

- 10 Gearhart, P. J., Johnson, N. D., Douglas, R. & Hood, L. (1981) *Nature (London)* 291, 29-34.
- 11 Pawlita, M., Rudikoff, S. & Potter, M. (1982) *J. Immunol.*, in press.
- 12 Cramer, M. & Braun, D. G. (1974) *J. Exp. Med.* 139, 1513-1528.
- 13 Galfré, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. & Howard, J. C. (1977) *Nature (London)* 266, 550-552.
- 14 Shulman, M., Wilde, C. D. & Köhler, G. (1978) *Nature (London)* 276, 269-270.
- 15 Herbst, H. & Braun, D. G. (1981) *Ann. Immunol. (Paris)* 132C, 87-100.
- 16 Ouchterlony, Ö. (1962) *Progr. Allergy* 6, 30-154.
- 17 Huser, H. & Braun, D. G. (1979) *Scand. J. Immunol.* 9, 105-114.
- 18 Hirs, C. W. H. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 197-199.
- 19 O'Donnell, I. J., Frangione, B. & Porter, R. (1970) *Biochem. J.* 116, 261-268.
- 20 Chang, J. Y. (1981) *Biochem. J.* 199, 537-545.
- 21 Gross, E. & Withop, B. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1510-1511.
- 22 Edman, G. & Hegg, P. (1967) *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91.
- 23 Wittmann-Liebold, B. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1415-1431.
- 24 Braun, D. G., Huser, H., Knecht, R. & Wright, J. K. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 663-677.
- 25 Zimmermann, C. L., Appella, E. & Pisano, J. J. (1977) *Anal. Biochem.* 77, 569-573.
- 26 Svasti, J. & Milstein, C. (1972) *Biochem. J.* 128, 427-444.
- 27 Hamlyn, P. H., Brownlee, G. G., Cheng, C. C., Gait, M. J. & Milstein, C. (1978) *Cell* 15, 1067-1075.
- 28 Gray, W. R., Dreyer, W. J. & Hood, L. (1967) *Science* 155, 465-467.
- 29 Morse, H. C., Goode, J. H. & Rudikoff, S. (1977) *J. Immunol.* 119, 361-363.
- 30 Capra, J. D., Berek, C. & Eichmann, K. (1976) *J. Immunol.* 117, 7-10.
- 31 Bernhard, O., Hozumi, N. & Tonegawa, S. (1978) *Cell* 15, 1133-1144.
- 32 Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. & Hood, L. (1980) *Nature (London)* 283, 497-499.
- 33 Rudikoff, S. & Potter, M. (1978) *Biochemistry* 17, 2703-2707.
- 34 Appella, E. (1980) *Mol. Immunol.* 17, 711-718.
- 35 Smith, G. P. (1978) *Biochem. J.* 171, 337-347.
- 36 Ball, R., Alkan, S. S., Chang, J. Y. & Braun, D. G. (1982) *Mol. Immunol.*, in press.
- 37 Schiff, C. & Fougereau, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 525-537.
- 38 Vrana, M., Rudikoff, S. & Potter, M. (1979) *J. Immunol.* 122, 1905-1910.
- 39 Rao, D. N., Rudikoff, S. & Potter, M. (1978) *Biochemistry* 17, 5555-5559.
- 40 Hood, L., McKean, D., Farnsworth, V. & Potter, M. (1973) *Biochem. J.* 12, 741-749.
- 41 Appella, E. & Inman, J. K. (1973) *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 2, 51-77.
- 42 Potter, M., Padlan, E. & Rudikoff, S. (1976) *J. Immunol.* 117, 626-629.
- 43 Vicari, G., Sher, A., Cohn, M. & Kabat, E. A. (1970) *Immunochem.* 7, 829-838.

Prof. Dr. D. G. Braun, Ciba-Geigy Limited, K-125.15.16, CH-4002 Basel.

Die Primärstruktur des Hämoglobins vom Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*, *Perissodactyla*): $\beta 2$ Glu*

Gertraud MAZUR^a, Gerhard BRAUNITZER^a und Peter G. WRIGHT^b

^a Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Proteinchemie, Martinsried bei München
^b Department of General Physiology, University of the Witwatersrand, Johannesburg

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. Juni 1982)

Zusammenfassung: Das Hämoglobin eines Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*) wurde untersucht und die Primärstrukturen der α - und β -Ketten werden beschrieben. Diese wurden durch Abbau der intakten Ketten (*N*-terminale Bereiche), der tryptischen Peptide und säurehydrolytischen Peptide (*C*-terminale Peptide nach Spaltung der Asp-Pro-Bindung) im Sequenator ermittelt. Es konnten ein α - und mehrere β -Kettentypen nachgewiesen werden. Die β -Ketten unterscheiden sich in Position 62 und 116. In $\beta 62$ wurden die Aminosäuren Threonin, Serin und Alanin identifiziert. In $\beta 116$ Glutamin und Lysin.

