The Journal of biological chemistry*, **256**, 23: 12108–12117.
- BALDWIN, J. & CHOTHIA, C. (1979): *Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism*. In: *Journal of Molecular Biology*, **129**, 2: 175–220.
- BALDWIN, J. M. (1980): *The structure of human carbonmonoxy haemoglobin at 2.7 Å resolution*. In: *Journal of Molecular Biology*, **136**, 2: 103–128.
- BANVILLE, D. & WILLIAMS, J. G. (1985): *The pattern of expression of the *Xenopus laevis* tadpole alpha-globin genes and the amino acid sequence of the three major tadpole alpha-globin polypeptides*. In: *Nucleic acids research*, **13**, 15: 5407–5421.
- BASHFORD, D., CHOTHIA, C. & LESK, A. M. (1987): *Determinants of a protein fold*. In: *Journal of Molecular Biology*, **196**, 1: 199–216.
- BAUMANN, R., MAZUR, G. & BRAUNITZER, G. (1984): *Oxygen binding properties of hemoglobin from the white rhinoceros (*β2-GLU*) and the tapir*. In: *Respiration physiology*, **56**, 1: 1–9.
- BELLELLI, A. & BRUNORI, M. (2011): *Hemoglobin allostery: variations on the theme*. In: *Biochimica et biophysica acta*, **1807**, 10: 1262–1272.
- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. (1967): *The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin*. In: *Biochemical and biophysical research communications*, **26**, 2: 162–167.
- BERENBRINK, M. (2007): *Historical reconstructions of evolving physiological complexity: O₂ secretion in the eye and swimbladder of fishes*. In: *The Journal of experimental biology*, **210**, Pt 9: 1641–1652.

-
- BERENBRINK, M., KOLDKJAER, P., KEPP, O. & COSSINS, A. R. (2005): *Evolution of oxygen secretion in fishes and the emergence of a complex physiological system*. In: Science (New York, N.Y.), **307**, 5716: 1752–1757.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. (2014): *Biochemie*. Lehrbuch, 7. Aufl., korrr. nachdr Aufl. Springer Spektrum, Berlin.
- BISWAL, B. K. & VIJAYAN, M. (2002): *Structures of human oxy- and deoxyhaemoglobin at different levels of humidity: variability in the T state*. In: Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, **58**, Pt 7: 1155–1161.
- BOECHI, L., MARTI, M. A., VERGARA, A., SICA, F., MAZZARELLA, L., ESTRIN, D. A. & MERLINO, A. (2011): *Protonation of histidine 55 affects the oxygen access to heme in the alpha chain of the hemoglobin from the Antarctic fish Trematomus bernacchii*. In: IUBMB life, **63**, 3: 175–182.
- BOHR, C., HASSELBALCH, K. & KROGH, A. (1904): *Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt*1. In: Skandinavisches Archiv für Physiologie, **16**, 2: 402–412.
- BONAMORE, A. & BOFFI, A. (2008): *Flavo-hemoglobin: structure and reactivity*. In: IUBMB life, **60**, 1: 19–28.
- BONAVENTURA, J., GILLEN, R. G. & RIGGS, A. (1974): *The hemoglobin of the crossopterygian fish, Latimeria chalumnae (Smith)*. In: Archives of Biochemistry and Biophysics, **163**, 2: 728–734.
- BRAGG, W. H. (1913): *The Reflection of X-Rays by Crystals*. In: Nature, **91**, 2280: 477.
- BRAUNITZER, G. & MATSUDA, G. (1963): *Primary structure of the alpha-chain from horse hemoglobin*. In: Journal of biochemistry, **53**: 262–263.
- BRIDGES, C. R., PELSTER, B. & SCHEID, P. (1985): *Oxygen binding in blood of Xenopus laevis (Amphibia) and evidence against Root effect*. In: Respiration physiology, **61**, 2: 125–136.
- BRITTAİN, T. (1987): *The Root effect*. In: Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, **86**, 3: 473–481.
- BRITTAİN, T. (2005): *Root effect hemoglobins*. In: Journal of inorganic biochemistry, **99**, 1: 120–129.
-

-
- BROYLES, R. H. (1981): *Changes in the Blood during Amphibian Metamorphosis*. In: GILBERT, L. I. & FRIEDEN, E. [Hrsg.]: *Metamorphosis*, 461–490. Springer US, Boston, MA.
- BRUNGER, A. T. (1992): *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. In: *Nature*, **355**, 6359: 472–475.
- BRUNORI, M. (1975): *Molecular adaptation to physiological requirements: the hemoglobin system of trout*. In: *Current topics in cellular regulation*, **9**: 1–39.
- BRUNORI, M., BELLELLI, A., GIARDINA, B., CONDO, S. & PERUTZ, M. F. (1987): *Is there a root effect in Xenopus hemoglobin?* In: *FEBS Letters*, **221**, 1: 161–166.
- BRUNORI, M., COLETTA, M. & DI CERA, E. (1986): *A cooperative model for ligand binding to biological macromolecules as applied to oxygen carriers*. In: *Biophysical chemistry*, **23**, 3-4: 215–222.
- BRUNORI, M., CONDO, S. G., BELLELLI, A., GIARDINA, B. & MICHELI, G. (1985): *Tadpole Xenopus laevis hemoglobin. Correlation between structure and functional properties*. In: *Journal of Molecular Biology*, **181**, 2: 327–329.
- BUNN, H. F. (1971): *Differences in the Interaction of 2,3-Diphosphoglycerate with Certain Mammalian Hemoglobins*. In: *Science*, **172**, 3987: 1049–1050.
- CAMARDELLA, L., CARUSO, C., D’AVINO, R., DI PRISCO, G., RUTIGLIANO, B., TAMBURRINI, M., FERMI, G. & PERUTZ, M. F. (1992): *Haemoglobin of the antarctic fish Pagothenia bernacchii. Amino acid sequence, oxygen equilibria and crystal structure of its carbonmonoxy derivative*. In: *Journal of Molecular Biology*, **224**, 2: 449–460.
- CANNATELLA, D. C. & DE SA, R. O. (1993): *Xenopus Laevis as a Model Organism*. In: *Systematic Biology*, **42**, 4: 476–507.
- CHOU, P. Y. & FASMAN, G. D. (1978): *Empirical predictions of protein conformation*. In: *Annual review of biochemistry*, **47**: 251–276.
- CIACCIO, C., COLETTA, A., DE SANCTIS, G., MARINI, S. & COLETTA, M. (2008): *Cooperativity and allostery in haemoglobin function*. In: *IUBMB life*, **60**, 2: 112–123.
- D’AVINO, R., CARUSO, C., TAMBURRINI, M., ROMANO, M., RUTIGLIANO, B., POLVERINO DE LAURETO, P., CAMARDELLA, L., CARRATORE, V. & DI PRISCO, G. (1994): *Molecular characterization of the functionally distinct hemoglobins of the Antarctic fish Trematomus newnesi*. In: *The Journal of biological chemistry*, **269**, 13: 9675–9681.
-

-
- D'AVINO, R. & DE LUCA, R. (2000): *Molecular modelling of Trematomus newnesi Hb 1: insights for a lowered oxygen affinity and lack of root effect*. In: *Proteins*, **39**, 2: 155–165.
- DAVIS, B. J. (1964): *Disc Electrophoresis - II Method and Application to Human Serum Proteins**. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, **121**, 2: 404–427.
- DEBYE, P. (1913): *Interferenz von Roentgenstrahlen und Waermebewegung*. In: *Annalen der Physik*, **348**, 1: 49–92.
- DECKER, H. & VAN HOLDE, K. E. (2011): *Oxygen and the Evolution of Life*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- DICKERSON, R. E. & GEIS, I. (1983): *Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology*. The Benjamin/Cummings series in the life sciences. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.
- DIEDERICHS, K. & KARPLUS, P. A. (1997): *Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography*. In: *Nature Structural Biology*, **4**, 4: 269–275.
- DRENTH, J. (1994): *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer advanced texts in chemistry. Springer, New York.
- EATON, W. A., HENRY, E. R., HOFRICHTER, J., BETTATI, S., VIAPPIANI, C. & MOZZARELLI, A. (2007): *Evolution of allosteric models for hemoglobin*. In: *IUBMB life*, **59**, 8-9: 586–599.
- ELKAN, E. R. (1938): *The Xenopus Pregnancy Test*. In: *British medical journal*, **2**, 4067: 1253–1274.2.
- EMILIO, M. G. & SHELTON, G. (1974): *Gas exchange and its effect on blood gas concentrations in the amphibian, Xenopus laevis*. In: *The Journal of experimental biology*, **60**, 2: 567–579.
- EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W. G. & COWTAN, K. (2010): *Features and development of Coot*. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **66**, Pt 4: 486–501.
- ERMLER, U., SIDDIQUI, R. A., CRAMM, R. & FRIEDRICH, B. (1995): *Crystal structure of the flavohemoglobin from Alcaligenes eutrophus at 1.75 Å resolution*. In: *The EMBO journal*, **14**, 24: 6067–6077.
-

