

# Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie

Band 364 – 2. Jahreshälfte

Fortgeführt von A. Kossel, F. Knoop, K. Thomas, F. Lynen, A. Butenandt und G. Weitzel

Herausgegeben von **K. Decker, W. Stoffel, H.G. Zachau**

unter Mitwirkung von H. Eggerer, J. Engel, H. Fritz, E. Habermann, E. Helmreich,

A. Henschen, B. Hess, N. Hilschmann, H. Hilz, P.W. Jungblut,

K. Jungermann, P. Karlson, H. Kleinkauf, H.L. Kornberg, K. Kühn, D. Oesterheld, K. Rajewsky,

K. Sandhoff, R. Schauer, J. Seelig, G. Siebert, H. Sies, H. Simon, E. Truscheit,

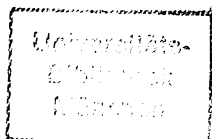
H. Tschesche, H. Tuppy, V. Ullrich, E. Wecker, H. Wiegandt, B. Wittmann-Liebold, H. Zahn

Redaktion A. Dillmann, G. Peters



1983

WALTER DE GRUYTER · BERLIN · NEW YORK



### **Attention before copying!**

Do you photocopy articles from this periodical? If so, have you made certain that you are not violating the legal copyright regulations and making yourself liable to prosecution?

According to copyright law it is only permissible to make a few copies of individual articles for personal use. Reproduction of articles for commercial use by an industrial enterprise is subject to charge. Detailed information can be obtained free of charge from the VG Wissenschaft GmbH, "Copyright", Großer Hirschgraben 17–21, D-6000 Frankfurt/Main, this company being responsible for collection of copying fees.

### **Copying in the U.S.A.!**

The appearance of the code at the bottom of the first page of an article in this journal indicates the copyright owner's consent that copies of the article may be made for personal or internal use, or for the personal or internal use of specific clients. This consent is given on the condition, however, that the copier pay the stated per-copy fee through the Copyright Clearance Center, Inc. for copying beyond that permitted by Sections 107 or 108 of the U.S. Copyright Law. This consent does not extend to other kinds of copying, such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works, or for resale.

Titel Nr. 3109004066

Copyright © 1983 by Walter de Gruyter & Co., Berlin.

All rights reserved, including those of translations into foreign languages. No part of this journal may be reproduced in any form – by photoprint, microfilm or any other means – or transmitted or translated into a machine language without written permission from the publisher.

The quotation of registered names, trade names, trade marks, etc. in this journal does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from laws and regulations protecting trade marks, etc. and therefore free for general use.

Advertising: Merkur Werbung GmbH, Wolfgang Friebe, Postfach 1245, D-5210 Troisdorf 1, Tel. (0 22 41) 4 39 87 – Printed in Germany – Typesetting: R. & J. Blank, Composer- & Fotosatzstudio GmbH, München; Printing: Grafik + Druck, München; Binding: Steinberger GmbH, München.

## Die Primärstruktur der $\alpha$ - und $\beta$ -Ketten der Hauptkomponente der Hämoglobine der Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*, Anatidae)\*

Walter OBERTHÜR<sup>a</sup>, Henning WIESNER<sup>b</sup> und Gerhard BRAUNITZER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Proteinchemie, Martinsried bei München

<sup>b</sup> Tierpark Hellabrunn, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Oktober 1982)

**Zusammenfassung:** Die Primärstruktur der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der Hauptkomponente (HbA) der Hämoglobine der Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*) wird angegeben. Die Nebenkomponente mit den  $\alpha^D$ -Ketten wurde nachgewiesen, aber nur in geringer Konzentration gefunden. Beim homologen Vergleich mit dem Hämoglobin der Graugans (*Anser anser*) unterscheidet sich die Spaltfußgans in den  $\alpha$ -Ketten in 13 Aminosäuren oder 17 Nucleotiden (4 Zweipunktmutationen), in den  $\beta$ -Ketten in 6 Aminosäuren oder Nucleotiden.

Mit  $\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}$ ,  $\alpha 34(\text{B}15)\text{Thr}\rightarrow\text{Gln}$ ,  $\alpha 35(\text{B}16)\text{Ala}\rightarrow\text{Thr}$ ,  $\alpha 36(\text{B}17)\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ ,  $\beta 55(\text{D}6)\text{Leu}\rightarrow\text{Ile}$ ,  $\beta 119(\text{GH}2)\text{Ala}\rightarrow\text{Ser}$  und  $\beta 125(\text{H}3)\text{Glu}\rightarrow\text{Asp}$  sind sieben  $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen mutiert. Weiter ist eine  $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstelle (Oxy-Form) in  $\beta 39(\text{C}5)\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$  verändert. Eine Mutation in  $\beta 39$  wurde bisher, abgesehen von zwei menschlichen abnormalen Hämoglobinen, nicht gefunden. Die Unterschiede vom Hämoglobin der Spaltfußgans zu anderen Vögeln werden diskutiert.