Die Sequenzen werden mit Daten von Pferd, Wildesel und Zebra verglichen und diskutiert. Fünf

Aminosäuren, die im Methämoglobin des Pferdes $\alpha 1 \beta 1$ -Bindungen ausbilden, sind ausgetauscht: $\alpha 35$ Gly \rightarrow Ser, $\alpha 107$ Ser \rightarrow Val, $\alpha 111$ Val \rightarrow Leu, $\alpha 115$ Asn \rightarrow Gln, $\beta 116$ Arg \rightarrow Gln oder Lys. In Position 2 der β -Ketten, einer Bindungsstelle für 2,3-Bisphosphoglycerat, steht Glutaminsäure. Durch Bindung von 2,3-Bisphosphoglycerat wird die Desoxyform des Hämoglobins stabilisiert und die Sauerstoffaffinität des Moleküls erniedrigt. Aufgrund der Sequenzdaten kann für das Nashornhämoglobin eine verminderte Hämoglobin-Phosphatwechselwirkung vorausgesagt werden und als Folge eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Moleküls.

The Primary Structure of the Hemoglobin from a White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Perissodactyla*): $\beta 2$ Glu

Summary: The hemoglobin from a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) was analysed and the complete primary structure of the α and β chains is described. The globin chains were separated on CM-cellulose column in 8M urea buffer. The amino acid sequences were mainly determined by automatic degradation of tryptic peptides in the sequenator. The results show

that globin consists of one α - and several β -chain types. The β chains differ at position $\beta 62$ where the amino acids threonine, serine and alanine were identified and at position $\beta 116$ where glutamine or lysine were found. The sequences are compared with those of horse, wild ass and zebra hemoglobin. Five amino acid residues of horse hemoglobin, which are involved

Abkürzungen:

N = Nashorn, Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)-1,3,5-naphthalin-trisulfonsäure, Trinatriumsalz, Hp-Peptid = C-terminales Peptid mit 47 Aminosäuren nach säurehydrolytischer Spaltung der Asp-Pro-Bindung.

[α OSpHcCH₂C] = Chlor (*N*-*p*-tosyl-L-phenylalanyl) methan.

* 62. Mitteilung über Hämoglobine; 51. Mitteil. a.l.c. [1]

in the $\alpha_1 \beta_1$ contacts are substituted in white rhinoceros hemoglobin. These substitutions are $\alpha 35 \text{ Gly} \rightarrow \text{Ser}$, $\alpha 107 \text{ Ser} \rightarrow \text{Val}$, $\alpha 111 \text{ Val} \rightarrow \text{Leu}$, $\alpha 115 \text{ Asn} \rightarrow \text{Gln}$ and $\beta 116 \text{ Arg} \rightarrow \text{Gln}$ or Lys . Furthermore glutamic acid was found at position $\beta 2$ of rhinoceros hemoglobin. In most mammalian

hemoglobins the amino acid at this position is histidin which is one of the residues that binds, 2,3-bisphosphoglycerat in deoxyhemoglobin. In this way 2,3-bisphosphoglycerat controls the oxygen affinity of hemoglobin.

Key words: Mammalian hemoglobin, primary structure, Rhinoceros, Perissodactyla.

In dieser Arbeit berichten wir über das Hämoglobin eines Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*, Fam. Rhinocerotidae) und möchten damit unsere Untersuchungen zur molekularen Evolution der Hämoglobine der Unpaarhufer (Perissodactyla) weiterführen. Wir haben das Breitmaulnashornhämoglobin analysiert und beschreiben die Primärstrukturen der α - und β -Ketten.

Experimenteller Teil

1) Gewinnung der α - und β -Ketten von Nashornoglobin

Von P. G. Wright wurde einem einzigen Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) nach Narkoseschuß im Krüger Park, Südafrika Blut entnommen und eisgekühlt nach München gesandt. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert, nach Standardbedingungen gewaschen und lysiert und die Hämoglobinfällung in einer alkalischen Acrylamidgelelektrophorese bei pH 8.9 analysiert (Abb. 1).

Die Hamabspaltung erfolgte mit Aceton/HCl und die Trennung des Globins in α - und β -Ketten durch Chromatographie an CM-Cellulose (Whatman) mit 8M Harnstoff, 5mM Natriumphosphat, pH 6.7 (Abb. 2).