-
- FEDER, M. E. & WASSERSUG, R. J. (1984): *Aerial versus aquatic oxygen consumption in larvae of the clawed frog, Xenopus laevis*. In: J. exp. Biol., **108**, 1: 231–245.
- FERMI, G. & PERUTZ, M. F. (1984): *The crystal structure of human deoxyhemoglobin at 1.74 angstroms resolution*. In: J. Mol. Biol., **175**, 2: 159–74.
- GOODMAN, M., PEDWAYDON, J., CZELUSNIAK, J., SUZUKI, T., GOTOH, T., MOENS, L., SHISHIKURA, F., WALZ, D. & VINOGRADOV, S. (1988): *An evolutionary tree for invertebrate globin sequences*. In: Journal of Molecular Evolution, **27**, 3: 236–249.
- GROVES, C. (1972): *Ceratotherium simum*. In: Mammalian species, , 8: 1–6.
- GROVES, C. P., FERNANDO, P. & ROBOVSKY, J. (2010): *The sixth rhino: a taxonomic re-assessment of the critically endangered northern white rhinoceros*. In: PloS one, **5**, 4: e9703.
- GURDON, J. B. (1962): *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. In: Journal of embryology and experimental morphology, **10**: 622–640.
- HARDISON, R. C. (1996): *A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **93**, 12: 5675–5679.
- HAYMERLE, A., KNAUER, F. & WALZER, C. (2016): *Two methods to adapt the human haemoglobin-oxygen dissociation algorithm to the blood of white rhinoceros (Ceratotherium simum) and to determine the accuracy of pulse oximetry*. In: Veterinary anaesthesia and analgesia, **43**, 5: 566–570.
- HENRY, E. R., BETTATI, S., HOFRICHTER, J. & EATON, W. A. (2002): *A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin*. In: Biophysical chemistry, **98**, 1-2: 149–164.
- HENTSCHEL, C. C., KAY, R. M. & WILLIAMS, J. G. (1979): *Analysis of Xenopus laevis globins during development and erythroid cell maturation and the construction of recombinant plasmids containing sequences derived from adult globin mRNA*. In: Developmental Biology, **72**, 2: 350–363.
- HOFFERT, J. R. & FROMM, P. O. (1970): *Quantitative aspects of glucose catabolism by rainbow and lake trout ocular tissues including alterations resulting from various pathological conditions*. In: Experimental Eye Research, **10**, 2: 263–272.

-
- INGERMANN, R. L. & TERWILLIGER, R. C. (1982): *Presence and possible function of root effect hemoglobins in fishes lacking functional swim bladders*. In: The Journal of experimental zoology, **220**, 2: 171–177.
- ITO, N., KOMIYAMA, N. H. & FERMI, G. (1995): *Structure of deoxyhaemoglobin of the antarctic fish Pagothernia bernacchii with an analysis of the structural basis of the root effect by comparison of the liganded and unliganded haemoglobin structures*. In: Journal of Molecular Biology, **250**, 5: 648–658.
- JENKINS, J. D., MUSAYEV, F. N., DANSO-DANQUAH, R., ABRAHAM, D. J. & SAFO, M. K. (2009): *Structure of relaxed-state human hemoglobin: insight into ligand uptake, transport and release*. In: Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, **65**, Pt 1: 41–48.
- KANG, D., GHO, Y. S., SUH, M. & KANG, C. (2002): *Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. In: Bulletin of the Korean Chemical Society, **23**, 11: 1511–1512.
- KANTARDJIEFF, K. A. & RUPP, B. (2003): *Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals*. In: Protein science : a publication of the Protein Society, **12**, 9: 1865–1871.
- KAY, R. M., HARRIS, R., PATIENT, R. K. & WILLIAMS, J. G. (1983): *Complete nucleotide sequence of a cloned cDNA derived from the major adult alpha-globin mRNA of X. laevis*. In: Nucleic acids research, **11**, 5: 1537–1542.
- KENDREW, J. C., BODO, G., DINTZIS, H. M., PARRISH, R. G., WYCKOPP, H. & PHILLIPS, D. C. (1958): *A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis*. In: Nature, **181**, 4610: 662–666.
- KISTER, J., BOHN, B., MARDEN, M. C. & POYART, C. (1989): *Analysis of oxygen binding by Xenopus laevis hemoglobin: Implications for the Root effect*. In: Respiration physiology, **76**, 2: 191–203.
- KNOCHEL, W., MEYERHOF, W., HUMMEL, S. & GRUNDMANN, U. (1983): *Molecular cloning and sequencing of mRNAs coding for minor adult globin polypeptides of Xenopus laevis*. In: Nucleic acids research, **11**, 5: 1543–1553.
- KOSHLAND, D. E., JR, NEMETHY, G. & FILMER, D. (1966): *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. In: Biochemistry, **5**, 1: 365–385.
-

-
- KUBO, H. (1939): *Über Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen*. In: Acta Phytochim., **11**: 195–200.
- KUHN, W. & KUHN, H. (1961): *Multiplikation von Aussalz- und anderen Einzeleffekten für die Bereitung hoher Gasdrucke in der Schwimmblase*. In: Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, **65**, 5: 426–439.
- KUMAR, S. & NUSSINOV, R. (2002): *Close-range electrostatic interactions in proteins*. In: Chembiochem : a European journal of chemical biology, **3**, 7: 604–617.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. (1982): *A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein*. In: Journal of Molecular Biology, **157**, 1: 105–132.
- LADNER, R. C., HEIDNER, E. J. & PERUTZ, M. F. (1977): *The structure of horse methaemoglobin at 2.0 Å resolution*. In: Journal of Molecular Biology, **114**, 3: 385–414.
- LAEMMLI, U. K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. In: Nature, **227**, 5259: 680–685.
- LEE, A. W. & KARPLUS, M. (1983): *Structure-specific model of hemoglobin cooperativity*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **80**, 23: 7055–7059.
- LOTTSPREICH, F. & ENGELS, J. W. [Hrsg.] (2012): *Bioanalytik*. 3. auflage Aufl. Springer Spektrum, Berlin and Heidelberg.
- LOVELL, S. C., DAVIS, I. W., ARENDALL, W. B. R., DE BAKKER, PAUL I W, WORD, J. M., PRISANT, M. G., RICHARDSON, J. S. & RICHARDSON, D. C. (2003): *Structure validation by C α geometry: phi, psi and C β deviation*. In: Proteins, **50**, 3: 437–450.
- MACLEAN, N. & JURD, R. D. (1971): *The haemoglobins of healthy and anaemic Xenopus laevis*. In: Journal of cell science, **9**, 2: 509–528.
- MATTHEWS, B. W. (1968): *Solvent content of protein crystals*. In: Journal of Molecular Biology, **33**, 2: 491–497.
- MAZUR, G., BRAUNITZER, G. & WRIGHT, P. G. (1982): *The primary structure of the hemoglobin from a white rhinoceros (Ceratotherium simum, perissodactyla): beta 2 Glu*. In: Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, **363**, 9: 1077–1085.