### *The Primary Structure of $\alpha$ and $\beta$ Chains from the Major Hemoglobin Component of the Australian Magpie Goose (*Anseranas semipalmata*)*

**Summary:** The amino acid sequence of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains from the major hemoglobin component (HbA) of Australian Magpie Goose (*Anseranas semipalmata*) is given. The minor component with the  $\alpha^D$  chains was detected, but only found in low concentrations. By homologous comparison, Greylag Goose hemoglobin (*Anser anser*) and Australian Magpie Goose  $\alpha$  chains differ by 13 amino acids or 17 nucleotide (4 two point mutations) exchanges,  $\beta$  chains by 6 exchanges. Seven  $\alpha_1\beta_1$  contacts

are modified by substitutions in positions  $\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}$ ,  $\alpha 34(\text{B}15)\text{Thr}\rightarrow\text{Gln}$ ,  $\alpha 35(\text{B}16)\text{Ala}\rightarrow\text{Thr}$ ,  $\alpha 36(\text{B}17)\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ ,  $\beta 55(\text{D}6)\text{Leu}\rightarrow\text{Ile}$ ,  $\beta 119(\text{GH}2)\text{Ala}\rightarrow\text{Ser}$  and  $\beta 125(\text{H}3)\text{Glu}\rightarrow\text{Asp}$ . Further, one  $\alpha_1\beta_2$  contact point was changed in  $\beta 39(\text{C}5)\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$ . Mutation in this position, except in two abnormal human hemoglobins, was not found in any species. Amino acid exchanges between hemoglobin of Australian Magpie Goose and other birds are discussed.

#### Abkürzungen:

Quadrol = *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin; Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natriumsalz; Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Trinatriumsalz; Inosit- $P_5$  = Inosit-1,3,4,5,6-pentakisphosphat.

\* 54. Mitteilung über Hämoglobine; 53. Mitteilung s.l.c.<sup>[1]</sup>

**Key words:** Hemoglobin, primary structure, Australian Magpie Goose, Anatidae.

In dieser Arbeit werden die Untersuchungen an Hämoglobinen der Vögel fortgesetzt. Aufgrund vieler Besonderheiten in Anatomie und Verhalten und der ungeklärten Stellung in der Systematik wurde das Hämoglobin der Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*) untersucht; die Primärstruktur der Hauptkomponente HbA wird angegeben.

## Experimenteller Teil

### Ausgangsmaterial

Einer Spaltfußgans aus dem Tierpark Hellabrunn wurden 8 ml Blut aus der Beinvene abgezogen. Die Gewinnung des Hämoglobins und die Isolierung der Ketten erfolgte wie früher beschrieben<sup>[2-4]</sup>.

### Spaltung der Proteinkette in Peptide

Zur Aufklärung der Primärstruktur wurden die tryptische und die hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung verwendet<sup>[5]</sup>. Dabei wurde sowohl von nativem als auch von oxidiertem (Perameisensäure)<sup>[6]</sup> Kettenmaterial ausgegangen (20 mg).

### Isolierung der Peptide

Die tryptischen Peptide wurden über Gelfiltration mit Sephadex G-25 in 0.1M Essigsäure vorfraktioniert. Die Fraktionen der Gipfel wurden im Rotationsverdampfer eingengt und die in ihnen enthaltenen Peptide sowohl über Dowex 50X4<sup>[2,3]</sup> als auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie isoliert. Die Trennungen wurden auf einem Gerät der Firma Beckman Instruments, Palo Alto, Calif., USA, durchgeführt. Die Säulen wurden selbst gepackt mit LiChrosorb RP-2, 7  $\mu$ m, der Firma E. Merck, Darmstadt (Säulendimension 4.6  $\times$  250 mm). Als Puffer wurde 0.05M Ammoniumacetat, pH 6.0<sup>[7]</sup> verwendet; die Peptide wurden mit linearen Gradienten von 0–60% Acetonitril eluiert (Durchfluß 2 ml/min) (Abb. 1 u. 2).

### Aminosäureanalyse

Die Proben wurden 20–200 h lang mit 5.7M HCl im Vakuum hydrolysiert. Tryptophan wurde in Gegenwart von Thioglycolsäure bestimmt, Methionin und Cystein nach Oxidation mit Perameisensäure (Tab. 1–3).