2) Spaltung und Peptidfraktionierung

a) mit Trypsin

Native Ketten wurden mit TosPheCH₂Cl-behandeltem Trypsin über 4 h gespalten. Anschließend wurden die Core-Peptide bei pH 6.5 gefällt und abzentrifugiert. Die löslichen Peptide wurden über Sephadex G-25 (Säule, 2.6 x 130 cm) mit 0.1M Essigsäure vorgetrennt und die Gipfelaktionen weiter über Dowex 50X4 (Säule: 0.6 x 60 cm, 42 °C) mit dem Pyridin/Acetatzyklus gereinigt. Gelegentlich erfolgte eine Nachreinigung der Peptide durch Hochspannungselektrophorese auf dem Papier bei pH 5.4.

b) mit Bromcyan

Die Spaltung der Ketten mit Bromcyan wurde in 70% Ameisensäure durchgeführt^[2]. Die Fraktionierung der

Peptide erfolgte über Sephadex G-50 (Säule: 2.6 x 130 cm) mit 8M Harnstoff, eingestellt mit HCl auf pH 3.5.

c) durch säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung

Die Asp-Pro-Bindungen (α Pos. 94/95, β Pos. 99/100) wurden in 70% Ameisensäure mit 6M Guanidin-HCl sauer hydrolysiert^[3] und die Peptide über Sephadex G-50 (Säule: 2.6 x 180 cm) mit 8M Harnstoff in 10% Ameisensäure fraktioniert.

3) Aminosäureanalyse

Die Proben wurden 20- 200 h mit 5.7M HCl i. Vak. bei 110 °C hydrolysiert. Tryptophan wurde in Gegenwart von 6% Thioglycolsäure bestimmt, Methionin und Cystein nach Oxidation mit Perameisensäure. Tabellenwerte in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

4) Sequenzanalyse

Der Abbau der intakten Ketten (Carboxymethyl-derivate) und der Peptide erfolgte im Sequenator (Gerat: Sequencer 890 C und 890 B der Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Calif.).

Es wurden zwei Programme angewandt. Bei Ketten, Bromcyanpeptiden und mit Reagenz IV umgesetzten Lysinpeptiden^[4] wurde mit dem Quadrolprogramm gearbeitet^[5], während kurze Lysinpeptide, Argininpeptide und Hp-Peptide mit dem 3-Dimethylaminopropinprogramm^[6] abgebaut wurden. Die Identifizierung der Phenylthiohydantoin-derivate der Aminosäuren erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in drei Systemen^[7] und Hochdruckflüssigkeitschromatographie^[8]. (Gerat HPLC 1084 der Fa. Hewlett Packard GmbH, Böblingen

Ergebnisse

Das Hämoglobin des Breitmaulnashorns wurde in einer alkalischen Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und ergab nur eine, aber relativ breite und diffuse Hämoglobinbande (Abb. 1). Das Globin konnte durch Chromatographie an CM-



Abb. 1. Acrylamidgelelektrophorese von Nashornhämoglobin bei pH 8.9.

Cellulose in α - und β -Ketten getrennt werden (Abb. 2).

Durch Sequenzierung der carboxymethylierten Globinketten wurden die N-terminalen Bereiche ermittelt. Die α -Ketten wurden bis Pos. 31 und

die β -Ketten bis Pos. 42 analysiert. Zur weiteren Sequenzanalyse wurden bevorzugt kurze Peptide herangezogen (Tab. 1 und 2). Diese konnten stets vollständig abgebaut werden. Aus den Sequenzdaten wurden dann die Bruttoformeln der Peptide abgeleitet und mit den Werten der Aminosäureanalysen verglichen. Diese unabhängig erhaltenen Daten stimmten stets überein. So deuteten die Werte der Aminosäureanalysen für das tryptische Peptid Tp 7 der β -Ketten (Pos. 62-65, Tab. 2, Spalte 7) mit Thr 0.31, Ser 0.31 und Ala 0.42 ein nicht einheitliches Peptid an. Bei Abbau des Peptids im 3-Dimethylaminopropinprogramm konnten wir dann in Schritt 1 drei unterschiedliche Phenylthiohydantoin-derivate identifizieren und den Aminosäuren Alanin, Threonin und Serin zuordnen. Die Phenylthiohydantoin-derivate der Aminosäuren Alanin und Threonin konnten mittels Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie bei 265 nm identifiziert werden. Serin und Threonin außerdem bei 330 nm als Dehydroprodukte. Für quantitative Aussagen wurden nur die Werte der Aminosäureanalysen herangezogen. Der zusätzliche Abbau des Bromcyanpeptids CB II (Peptid mit 91 Aminosäuren, Pos. 56-146, Tab. 3) im Quadrolprogramm führte zu gleichem Ergebnis.