-
- MAZZARELLA, L., BONOMI, G., LUBRANO, M. C., MERLINO, A., RICCIO, A., VERGARA, A., VITAGLIANO, L., VERDE, C. & DI PRISCO, G. (2006a): *Minimal structural requirements for root effect: crystal structure of the cathodic hemoglobin isolated from the antarctic fish Trematomus newnesi*. In: *Proteins*, **62**, 2: 316–321.
- MAZZARELLA, L., D'AVINO, R., DI PRISCO, G., SAVINO, C., VITAGLIANO, L., MOODY, P. C. & ZAGARI, A. (1999): *Crystal structure of Trematomus newnesi haemoglobin re-opens the root effect question*. In: *Journal of Molecular Biology*, **287**, 5: 897–906.
- MAZZARELLA, L., VERGARA, A., VITAGLIANO, L., MERLINO, A., BONOMI, G., SCALA, S., VERDE, C. & DI PRISCO, G. (2006b): *High resolution crystal structure of deoxy hemoglobin from Trematomus bernacchii at different pH values: the role of histidine residues in modulating the strength of the root effect*. In: *Proteins*, **65**, 2: 490–498.
- MERRIL, C. R. (1990): *Gel-staining techniques*. In: *Methods in enzymology*, **182**: 477–488.
- MESSERSCHMIDT, A. [Hrsg.] (2011): *Handbook of metalloproteins*. Wiley, Chichester.
- MEYERHOF, W., KLINGER-MITROPOULOS, S., STALDER, J., WEBER, R. & KNOCHEL, W. (1984): *The primary structure of the larval beta 1-globin gene of Xenopus laevis and its flanking regions*. In: *Nucleic acids research*, **12**, 20: 7705–7719.
- MILLER, W. H. (1839): *A treatise on crystallography*. For J. & JJ. Deighton.
- MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J.-P. (1965): *On the nature of allosteric transitions: A plausible model*. In: *Journal of Molecular Biology*, **12**, 1: 88–118.
- MOSS, B. & INGRAM, V. M. (1968): *Hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis*. In: *Journal of Molecular Biology*, **32**, 3: 481–492.
- MUESER, T. C., ROGERS, P. H. & ARNONE, A. (2000): *Interface sliding as illustrated by the multiple quaternary structures of liganded hemoglobin*. In: *Biochemistry*, **39**, 50: 15353–15364.
- MYLVAGANAM, S. E., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. & GETZOFF, E. D. (1996): *Structural basis for the root effect in haemoglobin*. In: *Nature structural biology*, **3**, 3: 275–283.
- NAGAI, K., PERUTZ, M. F. & POYART, C. (1985): *Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 21: 7252–7255.

-
- ORNSTEIN, L. (1964): *Disc electrophoresis-I Background and theory**. In: Annals of the New York Academy of Sciences, **121**, 2: 321–349.
- OWEN-SMITH, N. (1971): *Territoriality in the white rhinoceros (Ceratotherium simum) Burchell*. In: Nature, **231**, 5301: 294–296.
- PAIRET, B. & JAENICKE, E. (2010): *Structure of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig in the R2-state*. In: PloS one, **5**, 8: e12389.
- PATIENT, R. K., HARRIS, R., WALMSLEY, M. E. & WILLIAMS, J. G. (1983): *The complete nucleotide sequence of the major adult beta globin gene of Xenopus laevis*. In: The Journal of biological chemistry, **258**, 14: 8521–8523.
- PAUL, R. J. (2001): *Physiologie der Tiere: Systeme und Stoffwechsel ; 15 Tabellen*. Thieme, Stuttgart.
- PERUTZ, M. F. (1970): *Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem-Haem Interaction and the Problem of Allostery*. In: Nature, **228**, 5273: 726–734.
- PERUTZ, M. F. (1972): *Nature of haem-haem interaction*. In: Nature, **237**, 5357: 495–499.
- PERUTZ, M. F. (1989): *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins*. In: Quarterly reviews of biophysics, **22**, 2: 139–237.
- PERUTZ, M. F. (1996): *Cause of the Root effect in fish haemoglobins*. In: Nature Structural Biology, **3**, 3: 211–212.
- PERUTZ, M. F. & BRUNORI, M. (1982): *Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian haemoglobins*. In: Nature, **299**, 5882: 421–426.
- PERUTZ, M. F., MUIRHEAD, H., COX, J. M. & GOAMAN, L. C. (1968): *Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model*. In: Nature, **219**, 5150: 131–139.
- PERUTZ, M. F., ROSSMANN, M. G., CULLIS, A. F., MUIRHEAD, H., WILL, G. & NORTH, A. C. T. (1960): *Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis*. In: Nature, **185**, 4711: 416–422.
- PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J., PAOLI, M. & DODSON, G. G. (1998): *The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited*. In: Annual review of biophysics and biomolecular structure, **27**: 1–34.
-

-
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C. & FERRIN, T. E. (2004): *UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis*. In: Journal of computational chemistry, **25**, 13: 1605–1612.
- RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. (1963): *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. In: Journal of Molecular Biology, **7**: 95–99.
- RIGGS, A. (1991): *Aspects of the Origin and Evolution of Non-Vertebrate Hemoglobins*. In: American Zoologist, **31**, 3: 535–545.
- RIGGS, A. F. (1988): *The Bohr effect*. In: Annual review of physiology, **50**: 181–204.
- ROLLEMA, H. S. & BAUER, C. (1979): *The interaction of inositol pentaphosphate with the hemoglobins of highland and lowland geese*. In: The Journal of biological chemistry, **254**, 23: 12038–12043.
- ROOT, R. W. (1931): *The Respiratory Function of the Blood of Marine Fishes*. In: The Biological Bulletin, **61**, 3: 427–456.
- ROSSMANN, M. G. (1990): *The molecular replacement method*. In: Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography, **46**, 2: 73–82.
- ROSSMANN, M. G. & BLOW, D. M. (1962): *The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit*. In: Acta Crystallographica, **15**, 1: 24–31.
- RUMMER, J. L., MCKENZIE, D. J., INNOCENTI, A., SUPURAN, C. T. & BRAUNER, C. J. (2013): *Root effect hemoglobin may have evolved to enhance general tissue oxygen delivery*. In: Science (New York, N.Y.), **340**, 6138: 1327–1329.
- SAFO, M. K. & ABRAHAM, D. J. (2002): *A Fourth Quaternary Structure of Human Hemoglobin A at 2.18 Å Resolution*.
- SAFO, M. K. & ABRAHAM, D. J. (2005): *A novel quaternary structure of human carbonmonoxy hemoglobin*.
- SAFO, M. K., AHMED, M. H., GHATGE, M. S. & BOYIRI, T. (2011): *Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level*. In: Biochimica et biophysica acta, **1814**, 6: 797–809.
- SARAGUSTY, J., DIECKE, S., DRUKKER, M., DURRANT, B., FRIEDRICH BEN-NUN, I., GALLI, C., GORITZ, F., HAYASHI, K., HERMES, R., HOLTZE, S., JOHNSON, S.,

-
- LAZZARI, G., LOI, P., LORING, J. F., OKITA, K., RENFREE, M. B., SEET, S., VORACEK, T., STEJSKAL, J., RYDER, O. A. & HILDEBRANDT, T. B. (2016): *Rewinding the process of mammalian extinction*. In: *Zoo biology*, **35**, 4: 280–292.
- SCHMIDT-NEILSEN, K. & LARIMER, J. L. (1958): *Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size*. In: *The American journal of physiology*, **195**, 2: 424–428.
- SCHOLANDER, P. F. & VAN DAM, L. (1954): *Secretion of Gases against high Pressures in the Swimbladder of Deep Sea Fishes O. Oxygen Dissociation in Blood*. In: *The Biological Bulletin*, **107**, 2: 247–259.
- SCHUMACHER, M. A., ZHELEZNOVA, E. E., POUNDSTONE, K. S., KLUGER, R., JONES, R. T. & BRENNAN, R. G. (1997): *Allosteric intermediates indicate R2 is the liganded hemoglobin end state*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 15: 7841–7844.
- SEE, Y. P., OLLEY, P. M. & JACKOWSKI, G. (1985): *The effects of high salt concentrations in the samples on molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. In: *Electrophoresis*, **6**, 8: 382–387.
- SHAANAN, B. (1983): *Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution*. In: *Journal of Molecular Biology*, **171**, 1: 31–59.
- SILVA, M. M., ROGERS, P. H. & ARNONE, A. (1992): *A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution*. In: *The Journal of biological chemistry*, **267**, 24: 17248–17256.
- SLATER, P. G., HAYRAPETIAN, L. & LOWERY, L. A. (2017): *Xenopus laevis as a model system to study cytoskeletal dynamics during axon pathfinding*. In: *genesis*, **55**, 1-2: e22994.
- SMITH, F. R., LATTMAN, E. E. & CARTER, C. W., JR (1991): *The mutation beta 99 Asp-Tyr stabilizes Y-a new, composite quaternary state of human hemoglobin*. In: *Proteins*, **10**, 2: 81–91.
- SRINIVASAN, R. & ROSE, G. D. (1994): *The T-to-R transformation in hemoglobin: a reevaluation*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 23: 11113–11117.
- STOUT, G. H. & JENSEN, L. H. (1989): *X-ray structure determination: A practical guide*. Wiley-interscience publication, 2. ed. Aufl. Wiley, New York.