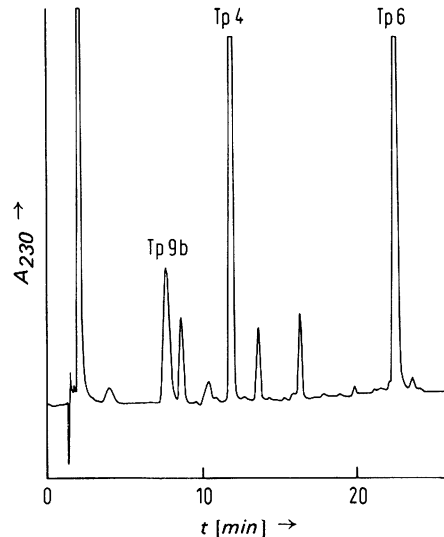


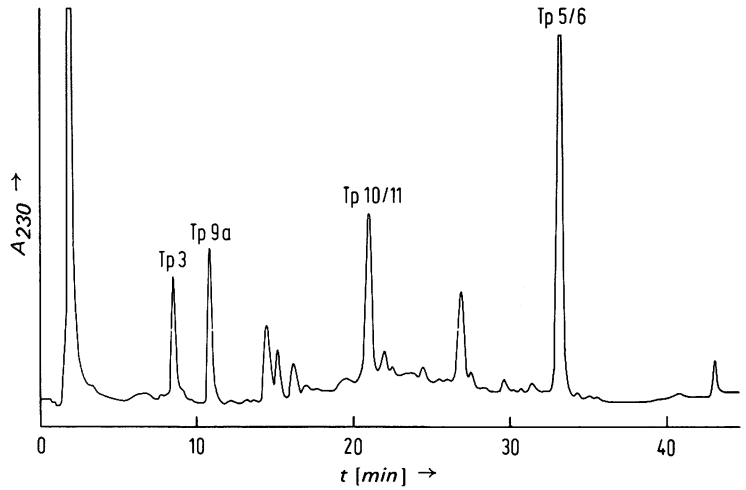
Abb. 1. Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten  $\alpha$ -Ketten aus einem Gipfel der Vortrennung (Sephadex G-25, 0.1M Essigsäure) mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie, ca. 100 nmol.

Bedingungen: 4.6  $\times$  250 mm-Säule; RP-2 LiChrosorb der Firma E. Merck, Darmstadt; Lösungsmittel 0.05M Ammoniumacetat pH 6.0; Elutionsmittel Acetonitril, linearer Gradient von 0–40%, 30 min Laufzeit; Durchfluß 2 ml/min.

### Sequenzanalyse

Der Abbau mit Phenylisothiocyanat wurde automatisch nach der Filmtechnik<sup>[8]</sup> mit den Sequenatoren 890B und 890C der Firma Beckman Instruments, Palo Alto, Calif., USA, durchgeführt. Der Abbau der intakten Ketten und der Lysinpeptide erfolgte im Quadrolprogramm<sup>[8]</sup>. Peptide mit C-terminalem Arginin und Peptide der hydrolytischen Spaltung wurden in 1M Diethylaminopropinpuffer<sup>[9]</sup> abgebaut. Es wurden 0.1 bis 0.2  $\mu$ mol Kette oder Peptide eingesetzt. Lysinpeptide wurden mit Reagenz I<sup>[10]</sup> oder IV<sup>[11]</sup> umgesetzt. Die Identifizierung der Phenylthiohydantoinderivate erfolgte mit Dünnschichtchromatographie<sup>[12]</sup> oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie<sup>[13]</sup>.

Abb. 2. Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten  $\beta$ -Ketten aus einem Gipfel der Vortrennung (Sephadex G-25, 0.1M Essigsäure) mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie, ca. 100 nmol. Bedingungen: wie in Abb. 3; linearer Gradient von 0–40%, Laufzeit 40 min.



Tab. 1. Analysen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten und der C-terminalen Peptide HP-2 aus der hydrolytischen Spaltung der Asp-Pro-Bindung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten.