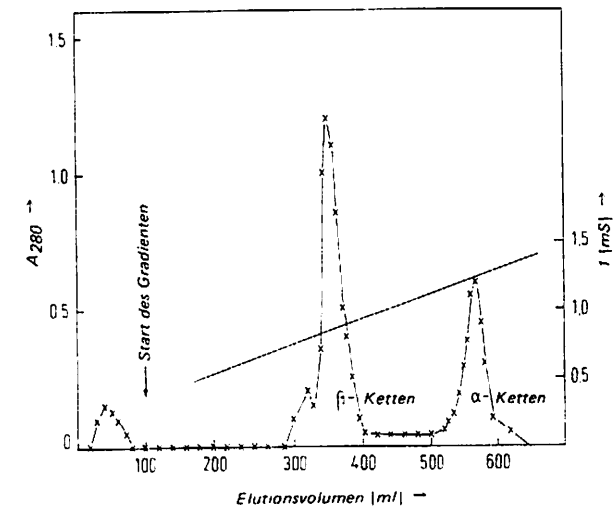


Abb. 2. Chromatographie von Nashornoglobin an CM-Cellulose. CM-52-Säule: 2.6 x 16 cm. Startpuffer: 5mM Natriumphosphat, 8M Harnstoff, 1mM Dithioerythrit, pH 6.7. Gradient: 500 ml Startpuffer und 500 ml desselben Puffers, jedoch 40mM Natriumphosphat enthaltend.

Tab. 1. Analysenwerte der tryptischen Peptide und des Hp-Peptids der α -Ketten von Nashornoglobin.

	Hp-Peptid	Analysenketten	Summe	Tp14	Tp13	Tp12	Tp11	Tp10	Tp9	Tp8	Tp7	Tp6	Tp5	Tp3+4	Tp2	Tp1	Summe
Asp	4.10 (4)	11.9	12		1.19	2.14	1.97		4.10			1.08	1.15	1.06	0.95	7	
Thr	3.73 (4)	11.2	11		1.95	1.90			1.02			1.03	1.15	1.06	1.00	4	
Ser	4.87 (5)	10.9	11		2.89	2.40			2.05			2.08	4.00	1.04	1.10	4	
Glu	1.47 (1)	7.3	7			1.17	0.95		1.12			1.01	0.94		1.00	7	
Pro	2.88 (3)	7.1	7			1.85			0.92		1.06	0.94	3.78		1.00	7	
Gly		8.6	9			2.93			3.05		1.07	1.00	5.03		0.98	9	
Ala	3.48 (3)	14.7	15		2.04	2.00	2.03		4.83			1.12	1.02	1.00	0.86	20	
Val	0.82 (1)	1.0	1			1.10			2.13			0.89	1.11	1.00	0.91	4	
Met	5.61 (5)	11.8	12		1.94	6.89	1.07		5.88			1.17	0.99	1.00	0.86	4	
Leu	8.59 (9)	19.8	20	0.95		0.92			0.90			0.84	1.88	0.90	1.11	4	
Trp	0.88 (1)	3.8	4		0.95	0.91	0.98		1.03			1.87	0.88	0.90	1.11	4	
Phe	2.86 (3)	6.9	7		1.04	3.79			1.97			1.89	1.01	0.90	1.11	4	
Lys	2.95 (3)	10.4	10		1.04		0.98		1.97			1.89	1.01	0.90	1.11	4	
His	3.90 (4)	10.6	10				0.88		1.97			1.89	1.01	0.90	1.11	4	
Arg	0.86 (1)	3.0	3	1.05			0.88					1.89	1.01	0.90	1.11	4	
Summe	47	141	141	2	12	28	7	2	29	1	4	16	9	20	7	7	141

Die C-terminalen Abschnitte der Globinketten, die sogenannten Core-Bereiche (G- und H-Helix) werden bevorzugt von aliphatischen Aminosäuren aufgebaut. Sie sind daher sehr hydrophob und tryptische Spaltprodukte sind oftmals schwer zu isolieren. (z.B. α Tp12, α Tp13, β Tp12, β Tp13). Wir haben die Primärstrukturen der C-terminalen Bereiche durch Abbau der Hp-Peptide (α Pos. 95-141, β Pos. 100-146) ermittelt. Der Abbau der Peptide war eindeutig und klar. Überraschenderweise wurden in Position 116 der β -Ketten Phenylthiohydantoinderivate von zwei Aminosäuren (Lysin und Glutamin) gefunden. Daraus muß geschlossen werden, daß das Hp-Peptid der β -Ketten in dieser Position uneinheitlich ist und von mindestens zwei β -Kettentypen stammt. Die Quantifizierung der Phenylthiohydantoinderivate mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie ergab ein Molverhältnis für Lys: Gln von annähernd 0.4:0.6. Die β -Kettentypen werden unter den chromatographischen Bedingungen bei pH 6.7 nicht getrennt. Bei Analyse des Gesamtglobins in einer sauren Harnstoffelektrophorese in Gegenwart von Triton X-100 (Abb. 3) spalten die β -Ketten immerhin in zwei Banden auf, wobei eine Bande etwa doppelt so stark anfärbt wie die

⊕

⊖

Abb. 3. Saure Harnstoffelektrophorese in Gegenwart von Triton X-100 in Polyacrylamidgelen von Nashornoglobin.