-
- SULLIVAN, B. (1974): *Amphibian hemoglobins*. In: Chemical Zoology, **9**: 77–122.
- SZABO, A. & KARPLUS, M. (1972): *A mathematical model for structure-function relations in hemoglobin*. In: Journal of Molecular Biology, **72**, 1: 163–197.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. (2006): *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. In: Cell, **126**, 4: 663–676.
- TAN, S., TAN, H. T. & CHUNG, M. C. M. (2008): *Membrane proteins and membrane proteomics*. In: Proteomics, **8**, 19: 3924–3932.
- TAYLOR, G. (2003): *The phase problem*. In: Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, **59**, 11: 1881–1890.
- TERWILLIGER, N. B. (1998): *Functional adaptations of oxygen-transport proteins*. In: The Journal of experimental biology, **201**, Pt 8: 1085–1098.
- TEXTOR, M. (2011): *Röntgenkristallographische Strukturbestimmung und funktionelle Charakterisierung des Hämoglobins von Lama pacos*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- TORRACCA, A. M. V., RASCHETTI, R., SALVIOLI, R., RICCIARDI, G. & WINTERHALTER, K. (1977): *Modulation of the root effect in goldfish by ATP and GTP*. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, **496**, 2: 367–373.
- TOUGARD, C., DELEFOSSE, T., HANNI, C. & MONTGELARD, C. (2001): *Phylogenetic relationships of the five extant Rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes*. In: Molecular phylogenetics and evolution, **19**, 1: 34–44.
- TYUMA, I., IMAI, K. & SHIMIZU, K. (1973): *Analysis of oxygen equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic phosphates*. In: Biochemistry, **12**, 8: 1491–1498.
- VAGIN, A. & TEPLYAKOV, A. (2010): *Molecular replacement with MOLREP*. In: Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, **66**, Pt 1: 22–25.
- VAGIN, A. A., STEINER, R. A., LEBEDEV, A. A., POTTERTON, L., MCNICHOLAS, S., LONG, F. & MURSHUDOV, G. N. (2004): *REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use*. In: Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, **60**, Pt 12 Pt 1: 2184–2195.
- VAN HOLDE, K. E., MILLER, K. I. & DECKER, H. (2001): *Hemocyanins and invertebrate evolution*. In: The Journal of biological chemistry, **276**, 19: 15563–15566.

-
- VAN KAMPEN, E. J. & ZIJLSTRA, W. G. (1983): *Spectrophotometry of Hemoglobin and Hemoglobin Derivatives*. In: *Advances in Clinical Chemistry Volume 23, Advances in Clinical Chemistry*, Bd. 23, 199–257. Elsevier.
- VERDE, C., VERGARA, A., GIORDANO, D., MAZZARELLA, L. & DI PRISCO, G. (2007): *The Root effect – a structural and evolutionary perspective*. In: *Antarctic Science*, **19**, 02: 271.
- VERGARA, A., VITAGLIANO, L., MERLINO, A., SICA, F., MARINO, K., VERDE, C., DI PRISCO, G. & MAZZARELLA, L. (2010): *An order-disorder transition plays a role in switching off the root effect in fish hemoglobins*. In: *The Journal of biological chemistry*, **285**, 42: 32568–32575.
- VOET, D. J., VOET, J. G., PRATT, C. W., BECK-SICKINGER, A. G., HAHN, U. & HÄCKER, B. [Hrsg.] (2010): *Lehrbuch der Biochemie*. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Aufl. Wiley-VCH-Verl., Weinheim.
- WALLER, I. (1923): *Zur Frage der Einwirkung der Wärmebewegung auf die Interferenz von Röntgenstrahlen*. In: *Z. Physik (Zeitschrift für Physik)*, **17**, 1: 398–408.
- WEBER, R. E. & WELLS, R. M. (1989): *Hemoglobin structure and function*. In: *Lung biology in health and disease*, **Marcel Dekker, Inc.**
- WEST, J. B. (2012): *Respiratory physiology: The essentials*. 9. Aufl. Aufl. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- WILLIAMS, J. G., KAY, R. M. & PATIENT, R. K. (1980): *The nucleotide sequence of the major β -globin mRNA from *Xenopus laevis**. In: *Nucleic Acids Research*, **8**, 18: 4247–4258.
- WINN, M. D., BALLARD, C. C., COWTAN, K. D., DODSON, E. J., EMSLEY, P., EVANS, P. R., KEEGAN, R. M., KRISINEL, E. B., LESLIE, A. G. W., MCCOY, A., MCNICHOLAS, S. J., MURSHUDOV, G. N., PANNU, N. S., POTTERTON, E. A., POWELL, H. R., READ, R. J., VAGIN, A. & WILSON, K. S. (2011): *Overview of the CCP4 suite and current developments*. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **67**, Pt 4: 235–242.
- WITTENBERG, J. B. & HAEDRICH, R. L. (1974): *The choroid rete mirabile of the fish eye. II. Distribution and relation to the pseudobranch and to the swimbladder rete mirabile*. In: *The Biological Bulletin*, **146**, 1: 137–156.

YONETANI, T. & TSUNESHIGE, A. (2003): *The global allostery model of hemoglobin: an allosteric mechanism involving homotropic and heterotropic interactions*. In: *Comptes rendus biologiques*, **326**, 6: 523–532.

YUAN, Y., TAM, M. F., SIMPLACEANU, V. & HO, C. (2015): *New look at hemoglobin allostery*. In: *Chemical reviews*, **115**, 4: 1702–1724.

Internetquellen

¹ : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gemeiner_Krallenfrosch_-_Xenopus_laevis_-_aus_Afrika_ArM.jpg Datum: 28.04.2017