	$\alpha$ -Ketten (Sequ.)	$\beta$ -Ketten (Sequ.)	HP-2 $\alpha$ (Sequ.)	HP-2 $\beta$ (Sequ.)
Asx	10.22 (10)	13.70 (14)	2.19 (2)	4.10 (4)
Thr	7.43 (8)	5.97 (6)	2.86 (3)	0.85 (1)
Ser	5.82 (6)	6.64 (8)	1.56 (2)	0.73 (1)
Glx	10.96 (11)	11.69 (11)	1.08 (1)	3.23 (3)
Pro	5.34 (6)	5.19 (5)	2.76 (3)	2.01 (2)
Gly	9.42 (9)	8.47 (8)	1.36 (1)	1.35 (1)
Ala	18.23 (19)	16.46 (16)	4.26 (5)	7.20 (7)
Val	11.75 (12)	11.71 (12)	4.96 (6)	3.63 (4)
Ile	5.47 (5)	6.81 (8)	0.73 (1)	2.54 (3)
Leu	14.42 (15)	17.53 (17)	5.68 (7)	6.20 (6)
Tyr	2.94 (3)	2.31 (2)	0.84 (1)	0.91 (1)
Phe	8.97 (9)	8.69 (8)	4.11 (4)	2.97 (3)
His	8.77 (9)	6.98 (7)	3.41 (4)	2.84 (3)
Lys	11.85 (12)	11.68 (10)	3.10 (3)	3.05 (3)
Arg	2.98 (3)	6.34 (6)	0.86 (1)	2.93 (3)
Cys	1.95 (2)	2.65 (3)	1.61 (2)	1.03 (1)
Met	1.63 (2)	0.94 (1)	0.84 (1)	—
Trp	—	3.27 (4)	—	0.74 (1)
Summe	141	146	47	47

Tab. 2. Analysen der tryptischen Peptide der  $\alpha$ -Ketten.

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp10	Tp11	Tp12	Tp13	Tp14
Pos.	1-7	8-11	12-16	17-31	32-40	41-56	57-60	61	62-82	83-90	91-92	93-99	100-127	128-139	140-141
Asx	1.00	1.02	-	-	-	1.05	-	-	3.26	1.07	-	1.95	1.02	-	-
Thr	-	-	1.00	1.07	2.06	1.03	-	-	-	-	-	-	0.95	1.84	-
Ser	0.96	-	-	-	-	1.16	-	-	1.08	1.00	-	-	1.91	-	-
Glx	-	-	-	4.12	2.16	2.04	-	-	1.11	1.02	-	-	1.05	-	-
Pro	-	-	-	-	1.00	1.84	-	-	-	-	-	1.07	1.96	-	-
Gly	-	0.98	1.07	2.98	-	1.01	1.02	-	1.12	-	-	-	1.07	-	-
Ala	2.01	-	-	2.01	-	1.04	1.01	-	6.53 (7)	0.98	-	-	2.04	3.04	-
Val	0.97	1.03	1.01	-	-	-	-	-	2.07	-	-	1.92	2.37 (3)	2.05	-
Ile	-	-	-	0.98	-	0.94	-	-	2.05	-	-	-	0.85	-	-
Leu	1.04	-	-	1.04	-	1.03	-	-	2.16	1.93	1.00	-	4.92	1.98	-
Tyr	-	-	-	0.96	-	0.97	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
Phe	-	-	0.94	-	2.04	2.00	-	-	-	-	-	0.92	1.99	1.00	-
His	-	-	-	0.92	-	0.87	0.98	-	0.75	0.96	-	-	3.75	-	-
Lys	1.01	1.00	0.98	-	1.06	0.98	0.99	1.00	0.94	1.03	-	1.12	0.97	1.01	-
Arg	-	-	-	0.89	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-	1.00
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.95	0.93	-
Met	-	-	-	-	0.66	-	-	-	-	-	-	-	0.81	-	-
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	28	12	2

Tab. 3. Analysen der tryptischen Peptide der  $\beta$ -Ketten.

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5/6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp10/11	Tp12	Tp13	Tp14a	Tp14b	Tp14c/ 15	
Pos.	1-8	9-17	18-30	31-40	41-61	62-65	66	67-76	77-82	83-104	105-120	121-132	133-135	136-143	144-146	
Asx	-	-	2.15	-	2.12	-	-	-	2.95	3.93	Dieses Peptid ergibt sich aus Peptid HP-2 $\beta$ der hydrolytischen Spaltung (s. Tab. 1)	1.93	-	-	-	
Thr	-	0.98	-	1.01	1.01	-	-	0.86	-	1.03		1.04	-	-	-	
Ser	0.91	-	-	-	4.00	-	-	0.87	-	0.97		-	-	-	-	
Glx	2.05	0.93	1.04	1.16	-	-	-	1.01	-	3.11		-	2.08	-	-	
Pro	-	-	-	1.01	2.14	-	-	-	-	0.96		-	1.01	-	-	
Gly	-	2.03	1.07	-	2.12	1.01	-	0.98	-	-		-	-	-	-	
Ala	1.04	-	3.91	-	1.08	1.04	-	1.04	-	1.21		-	2.10	-	2.64	
Val	1.00	-	1.94	0.95	1.00	-	-	1.92	-	1.15		-	-	1.00	1.78	
Ile	-	0.85	-	0.84	1.15 (2)	-	-	-	1.00	-		-	-	-	-	
Leu	-	2.06	0.98	2.21	1.09	-	-	1.04	1.02	3.06		-	-	1.00	1.14	
Tyr	-	-	-	1.06	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	1.00
Phe	-	-	-	-	3.16	-	-	0.97	-	1.78		-	1.02	-	-	
His	0.95	-	-	-	-	0.96	-	-	-	1.69		-	-	-	0.93	1.00
Lys	1.11	0.94	-	-	-	1.02	1.00	1.31	1.03	1.01		-	0.91	-	-	1.00
Arg	-	-	0.87	0.94	1.03	-	-	-	-	0.90		-	-	1.00	0.98	-
Cys	-	-	0.94	-	-	-	-	-	-	1.04		-	0.98	-	-	-
Met	-	-	-	-	1.02	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Trp	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6	22			12	3	8	3