Tab. 2. Analysenwerte der tryptischen Peptide und des Hp-Peptids der β -Ketten von Nashornoglobin.

	Tp1	Tp2	Tp3a+3b	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9	Tp10
Asp		1.03	1.08		3.05				3.07	0.99
Thr	1.05			1.09	1.15		0.31			0.92
Ser					2.08		0.31		1.05	1.30
Glu	2.71		3.03	1.13						0.96
Pro				1.07	0.97					
Gly			2.92		2.07		0.97		2.05	1.03
Ala	1.07	2.82	1.18		3.00		0.42			2.04
Cys										0.85
Val	1.07	1.20	1.96	1.80	1.06	1.09			1.96	
Met					0.82					
Leu	1.10	1.95	1.13	2.07	1.06				3.07	1.80
Tyr				1.05						
Phe					2.77				0.94	1.00
Trp		1.00		1.00						
Lys	1.00	1.00	0.90		0.97	0.91	0.98	1	1.02	1.03
His							1.01		2.84	1.08
Arg			0.80	0.79						
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	16	13

	Tp11	Tp12	Tp13	Tp14	Tp15	Summe	Analysenketten	Hp-Peptid
Asp	2.03	(1)		1.07		13	13.4	3.30 (3)
Thr			1.14			5.3	5.6	1.50 (1)
Ser						4.3	4.9	
Glu	0.96	(0.5)	3.78			13.5	13.2	5.30 (5.5)
Pro	0.92		1.06			4	4.2	1.75 (2)
Gly		(2)		1.02		12	12.4	3.60 (3)
Ala		(1)	2.10	3.96		17.4	17.1	6.30 (7)
Cys						1	1.0	
Val	1.15	(4)		2.70		18	17.5	6.40 (7)
Met						1	1.0	
Leu	0.96	(4)	1.06	1.08		19	19.4	6.15 (6)
Tyr			0.85		1.04	3	2.8	1.35 (2)
Phe	1.00	(1)	0.95			8	7.5	2.85 (3)
Trp						2	2.0	
Lys		(1.5)	1.06	1.12		12.5	12.2	3.85 (3.5)
His	1.08	(1)		1.05	0.96	9	8.9	3.45 (3)
Arg	0.90					3	2.9	1.20 (1)
Summe	9	16	12	12	2	146		47

Tab. 3. Analysenwerte der Bromcyanpeptide der α-Ketten und der β-Ketten von Nashornoglobin.

α-Ketten	CBp I = 32 Reste	CBp II = 109 Reste	β-Ketten	CBp I = 55 Reste	CBp II = 91 Reste
Asp	2.20	9.76	Asp	4.10	9.80
Thr	2.72	6.96	Thr	2.60	2.70
Ser	1.55	9.46	Ser	2.20	3.10
Glu	4.12	3.67	Glu	7.00	7.00
Pro	1.10	6.16	Pro	1.90	2.20
Gly	3.79	6.15	Gly	4.20	7.90
Ala	4.58	10.45	Ala	6.70	9.70
Cys		(1)	Cys		1.00
Val	2.65	9.61	Val	6.80	9.70
Met	(1)		Met	(1)	
Leu	2.06	17.61	Leu	6.90	12.10
Tyr	0.84	2.76	Tyr	0.90	1.70
Phe		6.77	Phe	2.90	4.80
Trp	(1)		Trp	(2)	
Lys	1.76	8.57	Lys	3.00	9.30
His	1.53	7.95	His	1.00	8.90
Arg	1.10	2.12	Arg	1.80	1.10
	32	109		55	91

andere. Hingegen findet man im Bereich der α-Ketten nur eine Proteinbande. Dies stimmt auch mit den Befunden der Sequenzanalyse überein. So konnten im Verlauf der Sequenzierung des α-Kettentyps in jeder Position immer nur eine Aminosäure nachgewiesen werden.

Diskussion

Vor kurzem haben wir über Hämoglobine der Pferdeartigen (Fam. Pferde, U.O. Pferdeverwandte) berichtet^[9]. Wir hatten die Hämoglobine eingehend untersucht und die Primärstrukturen wiedergegeben. Die Pferdeverwandten (U.O. Hippomorpha) und die Nashornverwandten (U.O. Ceratomorpha) bilden die heutigen Unpaarhufer (O. Perissodactyla).