²: <http://www.flickr.com/photos/jamestemple/312326185/> - Datum: 28.04.2017

7 Anhang

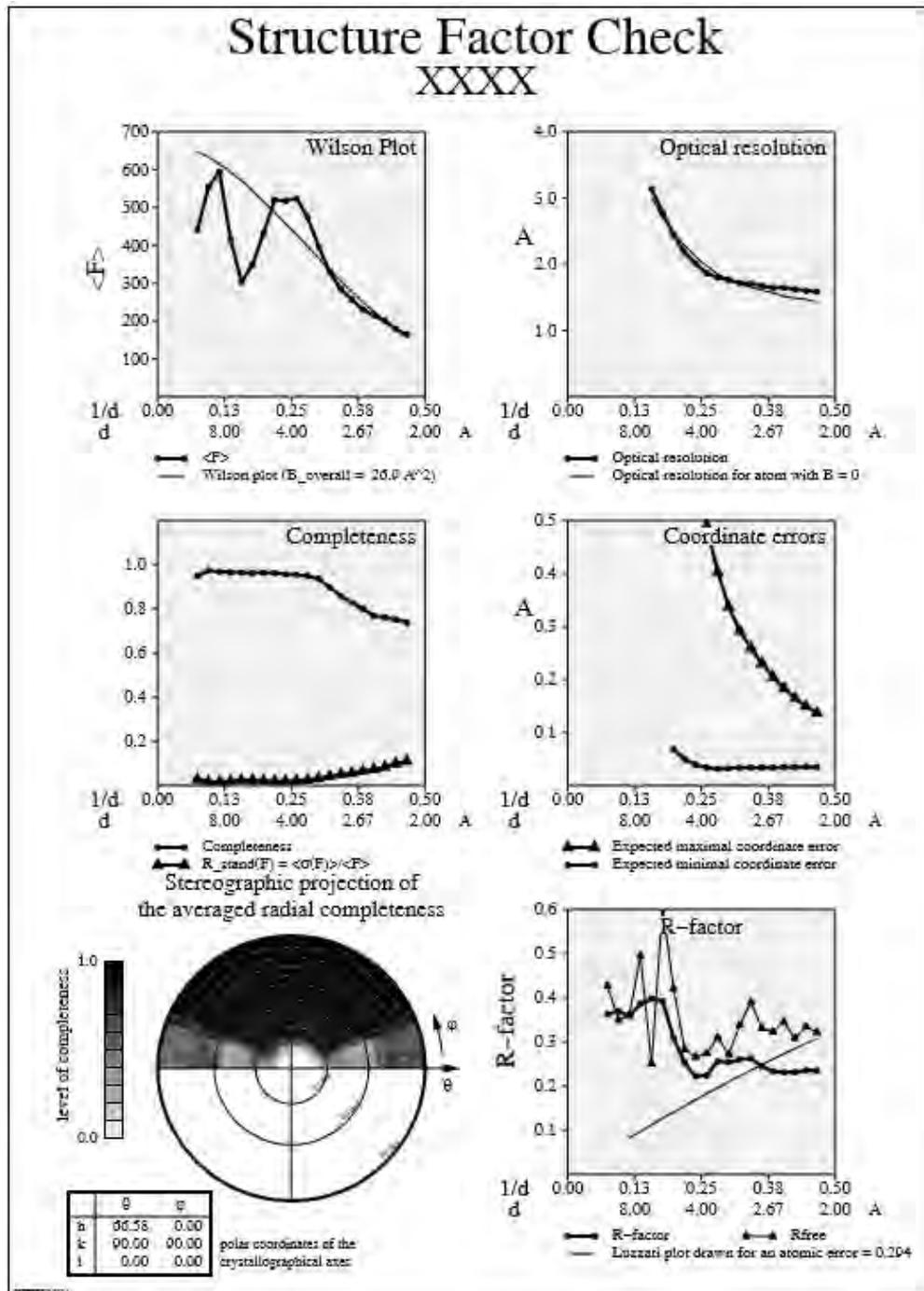


Abbildung 58: SFCHECK Ergebnis der HbCs Kristallstruktur - Seite 2 - Fortsetzung aus Kapitel 4.1

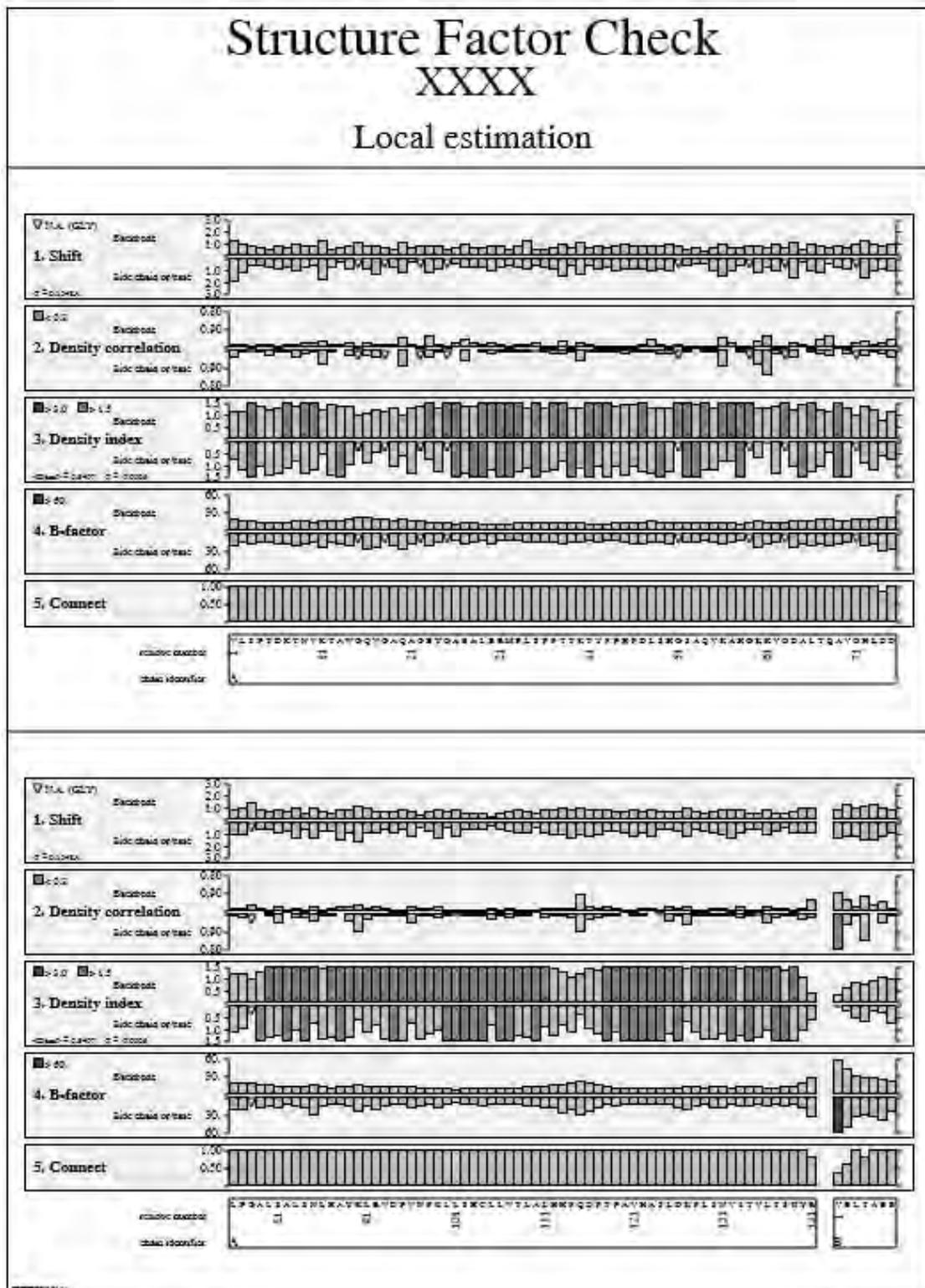


Abbildung 59: SFCHECK Ergebnis der HbCs Kristallstruktur - Seite 3.

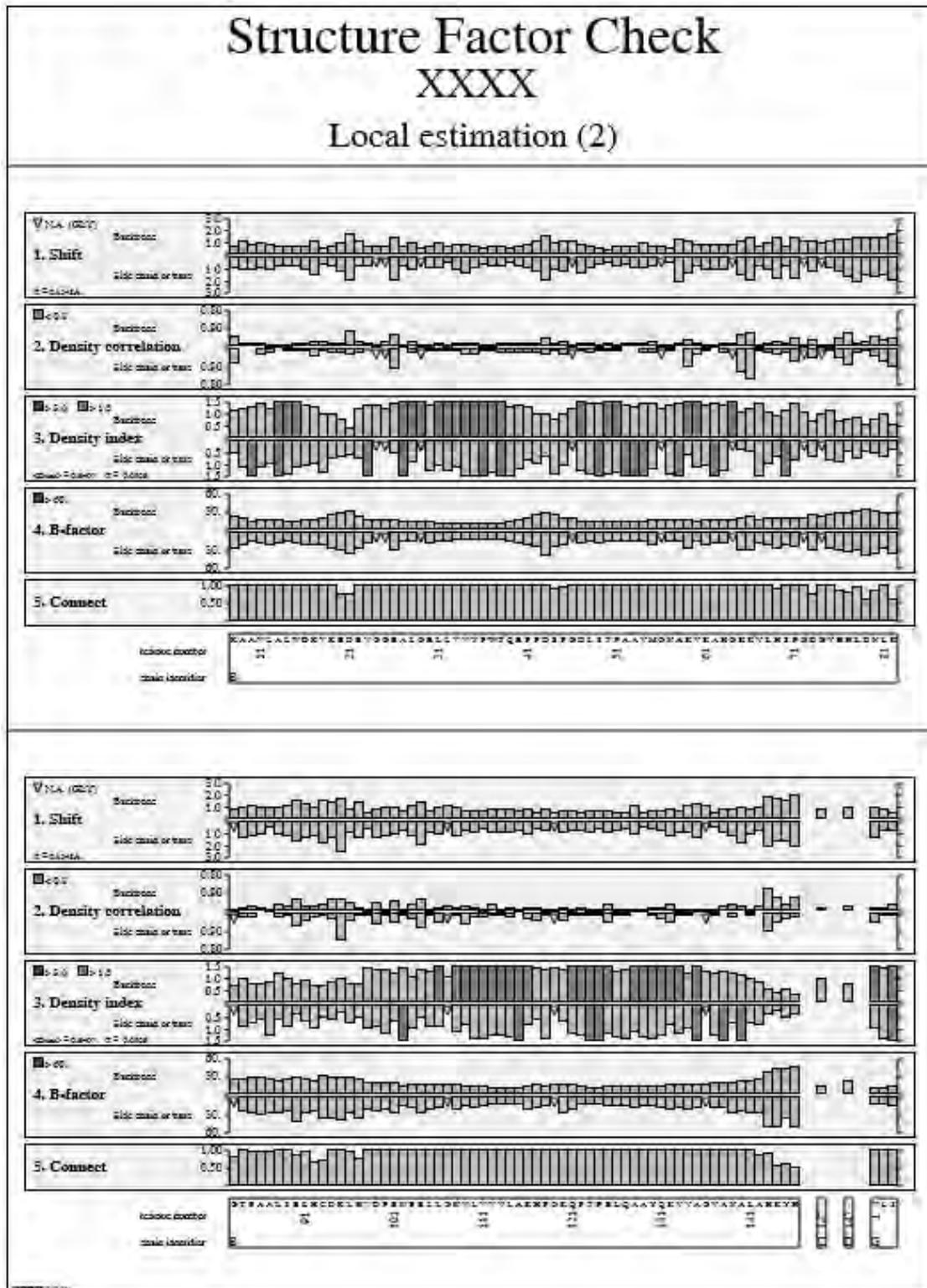


Abbildung 60: SFCHECK Ergebnis der HbCs Kristallstruktur - Seite 4.

