

**Respiration at High Altitudes, Phosphate-Protein-Interaction: Sequence of the Hemoglobins of the Hamster (*Mesocricetus aureatus*) and the Camel (*Camelus ferus*, Camelidae).**

**Höhenatmung, Phosphat-Protein-Wechselwirkung: Die Sequenz der Hamoglobine des Goldhamsters (*Mesocricetus aureatus*) und des zweihöckerigen Kamels (*Trampeltier*, *Camelus ferus*, Camelidae)**

GERHARD BRAUNITZER, BARBARA SCHRANK, ANTON STANGL UND HENNING WIESNER

*Max-Planck-Institute für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, D-8033 Martinsried bei München (West Germany),  
Am Klopferspitz, Tierpark Hellabrunn, München.*

(Received 23rd November 1979)

**Summary:** The sequence of the main component of the hemoglobin of the hamster and that of the camel (*Camelus ferus*) is given. The sequence is obtained automatically by the sequenator using the quadrol and the propyne programme. The sequence of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of the hamster is compared with the human hemoglobin; the sequence of the hemoglobin of the camel (*Camelus ferus*, Camelidae), in comparison to the llama, there are to be found in the  $\alpha$ -chains five amino acid exchanges, in the  $\beta$ -chains are two exchanges – in  $\beta 2$  and  $\beta 76$  – only. The sequence  $\beta 2$  in camel – the P<sub>2</sub>-glycerate contact – is histidine: This sequence sustains the interpretation of the high altitude respiration of the llama as mutation  $\beta 2 \text{His} \rightarrow \text{Asn}$ . The amino acid sequence of the hemoglobin of *Camelus ferus* and *Camelus dromedarius* is identical.

Wir berichten über die Sequenz der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Goldhamsters Hauptkomponente, und des zweihöckerigen Kamels, des Trampeltiers (Camelidae): Diese werden mit den Hämoglobinen des Menschen bzw. des Lamas verglichen und die Sequenz im Hinblick auf molekular Aspekte der Höhenatmung<sup>1,2</sup> diskutiert.  
**Experimenteller Teil**

*Gewinnung des Hämoglobins des Goldhamsters und des Kamels.*

Das Hämoglobin vom Goldhamster wurde aus dem Tierstall unseres Instituts erhalten. Die Präparate wurden auf Einheitlichkeit in der Diskelektrophorese untersucht. Es konnten eine Haupt- und zwei weitere Nebenkomponten in geringerer Menge nachgewiesen werden. Blut vom Kamel (Trampeltier, *Camelus ferus*) war aus dem Tierpark Hellabrunn, München: Die Elektrophorese zeigte eine einzige Bande. Die Gewinnung der Erythrozyten, die Lyse und die Gewinnung des Rohhämoglobins erfolgte nach Standardmethoden, die Lösung wurde bei -30°C aufbewahrt. Die Gewinnung des Globins erfolgte nach der Aceton-HCl-Methode.

Die Trennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten erfolgte durch Harnstoffpuffern über CM-Cellulose<sup>3</sup>. Beim Goldhamster konnten in einer Chromatographie die  $\alpha$ - wie  $\beta$ -Ketten der Hauptkomponente leicht in reiner Form isoliert werden. Die wiedergegebene Sequenz ist die der

Hauptkomponente, Spaltungen wurden mit Trypsin und Bromcyan<sup>4</sup> durchgeführt.

Tryptische Peptide wurden nach Ansauern auf pH 2,0 über Sephadex G-25 (2.5X110 cm) in 0,1 N Essigsäure vorfraktioniert, die einzelnen Gipfel wurden über Dowex 1X2<sup>5</sup> oder Dowex 50X4 rechromatografiert.

*Sequenzanalyse*

*Es wurde mit der Filmtechnik<sup>6</sup> gearbeitet.*

Programme: a) Quadrolprogramm, b) Dimethyl- oder Diäthyl aminopropinprogramm<sup>7</sup>.

a) Quadrolprogramm: Die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten wurden in starker Anlehnung an die Originalarbeit<sup>6</sup> und mit zwei Cyclisierungen abgebaut. Weiterhin wurde das Programm zur automatischen Sequenzanalyse von Lysylpeptiden mit den hydrophilen Senfölen, Reagenz I<sup>1</sup> oder IV<sup>9</sup> verwendet.

b) Propinprogramm: Das hydrophobe Programm wurde für Peptide mit C-terminalem Arginin (mit 150 sec Butylchlorid anstelle Essigester) verwendet: Gearbeitet wurde bei 3000 (high speed) und 200 (low speed) Umdrehungen, um möglichst dünne Filme zu erreichen.

Konvertiert wurde mit 3 N Trifluoressigsäure 14 min bei 80°C. Die Thiohydantoine wurden mit Essigester extrahiert; nach Abdampfen des Esters wurden die

**Abkürzungen:**

Hb = Hämoglobin; P<sub>2</sub>-Glycerat = 2,3-bisphosphoglycerat; Quadrol = N,N,N',N'-Tetraäis (2-hydroxypropyl) ethylendiamin;

I = 1-(Isothiocyanato) benzol-4-sulfonsäure, Natriumsalz. IV = 7-(Isothiocyanato) naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Trinatriumsalz.