Sämtliche Unpaarhufer lassen sich auf eine gemeinsame Stammgruppe zurückführen^[10]. Von dieser spaltete sich im Paleozän (vor ca. 55 Mill. Jahren) eine Linie ab, die zu den Hippomorpha führte, während sich aus einer anderen Linie die Wurzelgruppe der Ceratomorpha entwickelte. Im Eozän (vor ca. 45 Mill. Jahren) divergierten Zweige, von denen sich die heutigen Nashörner (Fam.

Rhinocerotidae) und Tapire (Fam. Tapirida) ableiten lassen. Mit 5 Arten bilden die heute lebenden Nashörner eine gut abgegrenzte Tiergruppe^[11]; drei Arten leben in Asien, zwei auf dem afrikanischen Kontinent. Entsprechend ihrer Stellung im Stammbaum innerhalb der Familie Nashörner, werden die heutigen Tiere als relativ ursprüngliche Formen eingestuft*. Wir haben das Hämoglobin eines Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*) untersucht und beschrieben die Primärstrukturen der α- und β-Ketten.

In Abb. 4 sind die Sequenzen der α- und β-Ketten homolog dem adulten Humanhämoglobin zugeordnet^[12]. Die α-Ketten von Human- und Nashornoglobin unterscheiden sich in 18 Positionen. Wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, liegt im Nashornoglobin nur ein α-Kettentyp vor. Im Gegensatz dazu ist in der Familie der Pferdeartigen (z.B. Pferd^[13], Wildesel^[9]) ein Polymorphismus der α-Globine weit verbreitet. Vergleicht man die α-Globine von Breitmaulnashorn und

* persönl. Mitteilung von Dr. K. Heissig, Institut f. Paläontologie u. Historische Geologie d. Universität München.