### Ergebnisse und Diskussion

Die Ordnung der Gänsevögel (*Anseriformes*) wird in zwei Familien aufgeteilt: die Wehrvögel (Anhimidae) und die Entenvögel (Anatidae). Die Familie der Entenvögel wird aus drei Unterfamilien gebildet: Spaltfußgänse (Anseranatinae), Gänseverwandte (Anserinae) und Entenverwandte (Anatinae). Aus den letzten zwei Unterfamilien wurden bereits einige Arten untersucht<sup>[2-4]</sup>. Die erste Unterfamilie, die Spaltfußgänse, umfaßt nur eine Gattung und Art: die Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*). Die systematische Stellung dieses Vogels ist umstritten. Er ist weder Ente noch Gans und hat viele Besonderheiten. Es wird auch für möglich gehalten, daß die Spaltfußgans eine ursprüngliche Form der Gänse darstellt oder auch das Bindeglied zu den Wehrvögeln sein könnte. Wir erhofften durch die Primärstruktur des Hämoglobins Aussagen darüber erhalten zu können.

#### Hämoglobin der Spaltfußgans

Aus dem Hämolysat wurde bei der Spaltfußgans eine Hauptkomponente (HbA) isoliert (ca. 90%). Eine Nebenkomponeute mit  $\alpha^D$ -Ketten wurde hier nur zu ca. 5% (ähnlich den Gänsen, abweichend von Fasan und Huhn mit ca. 20%) gefunden<sup>[14]</sup>. In der Kettentrennung (Abb. 3 u. 4) wurden 2 weitere  $\alpha$ -Ketten isoliert ( $\alpha_1$  und  $\alpha_3$ ). Dabei ist  $\alpha_1$  vom  $\alpha^D$ -Kettentyp und  $\alpha_3$  vom  $\alpha^A$ -Kettentyp.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der Hauptkomponente ist in Abb. 5 wiedergegeben: die Unterschiede zum Hämoglobin der Graugans (*Anser anser*) sind eingetragen. Die  $\alpha$ -Ketten unterscheiden sich in 13, die  $\beta$ -Ketten in 6 Aminosäuren. Durch vier Zweipunktmutationen  $\alpha 8(A6)Thr \rightarrow Gly$ ,  $\alpha 12(A10)Gly \rightarrow Thr$ ,  $\alpha 34(B15)Thr \rightarrow Gln$  und  $\alpha 116(GH4)Ala \rightarrow Leu$  sind im Gen der  $\alpha$ -Ketten mindestens 17 Mutationen erfolgt. Mutationen findet man überwiegend im N-terminalen (A- und B-Helix) und C-terminalen Bereich (G- bis H-Helix).

Vier  $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen sind verändert:  $\alpha 30(B11)Glu \rightarrow Gln$ ,  $\alpha 34(B15)Thr \rightarrow Gln$ ,  $\alpha 35(B16)Ala \rightarrow Thr$  und  $\alpha 36(B17)Tyr \rightarrow Phe$ .

Die  $\beta$ -Ketten sind im N-terminalen Bereich konstant. Drei der sechs Mutationen findet man von

$\beta 119$  bis  $\beta 125$ . Zwei davon,  $\beta 119(GH2)Ala \rightarrow Ser$  und  $\beta 125(H3)Glu \rightarrow Asp$ , haben  $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen verändert. Weiter ist auch in  $\beta 55(D6)Leu \rightarrow Ile$  eine  $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstelle verändert.

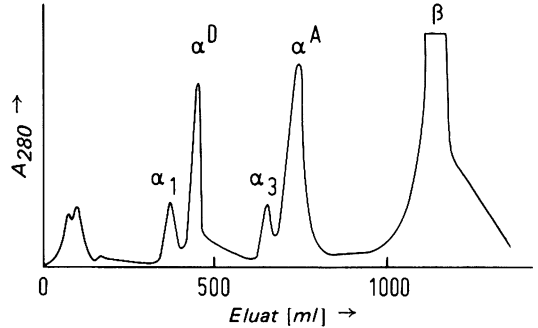


Abb. 3. Trennung des Globins -- ohne vorherige Abtrennung der Nebenkomponeuten -- über CM-Cellulose CM-52 (Säule 2.5 x 15 cm).

