

BIOPHYSICAL STUDIES ON THE DYNAMICS OF  
HEMOGLOBIN A SUBUNITS AND MYOGLOBIN  
FROM SPERM WHALE AND ASIAN ELEPHANT

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Urs Rolf Hiltpold  
Dipl. Natw. ETH  
born 11th July 1956  
citizen of Zurich and Schinznach-Dorf (AG)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, examiner  
Prof. Dr. P.L. Luisi, co-examiner  
Dr. E.E. Di Iorio, co-examiner

1992



## SUMMARY

This thesis reports the low temperature carbon monoxide recombination kinetics after photolysis of the isolated  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits from human hemoglobin as well as to Elephant (*Elephas maximus*) and Sperm whale (*Physeter catodon*) myoglobin. Two different cosolvents have been used for the measurements, i.e. ethylene glycol and glycerol. Parallel investigations on the light absorption properties of the two hemoglobin subunits and on Elephant myoglobin, in the carbonyl form, have also been performed between 10 and 300 K, using the same solution conditions as for the kinetic measurements. Analogous data from the literature on Sperm whale myoglobin [Cordone et al., 1988] are also reported for comparative purposes.

For the low temperature flash photolysis data, an analysis on the basis of the pluri-conformational substates model has been performed [Austin et al., 1975; Di Iorio et al., 1991]. Within this model the non exponential kinetics observed at cryogenic temperatures are assumed to arise from a structural heterogeneity of the protein which reflects its room temperature structural fluctuations.

The optical spectra were deconvoluted in gaussian components and the temperature dependence of the deconvoluted bands was analyzed on the basis of a harmonic model for the coupling of the optical electrons and the nearby nuclei [Markham, 1959].

The analysis of the kinetic and spectroscopic data indicate that each of the proteins investigated displays specific features both intrinsically and in terms of susceptibility to changes of the solvent composition. The two experimental approaches used in this investigation provide converging information on the structural and dynamic properties at the active site of the various proteins analyzed. Particularly relevant is a correlation between broadening of the absorption bands and the width of the activation enthalpy distributions for ligand binding, which emerges from our measurements.

## ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Dissertation wird die Kinetik des Wiederbindens von Kohlenmonoxid bei tiefen Temperaturen nach Blitzphotolyse an isolierte  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten von menschlichem Hämoglobin und des Weiteren an Elefanten- (*Elephas Maximus*) und Pottwal- (*Physeter Catodon*) Myoglobin untersucht. Für die Messungen wurden Glycerin und Ethylenglycol als Frostschutz eingesetzt. Parallele Untersuchungen des Temperaturverhaltens der Absorptionsspektren im Sichtbaren der Carboxylderivate der beiden Hämoglobinuntereinheiten und von Elefantenmyoglobin wurden ebenso bei Temperaturen zwischen 10 und 300 K mit den gleichen Lösungsmittelzusammensetzungen durchgeführt. Zum Vergleich wurden analoge Resultate aus der Literatur über Pottwalmyoglobin [Cordone et al., 1988] herangezogen.

Die Analyse der Messdaten der Tieftemperatur-Blitzphotolyse Experimente wurde auf der Basis des Modells der mehrfachen konformationellen Unterzustände [Austin et al., 1975; Di Iorio et al., 1991] durchgeführt. Darin wird angenommen, dass die nicht-exponentielle Kinetik, welche bei tiefen Temperaturen beobachtet wird, durch die strukturelle Heterogenität des Proteins hervorgerufen wird, welche die Fluktuationen der Struktur bei Raumtemperatur widerspiegelt.

Die Absorptionsspektren wurden in Gauss'sche Komponenten zerlegt und die Temperaturabhängigkeit der erhaltenen Banden nach einem harmonischen Modell für die Wechselwirkung der optischen Elektronen mit den benachbarten Atomkernen [Markham, 1959] analysiert.

Die Analyse der kinetischen und spektroskopischen Daten zeigt für jedes der untersuchten Proteine spezifische Eigenschaften, auch in Bezug auf den Einfluss von Änderungen der Lösungsmittelzusammensetzung. Die beiden experimentellen Anordnungen dieser Untersuchung liefern zusammenführende Informationen über Eigenschaften der Struktur und Dynamik um die aktive Stelle der analysierten Proteine. Von besonderer Bedeutung ist die aus den Messungen hervorgehende Wechselbeziehung der Verbreiterung der Absorptionsbanden mit der Breite der Verteilungen der Aktivierungsenergie des Ligandbindens.