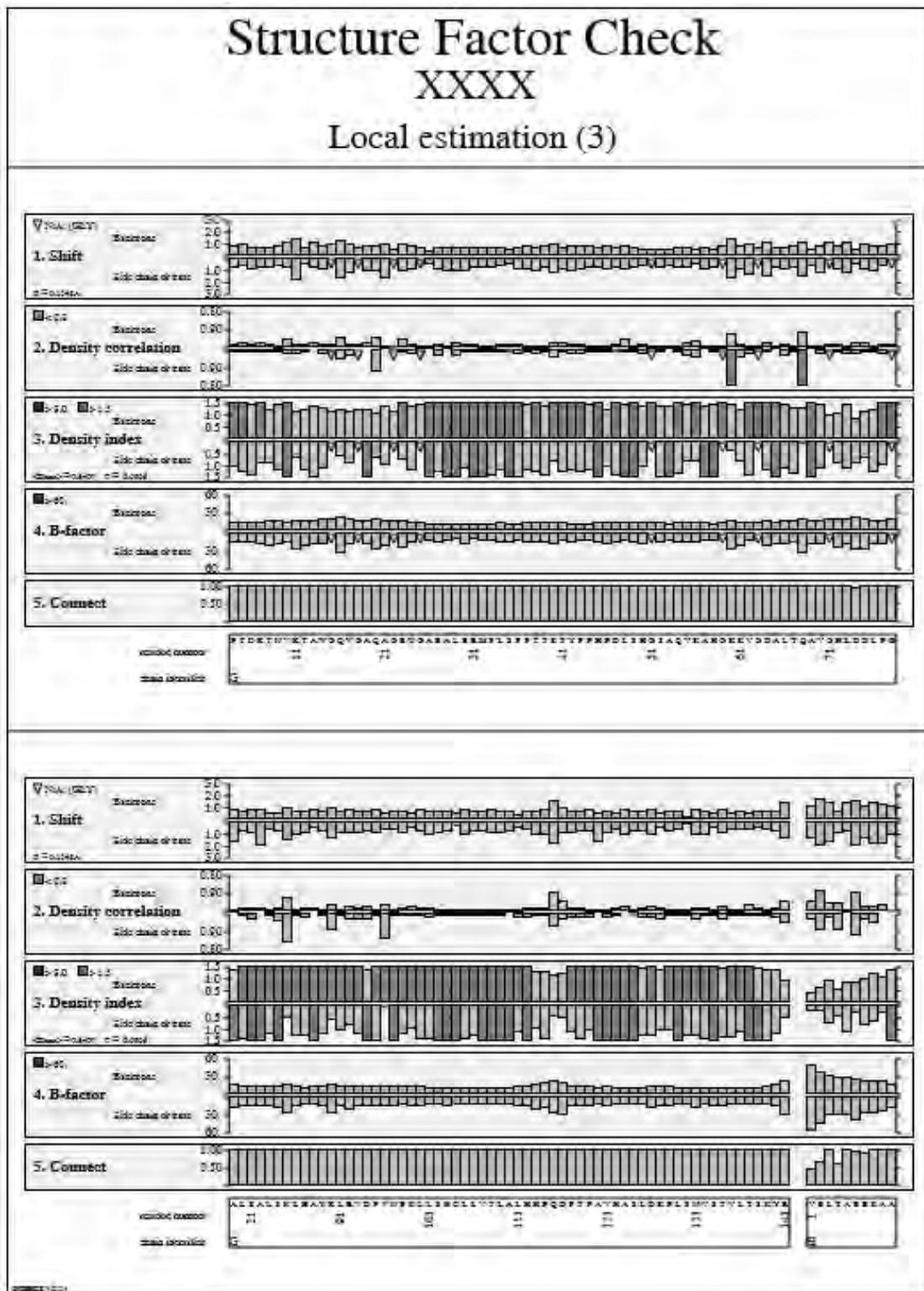


Abbildung 61: SFCHECK Ergebnis der HbCs Kristallstruktur - Seite 5.

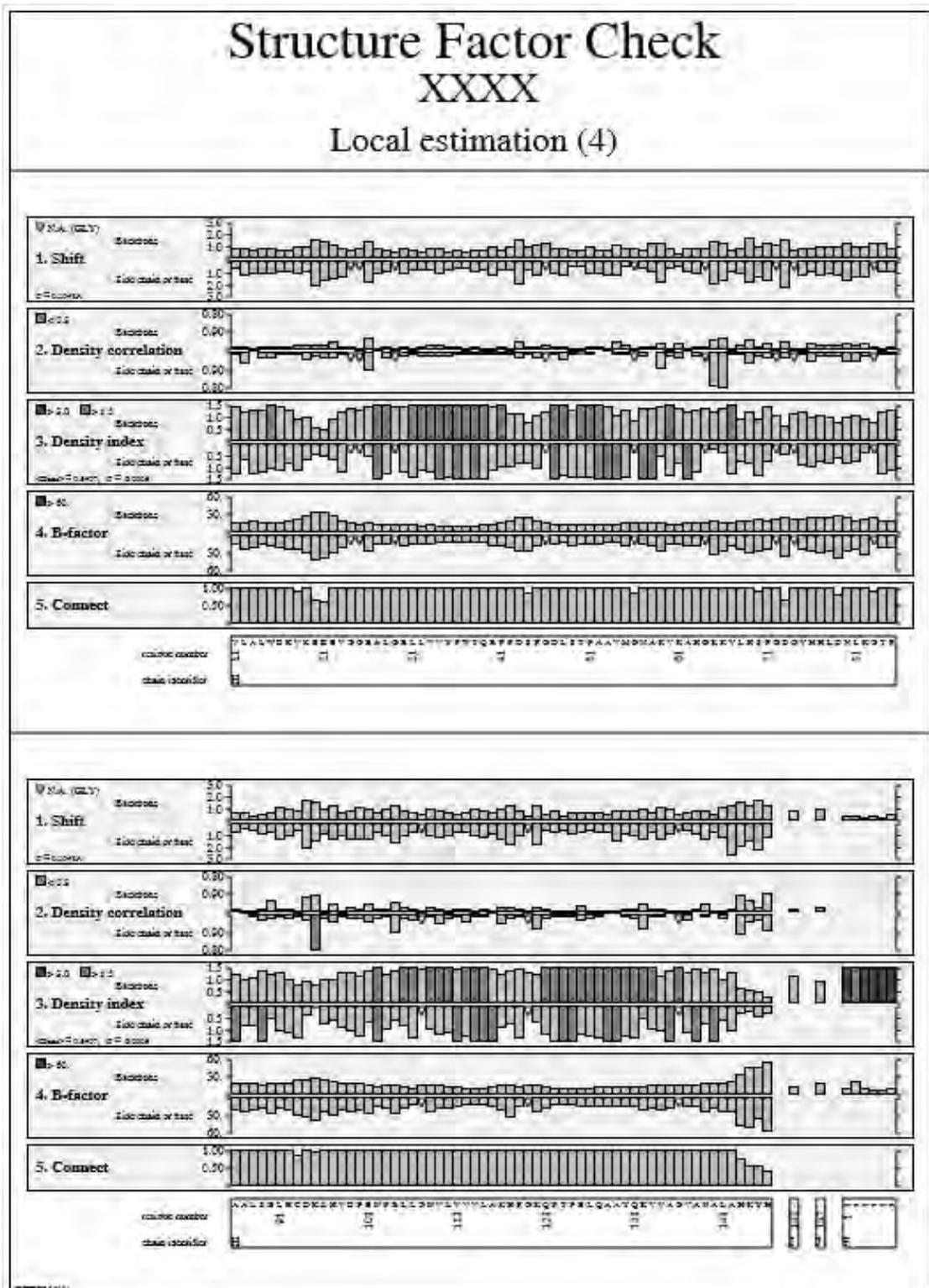


Abbildung 62: SFCHECK Ergebnis der HbCs Kristallstruktur - Seite 6.