Startpuffer: 8M Harnstoff + 0.02M Natriumacetat, pH 5.4 + 0.02% Mercaptoethanol.

Elutionspuffer: Startpuffer + 0.4M NaCl.

Durch unterschiedlichen Trp- und Tyr-Gehalt in den  $\alpha^A$ -,  $\alpha^D$ - und  $\beta$ -Ketten entspricht die Größe der Gipfel nicht den tatsächlichen Mengenverhältnissen an Protein.

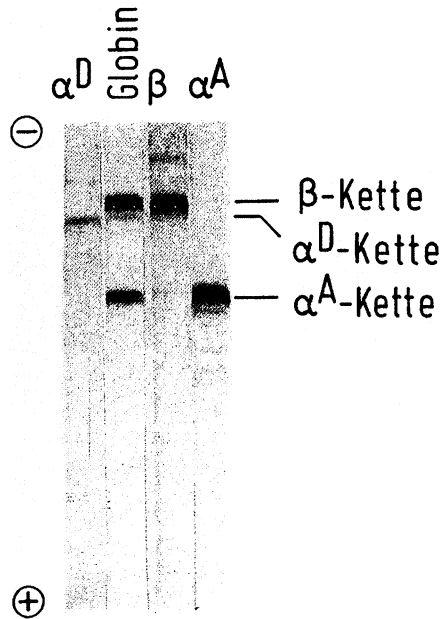


Abb. 4. Triton-X-100-Elektrophorese des Globins und der isolierten Ketten<sup>[15]</sup>.



Graugans $\alpha$		Thr	10	Gly	Ser		20	
Spf-Gans $\alpha$	Val-	-Leu-Ser-Ala-Ala-Asp-Lys-Gly-Asn-Val-Lys-Thr-Val-Phe-Gly-Lys-Ile-Gly-Gly-His-Ala-Glu-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Thr-Leu-						
Spf-Gans $\beta$	Val-His-Trp-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu-Ile-Thr-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-						-Asn-Val-Ala-Asp-Cys-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-	
Graugans $\beta$			10				20	
	Glu 31	Thr-Ala-Tyr		40			His	51
	-Gln-Arg-Met-Phe-Gln-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-						-Asp-Leu-Gln-Pro-	-Gly-Ser-Ala-
	-Ala-Arg-Leu-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Pro-Thr-Ala-Ile-Ile-Gly-Asn-Pro-							
	30		Gln 40				50	Leu
		60			Val 71			80
	-Gln-Ile-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Ala-Leu-Val-Glu-Ala-Ala-Asn-His-Ile-Asp-Asp-Ile-Ala-Gly-Ala-Leu-Ser-Lys-Leu-							
	-Met-Val-Arg-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Thr-Ser-Phe-Gly-Glu-Ala-Val-Lys-Asn-Leu-Asp-Asn-Ile-Lys-Asn-Thr-Phe-Ala-Gln-Leu-							
	60		70	Asp			80	
		90			100			Val 110
	-Ser-Asp-Leu-His-Ala-Gln-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-Gly-His-Cys-Phe-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ile-His-His-							
	-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asp-Ile-Leu-Ile-Ile-Val-Leu-Ala-Ala-His-Phe-							
	90		100				110	
		Ala 120		Leu		130	Gly	140
	-Pro-Ser-Leu-Leu-Thr-Pro-Glu-Val-His-Ala-Ser-Met-Asp-Lys-Phe-Leu-Cys-Ala-Val-Ala-Thr-Val-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr-Arg							
	-Ser-Lys-Asp-Phe-Thr-Pro-Asp-Cys-Gln-Ala-Ala-Trp-Gln-Lys-Leu-Val-Arg-Val-Val-Ala-His-Ala-Leu-Ala-Arg-Lys-Tyr-His							
	Ala 120 Glu		Glu		130			140

Abb. 5. Die Sequenz der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der Hämoglobinhauptkomponente der Spaltfußgans (Spf-Gans) (*Anseranas semipalmata*) in homologer Weise<sup>[16]</sup> gegenübergestellt. Die Unterschiede zum Hämoglobin der Graugans<sup>[2]</sup> sind eingetragen.