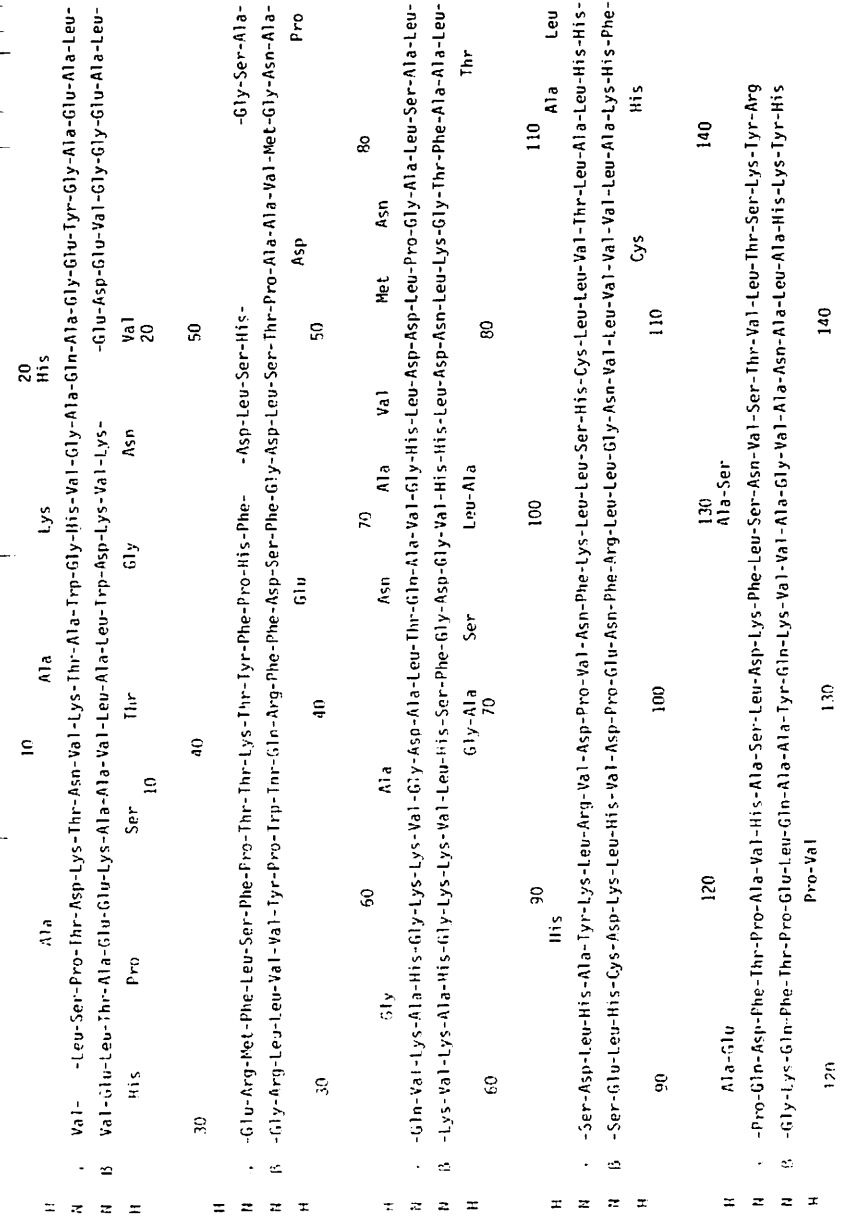


Abb. 4. Primärstrukturen der α- und β-Ketten von Nashornoglobin (N) verglichen mit Humanoglobin (H). In Pos. 62 der β-Ketten werden, außer Alanin, Threonin und Serin gefunden. Weiter ist die Pos. 116 heterogen. Hier konnten wir neben Lysin Glutamin nachweisen.

Pferd¹³), so sind zwischen den beiden α -Ketten 16 Aminosäuren ausgetauscht. Vier dieser Austausche können auf Doppelpunktmutationen zurückgeführt werden, während 12 Austausche als das Ergebnis von Punktmutationen gedeutet werden können.

Der in Abb. 4 wiedergegebene β -Kettentyp von Nashornoglobin und das β -Globin von Humanhämoglobin unterscheiden sich in der Sequenz der Aminosäuren in 20 Positionen. Die Unterschiede in den Primärstrukturen der β -Globine von Pferd und Nashorn sind erwartungsgemäß geringer. Es sind 13 Aminosäuren ausgetauscht, die alle als Folge von Punktmutationen interpretiert werden können.

Wie die Ergebnisse der Sequenzanalyse zeigen, sind die β -Globinketten vom Breitmaulnashorn nicht einheitlich. So konnten in zwei Positionen mehr als eine Aminosäure nachgewiesen werden. In Pos. 62 wurden die Aminosäuren Alanin, Threonin und Serin mit den Verhältnissen $\sim 0.4:0.3:0.3$ gefunden. Die Austausche dieser drei Aminosäuren sind durch Punktmutation erklärbar, ebenso die Austausche Glutamin und Lysin in $\beta 116$. Die Quantifizierung der Phenylthiohydantoinderivate der Aminosäuren in der Position $\beta 116$ deutet auf ein Verhältnis von Lys:Gln = $0.4:0.6$.

Das Auftreten von drei Aminosäuren in einer Position ist bei Hämoglobinen bisher nicht bekannt. Betrachtet man die Ergebnisse, so können diese bei Annahme einer gleich großen Syntheserate der β -Ketten, einen Hinweis auf die Zusammensetzung der β -Kettentypen geben: $\beta 116$ Ala, $\beta 116$ Lys; $\beta 116$ Thr, $\beta 116$ Gln; $\beta 116$ Ser, $\beta 116$ Gln. Mit diesen drei β -Kettentypen ergibt sich die minimale Kombinationsmöglichkeit drei (Zahl der β -Gene), während die maximale sechs wäre. Auch die Aufspaltung der β -Globine in zwei Banden in der sauren Harnstoffelektrophorese (Abb. 3) würde dazu nicht in Widerspruch stehen, wenn man in Betracht zieht, daß zwei Ketten unter diesen Bedingungen nicht getrennt werden. Diese Annahme wird auch durch unterschiedliches Anfärben der beiden Banden gestützt. Das Vorkommen von mehreren β -Kettentypen läßt an die $A\gamma$ - und $G\gamma$ -Ketten (Position 136 Alanin, bzw. Glycin) des Menschen denken. Da wir Blut von einem Tier analysiert haben, könnte auch im Globinogenom

des Breitmaulnashorns ein Polymorphismus der β -Gene vorliegen. Andererseits muß auch an eine Kombination von multiplen Allelen gedacht werden, ebenso an multiple Gene mit unterschiedlicher Syntheserate.

Das Vorkommen mehrerer β -Kettentypen in der *O. Perissodactyla* ist selten. Bisher wurden nur ein bis zwei β -Kettentypen für das Steppenzebra (*Equus burchelli*) beschrieben¹⁴.