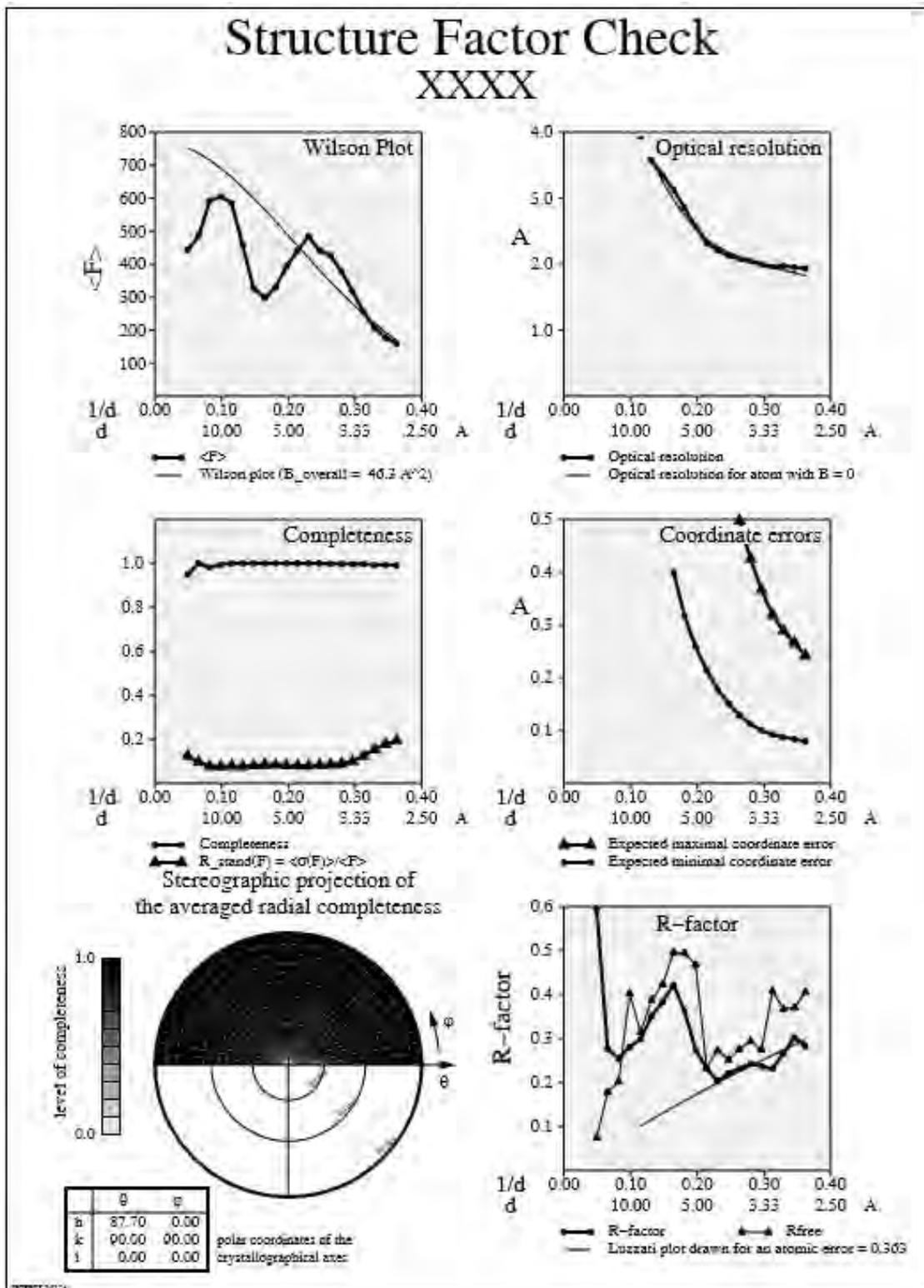


Abbildung 63: SFCHECK Ergebnis der HbX1 Kristallstruktur - Seite 2 - Fortsetzung aus Kapitel 5.1