$\beta 39(\text{C5})\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$  zeigt eine Mutation einer  $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstelle (Oxy-Form). Die Austausch der  $\alpha$ -Ketten sind insgesamt neutral, während in die  $\beta$ -Ketten eine zusätzliche Ladung durch  $\beta 39(\text{C5})\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$  eingeführt wird. In den  $\alpha$ -Ketten fehlt u.a. ein Tyrosin und ein Histidin. Außerdem findet man in den  $\alpha$ -Ketten ein zusätzliches Methionin.

### Physiologie und Systematik

Untersuchungen über Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, über Phosphate und ihre Konzentration, sind nicht durchgeführt worden. Es sind auch keine anderen Daten bekannt. Durch die Mutation  $\beta 39(\text{C5})\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$  an einer  $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstelle sind aber Auswirkungen auf die Sauerstoffaffinität und die Stabilität des tetrameren Moleküls zu erwarten. Eine Mutation an dieser Position ist bisher bei  $\beta$ -Ketten nicht gefunden worden, außer zwei abnormalen menschlichen Hämoglobinen: Hämoglobin Alabama  $\beta 39(\text{C5})\text{Gln}\rightarrow\text{Lys}$ <sup>[17]</sup> und Hämoglobin Vaasa  $\beta 39(\text{C5})\text{Gln}\rightarrow\text{Glu}$ <sup>[18]</sup>, wie auch bei der Spaltfußgans gefunden. Hämoglobin Alabama hatte bei dem Patienten keine besonderen physiologischen Auswirkungen. Bei Hämoglobin Vaasa dagegen wird eine Anämie beschrieben<sup>[18]</sup>. Von keinem sind Affinitätsmessungen durchgeführt worden. Die große Anzahl Mutationen an  $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen läßt ebenfalls einen Unterschied in der Sauerstoffaffinität zur Graugans erwarten.

Wie auch bei anderen Vögeln, findet man bei der Spaltfußgans in den  $\alpha$ -Ketten eine höhere Mutationsrate (Faktor 2.8) als in den  $\beta$ -Ketten<sup>[2-4,19,20]</sup>. Die Mutationsrate der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der bisher untersuchten Vögel unterscheidet sich um den Faktor 2–5. Dies wurde auf die strenge Wechselwirkung des Inosit- $P_5$  mit den  $\beta$ -Ketten der Vögel zurückgeführt<sup>[31]</sup>, das die Struktur viel stärker fixiert und dadurch die Evolutionsgeschwindigkeit der  $\beta$ -Ketten reduziert. Dies kann auch hier wieder bestätigt werden.

In Tab. 4 wird das Hämoglobin der Spaltfußgans mit anderen Vögeln homolog verglichen und die Unterschiede aufgeführt. Die geringste Anzahl von Mutationen findet man zur Graugans in den  $\alpha$ -Ketten (17 Nucleotidunterschiede), zur Kanadagans in den  $\beta$ -Ketten (5 Nucleotidunterschiede).

Die Stockente (*Anas platyrhynchos*)\* dagegen unterscheidet sich in den  $\alpha$ -Ketten schon um 20, in den  $\beta$ -Ketten um 8 Nucleotide. Wesentlich mehr Sequenzunterschiede erhält man zu Huhn ( $\alpha/\beta$  28/8) und Strauß ( $\alpha/\beta$  30/8).

Graugans und Stockente unterscheiden sich aber nur in  $\alpha/\beta$  4/3 Aminosäuren oder 5/3 Nucleotiden. Sie sind sich also wesentlich ähnlicher, als Spaltfußgans/Graugans ( $\alpha/\beta$  17/6 Nucleotide) und Spaltfußgans/Stockente ( $\alpha/\beta$  20/8 Nucleotide). Mit Spaltfußgans, Graugans und Stockente vergleicht man je eine Art aus den drei Unterfamilien der Familie Entenvögel (Anatidae). Die Unterschiede von Spaltfußgans zur Ente oder Graugans liegen aber in der Größenordnung wie von z.B. Fasan/Stockente. Das heißt, die Unterschiede von Spaltfußgans zu Gänsen und Enten sind so groß, wie sie zwischen verschiedenen

Tab. 4. Anzahl der Aminosäure- und Nucleotidunterschiede beim Vergleich der Hämoglobine von Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*), Kanadagans (*Branta canadensis*)<sup>[14]</sup>, Graugans (*Anser anser*)<sup>[21]</sup>, Höckerschwan (*Cygnus olor*)<sup>[14]</sup>, Stockente (*Anas platyrhynchos*)\*, Strauß (*Struthio camelus*)<sup>[31]</sup>, Huhn (*Gallus gallus*)<sup>[20,21]</sup> und Fasan (*Phasianus colchicus colchicus*)<sup>[19]</sup>.