Im Hämoglobinmolekül gibt es Aminosäurenreste, die in ihrer Mutationsrate sehr konservativ sind. Sie werden als invariant bezeichnet¹⁵. Dazu gehören z.B. die Reste für die Bindungsstellen der Hämgruppe, des allosterischen Effektors 2,3-Bisphosphoglycerat und der $\alpha_1 \beta_2$ -Paare. Im Gegensatz zu den $\alpha_1 \beta_2$ -Bindungen, die für die Funktion von Bedeutung sind, sind die $\alpha_1 \beta_1$ -Bindungsstellen für die Stabilität des Moleküls wichtig¹⁶. Die $\alpha_1 \beta_1$ - bzw. $\alpha_2 \beta_2$ -Bindungen verhindern die Dissoziation der Dimeren bei der Wechselwirkung des Tetrameren mit Sauerstoff. Im Methämoglobin des Pferdes sind an der Ausbildung dieser Bindungen 41 Aminosäuren beteiligt (l.c.¹⁵, S. 23). Einige dieser Aminosäuren sind im Nashornoglobin gegenüber Pferdeglobin ausgetauscht. Im α -Kettentyp: $\alpha 35$ (B16) Ser \rightarrow Gly, $\alpha 107$ (G14) Val \rightarrow Ser, $\alpha 111$ (G18) Leu \rightarrow Val, $\alpha 115$ (GH3) Gln \rightarrow Asn; in den β -Ketten: $\beta 116$ (G18) Lys oder Gln \rightarrow Arg.

Von physiologischer Bedeutung für die Sauerstoffaffinität der Säugerhämoglobine ist 2,3-Bisphosphoglycerat. Durch Bindung des organischen Phosphats wird die Desoxyform stabilisiert und die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erniedrigt. Die Wechselwirkung mit Phosphat erfolgt über die NH_3^+ -Gruppe von $\beta 1$ Val sowie über $\beta 2$ His, $\beta 82$ Lys und $\beta 143$ His. Dabei kann, wie beim Pferd, $\beta 2$ Histidin durch Glutamin ersetzt sein¹⁷. Im Nashornoglobin steht in $\beta 2$ Glutaminsäure. Eine Wechselwirkung mit $\beta 2$ ist nicht mehr möglich. Eine saure Aminosäure in $\beta 2$ ist bei Säugern bisher nicht beschrieben.

Physiologische Untersuchungen sind bis heute nicht bekannt. Aufgrund unserer Sequenzdaten ist infolge von $\beta 2$ Glutaminsäure eine erniedrigte Assoziationskonstante des Hämoglobins mit Phosphat zu erwarten. Daraus folgt, daß im Nashornhämoglobin die Reduktion der intrinsischen Affinität geringer ist, als bei den meisten Säuger-

hämoglobinen. Wird eine normale intrinsische Affinität vorausgesetzt, so ist für das Nashornhämoglobin eine höhere Sauerstoffaffinität zu postulieren.

Mit dieser Arbeit ergänzen wir die Untersuchungen über den Blutfarbstoff der rezenten Perissodactyla. Sie sollen mit Daten über das Hämoglobin eines Tapir abgeschlossen werden.

Wir danken Frau B. Schrank, Fräulein H. Mairhofer und Herrn C. Krombach für die Arbeit am Sequenator, Frau C. Felsmann und Herrn A. Stangl für die Durchführung der Analysen.
The authors are grateful to the Department of Nature Conservation, Kruger National Park for making the blood sampling possible.

Literatur

51. Mitteil.: Kleinschmidt, T. & Braunitzer, G. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 789-796.
- Gross, E. & Wittkop, B. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1510-1511.
- Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) *Anal. Biochem.* 69, 468-473.
- Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1730-1732.
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Wiesner, H. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1941-1946.
- Braunitzer, G. & Schrank, B. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 417-418.
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 137-146.
- Zimmerman, C.L. & Pisano, J.J. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 45-51.
- Mazur, G. & Braunitzer, G. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 59-71.
- Thenius, E. (1969) *Phylogenie der Mammalia*, p. 533 ff., Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Thenius, E. (1972) in *Grzimeks Tierleben*, (Grzimek, B., ed.) vol. 13. Säugetiere 4, p. 34 ff., Kindler Verlag, Zürich.
- Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschman, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittman-Liebold, B. (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325, 283-286.
- Matsuda, G., Maita, T., Braunitzer, G. & Schrank, B. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1107-1116.
- Kitchen, H. & Easley, C.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6533-6542.
- Fermi, G. & Perutz, M.F. (1981) *Atlas of Molecular Structures in Biology*, Vol. 2, *Haemoglobin and Myoglobin*, Clarendon Press Oxford.
- Perutz, M.F. (1979) *Spektrum der Wissenschaft* 2, 18-34.
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Bauer, C. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 547-558.

Prof. Dr. G. Braunitzer, Dr. G. Mazur, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried.

Prof. Dr. P.G. Wright, University of the Witwatersrand, Department of General Physiology, 1 Jan Smuts Avenue, Johannesburg, 2001, South Africa.