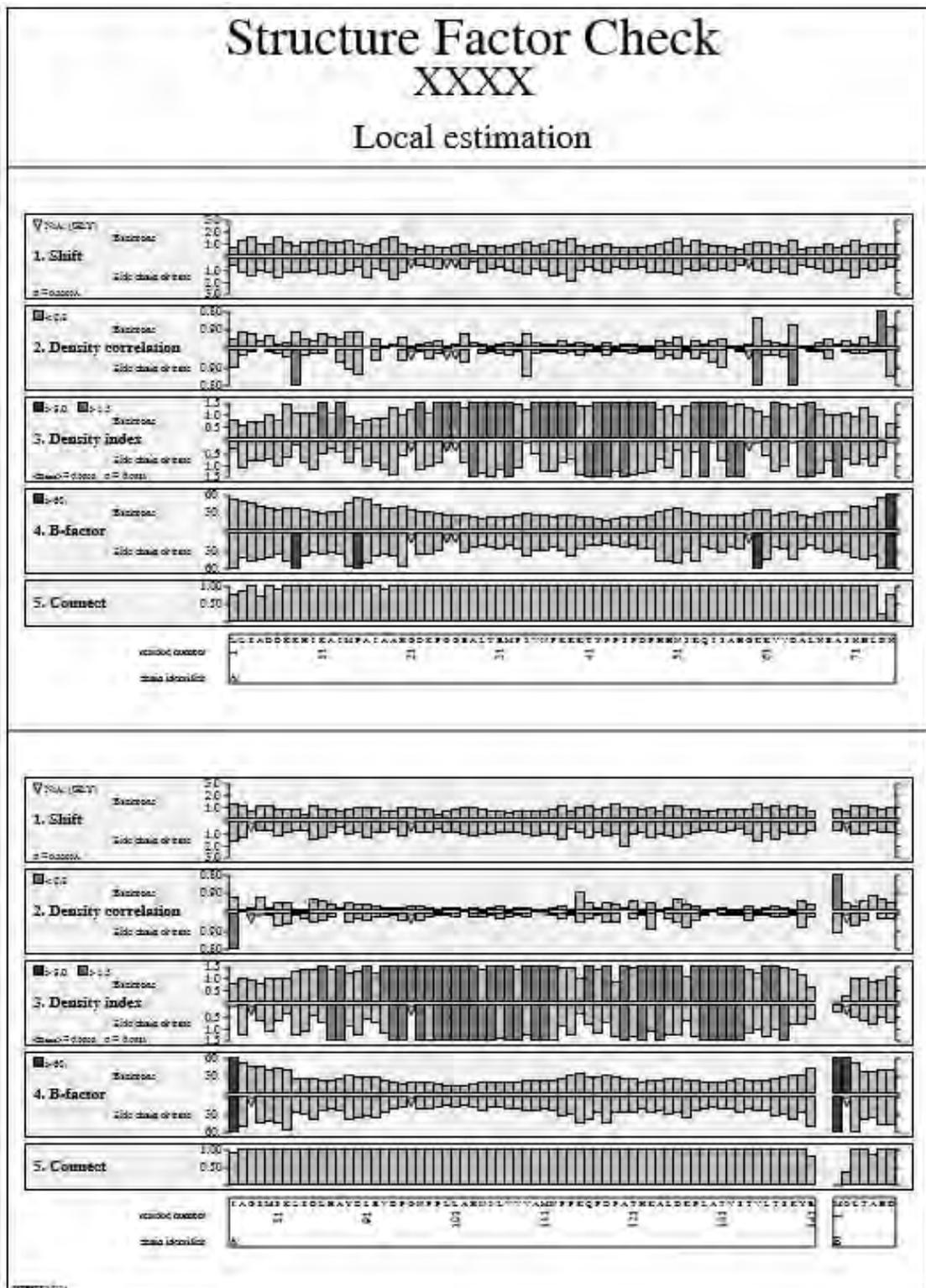


Abbildung 64: SFCHECK Ergebnis der HbX1 Kristallstruktur - Seite 3

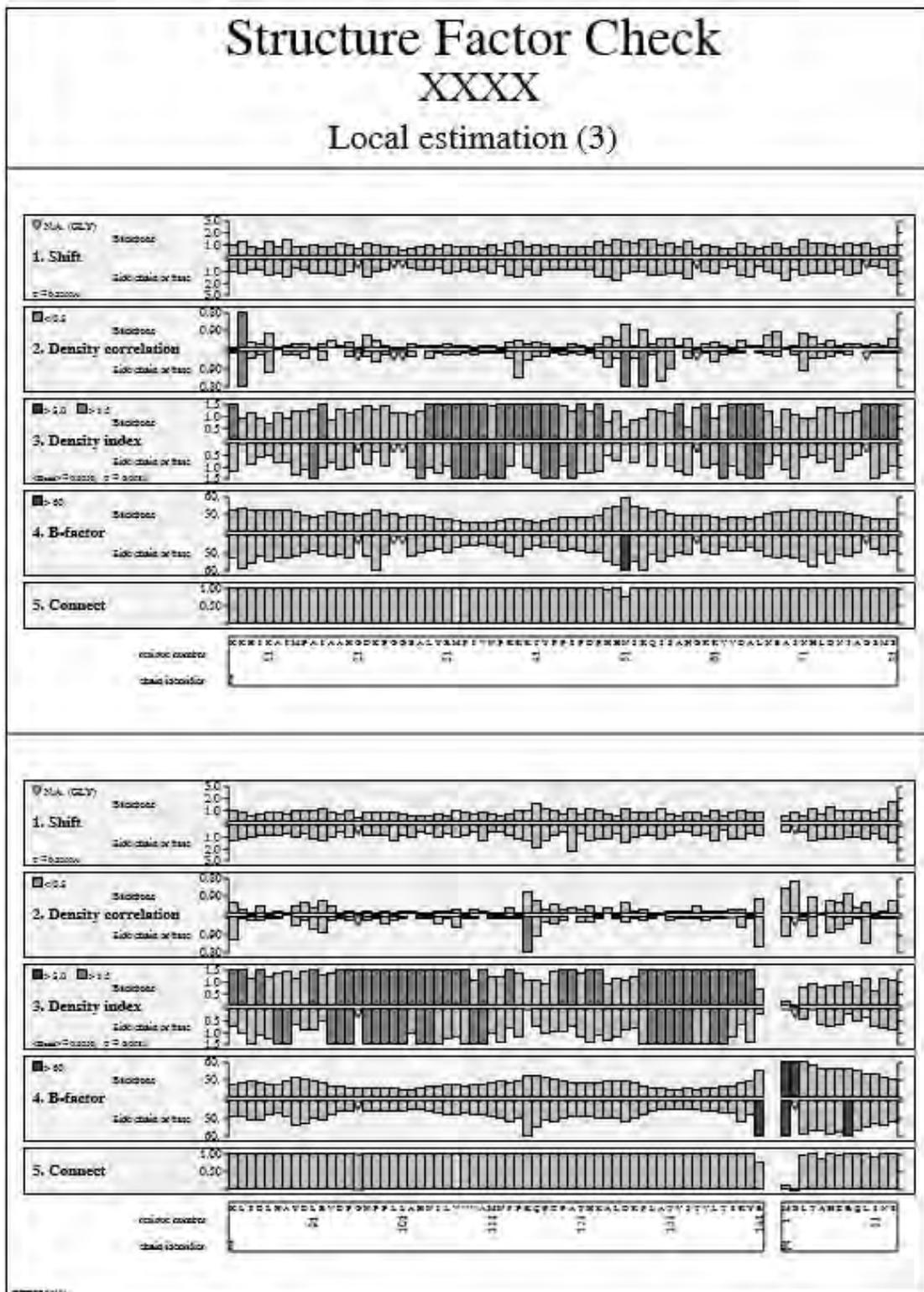


Abbildung 66: SFCHECK Ergebnis der HbX1 Kristallstruktur - Seite 5

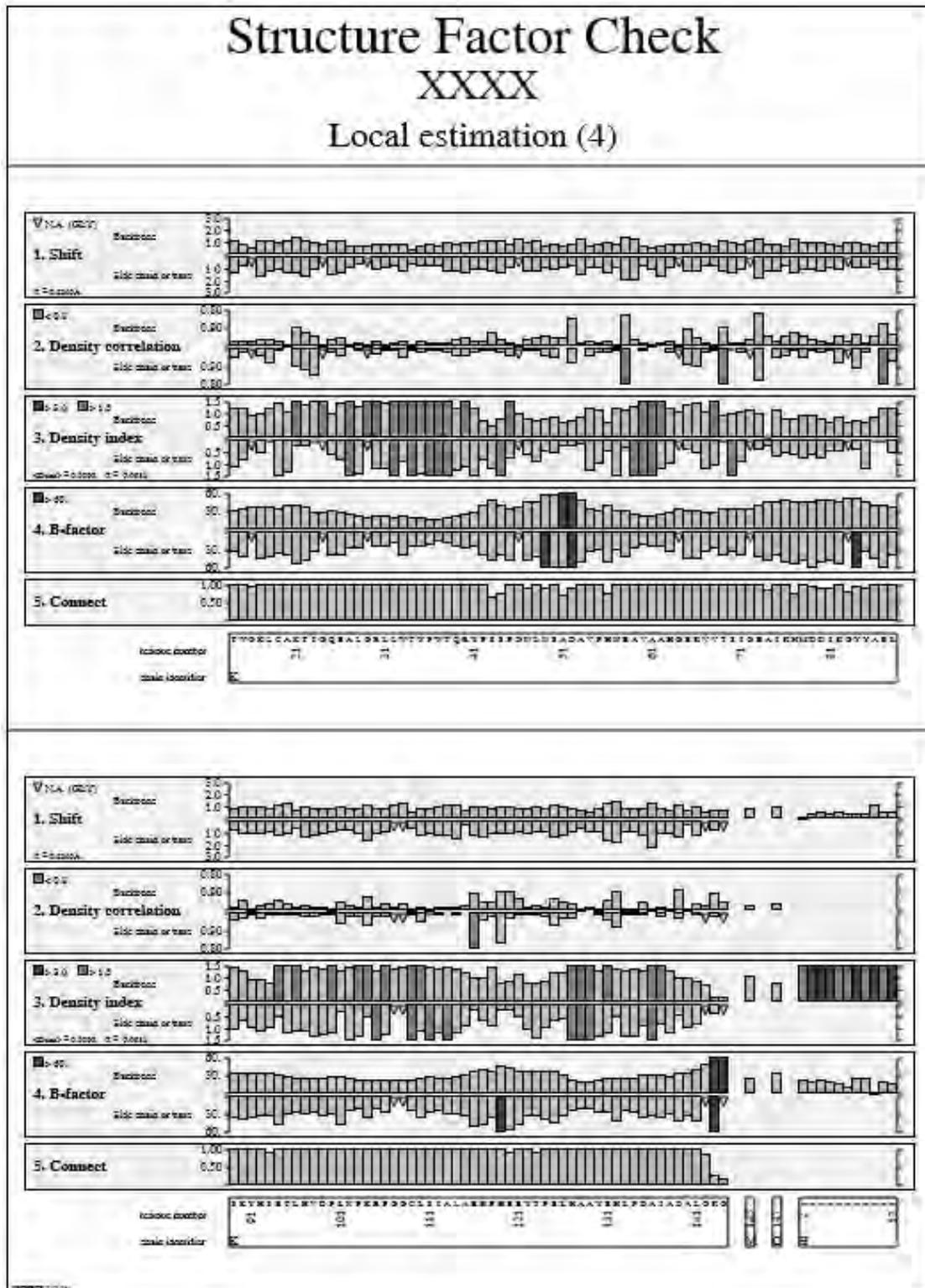


Abbildung 67: SFCHECK Ergebnis der HbX1 Kristallstruktur - Seite 6

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Mainz, den 19. Juni 2017

Juliane Schmidt

Copyright

Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtlich geschützt und Eigentum der AG Biophysik des Instituts für Molekulare Physiologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.