Nur bei Vögeln wird die unterschiedliche Mutationsrate der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten gefunden. Wir führen diesen Unterschied auf den heterotropen allosterischen Effektor Inosit- $P_5$  zurück, der in der Desoxyform des Hämoglobins zwölf zusätzliche Bindungsstellen nur zu den  $\beta$ -Ketten bildet<sup>[22]</sup>. Die  $\beta$ -Ketten sind durch diese zusätzliche Wechselwirkung sterisch stärker fixiert, was zu einer Verminderung der erlaubten Mutationen führt.

Art	Aminosäure	Nucleotid
	$\alpha/\beta$	$\alpha/\beta$
Spaltfußgans / Kanadagans	14/5	18/5
/ Graugans	13/6	17/6
/ Höckerschwan	16/5	21/5
/ Stockente	16/8	20/8
/ Huhn	23/8	28/8
/ Strauß	25/8	30/8
Stockente / Graugans	4/3	5/3
Fasan / Graugans	18/7	18/7
Fasan / Stockente	17/4	18/4

\* J. Godovac-Zimmermann, persönl. Mitteilung.

Ordnungen gefunden werden z.B. Galliformes/Anseriformes. Dies deutet darauf hin, daß die Systematik neu überdacht werden muß.

Die Frage, ob die Spaltfußgans eine ursprüngliche Form der Gänse, also einen Vorläufer darstellt, läßt sich aus den hier vorliegenden Daten noch nicht eindeutig beantworten. Die Aminosäuren  $\alpha 100(\text{G7})\text{Phe}$  und  $\alpha 103(\text{G10})\text{His}$  wurden bisher nur bei Gänsevögeln gefunden, so auch bei der Spaltfußgans. Anhand der geringeren Unterschiede zur Graugans kann man auch annehmen, daß die Spaltfußgans nach dem Vergleich der Hämoglobine den Gänsen näher verwandt ist, als den Enten. Die Unterschiede zu Gänsen und Enten sind aber groß: eine Trennung der Spezies muß daher vor mindestens 50–60 Millionen Jahren stattgefunden haben.

Für hervorragende Mitarbeit sei Fr. *Erna Müller* gedankt. Weiterhin danken wir Herrn *Anton Stangl*, Fr. *Barbara Schrank* und Herrn *Klaus Krombach* für die Arbeit am Analysator und Sequenator.

#### Literatur

- 1 53. Mitteil.: Kleinschmidt, T. & Braunitzer, G. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 1209–1215.
- 2 Oberthür, W., Braunitzer, G. & Kalas, S. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 1101–1112.
- 3 Oberthür, W., Voelter, W. & Braunitzer, G. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 969–975.
- 4 Oberthür, W., Braunitzer, G. & Würdinger, I. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 581–590.
- 5 Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) *Anal. Biochem.* **69**, 468–478.
- 6 Hirs, C.H.W. (1956) *J. Biol. Chem.* **219**, 619–621.
- 7 Kratzin, H., Yang, C., Krusche, J.U. & Hilschmann, N. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1591–1598.
- 8 Edman, P. & Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- 9 Braunitzer, G. & Schrank, B. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 417.
- 10 Braunitzer, G., Schrank, B. & Ruhfus, A. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 1589–1590.
- 11 Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1730–1732.
- 12 Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 777–783.
- 13 Zimmermann, C.L. & Pisano, J. (1977) *Methods Enzymol.* **57**, 45–51.
- 14 Oberthür, W., Godovac-Zimmermann, J. & Braunitzer, G. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 777–787.
- 15 Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D., Gravely, M.E. & Huisman, T.H.J. (1980) *Br. J. Haematol.* **44**, 527–534.
- 16 Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, U. & Wittmann-Liebold, B. (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **325**, 283–286.
- 17 Brinhall, B., Jones, R.T., Schneider, R.G., Hosty, T.S., Tomlin, G. & Atkins, R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **379**, 28–30.
- 18 Kendall, A.G., Pas, A.T., Wilson, J.B., Cope, N., Bolch, K. & Huisman, T.H.J. (1977) *Hemoglobin* **1**, 292–295.
- 19 Braunitzer, G. & Godovac, J. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 229–238.
- 20 Knöchel, W., Wittig, B., Wittig, S., John, M.E., Grundmann, U., Oberthür, W., Godovac, J. & Braunitzer, G. (1982) *Nature (London)* **295**, 710–712.
- 21 Matsuda, G., Maita, T., Mizuno, K. & Ota, H. (1973) *Nature (London) New Biol.* **244**, 244.
- 22 Arnone, A. & Perutz, M.F. (1974) *Nature (London)* **249**, 34–36.

Dr. Walter Oberthür und Prof. Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried.

PD Dr. Henning Wiesner, Tierpark Hellabrunn, D-8000 München.