Thiohydantoine in Essigester – Methanol 1:1 (50  $\mu$ l) gelöst und meist durch Dünnschichtchromatographie wie früher beschrieben analysiert<sup>10</sup>. Nach dieser Methode werden sämtliche Thiohydantoine – einschließlich der Derivate des Histidins und Arginins auf einer Platte getrennt. Zur Identifizierung von Serin und Threonin wurde auch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie<sup>11</sup> herangezogen (Gerät Firma Hewlett-Packard, Modell HPLC 1084 B). Die Analysen wurden mit dem Gerät der Firma Beckman Instruments, Modell 121 C, Palo Alto, California (2-Säulensystem), durchgeführt. (Einwaage: max. 400  $\mu$ g Protein, bzw. 200  $\mu$ g Peptid).

Als Sequenator stand der Sequencer der Firma Beckman Instruments, Modell 180 B, Palo Alto, California, zur Verfügung. Die Modifizierung des Gerätes für das Propinprogramm s. oben.

### Ergebnisse und Diskussion

#### *Die Sequenz des Hämoglobins des Goldhamsters<sup>†</sup>.*

Das Blut des Goldhamsters: Die Elektrophorese des Lysates der Erythrozyten<sup>12</sup> ergab mehrere Hämoglobinbanden. Eine Haupt- und mehrere minor Komponenten. Zur Untersuchung und Analyse der Sequenz mußten erst die Komponenten getrennt werden. Recht bald jedoch konnten wir zeigen, daß die Peptidketten der Hauptbande durch Chromatographie über CM-Cellulose in 8 M Harnstoff leicht in reiner Form erhalten werden. Der Vergleich der Sequenz zum Menschen ergibt einen relativen großen Unterschied sowohl in der Sequenz der  $\alpha$ -(36) wie der Sequenz der  $\beta$ -Ketten (19 Austausche). Die  $P_2$ -Glycerat-Bindungsstellen sind wie am adulten Menschen erarbeitet<sup>13,14</sup> – normal, also sieben (Abb. 1 und 2).

#### *Die Sequenz des Hämoglobins des Kamels.*

Die Sequenzanalyse des Hämoglobins des Kamels (Trampeltier, *Camelus ferus*, Camelidae) war insofern erleichtert, als sich zeigte, daß in der Elektrophorese nur eine Bande gefunden wird: Das Globin konnte direct einer Trennung unterworfen werden. Die isolierten Ketten wurden im Sequenator analysiert, weiterhin durch tryptische Spaltung und quantitative Charakterisierung und anschließende Sequenzanalyse charakterisiert. Die Sequenz sowohl der  $\alpha$ -wie der  $\beta$ -Ketten ist in Abb. 3 und 4 wiedergegeben. Wir haben – infolge der biologischen Aspekte<sup>15</sup> – die Sequenz nicht mit dem Hämoglobin des Menschen, sondern mit dem des Lamas verglichen<sup>1,2,15</sup>.

### *Paläontologie*

Die Paläontologie der Camelidae ist gut erforscht<sup>16,17</sup> und durch viele Funde belegt. Lama ("Schafskamel") und Kamel evolvierten vor ca. 15 Millionen Jahren aus einer gemeinsamen Stammlinie, bevor sie aus ihrer Urheimat – aus Nordamerika – im Pleistozän, nach Südamerika bzw. in die heutigen Regionen Asiens und Afrikas auswanderten. Es war zu erwarten, daß nur geringe Unterschiede zwischen beiden Proteiden gefunden werden. Die Sequenzanalyse bestätigt die Paläontologie: Die  $\alpha$ -Ketten unterscheiden sich in fünf Resten: Noch geringer ist der Unterschied in den  $\beta$ -Ketten, wo in zwei Positionen –  $\beta 2$  und  $\beta 76$  – ein Unterschied gefunden wird.

### *Höhenatmung*

Wir hatten früher die  $P_2$ -Glycerat-Protein-Wechselwirkung des menschlichen foetalen Hämoglobins und des Lama-Hämoglobins<sup>18</sup> untersucht: die höhere Sauerstoffaffinität dieser Hämoglobine wurde gedeutet als Unterbrechung der Phosphatbindungsstellen in  $\gamma 143$  (Serin) bei Foetus und  $\beta 2$  (Asparagin) beim Lama<sup>1,2</sup>. Die Untersuchungen am Kamel sollten diese Hypothese bestätigen.

Die  $\beta$ -Ketten des Lamas und des Kamels zeigen nur zwei Austausche; es kann daher angenommen werden, daß die Tertiärstruktur der  $\beta$ -Ketten des Lamas und des Kamels gleich sind: Beim Vergleich der Tertiärstruktur des HbA und HbF<sup>19</sup> des Menschen werden – als Ergebnis der großen Sequenzunterschiede zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten<sup>20</sup> – u.a. in einer kleinen Verschiebung der A-Helix, gefunden. Weiterhin zeigt sich, daß eben der Rest in  $\beta 2$ , also eine  $P_2$ -Glycerat-Bindungsstelle, die wir früher für die Höhenatmung verantwortlich gemacht haben, beim Kamel als Histidin vorliegt, d.h., daß die  $\beta$ -Ketten des Dromedars und des Kamels sieben – im Gegensatz zum Lama fünf – Bindungsstellen zum  $P_2$ -Glycerat bilden.

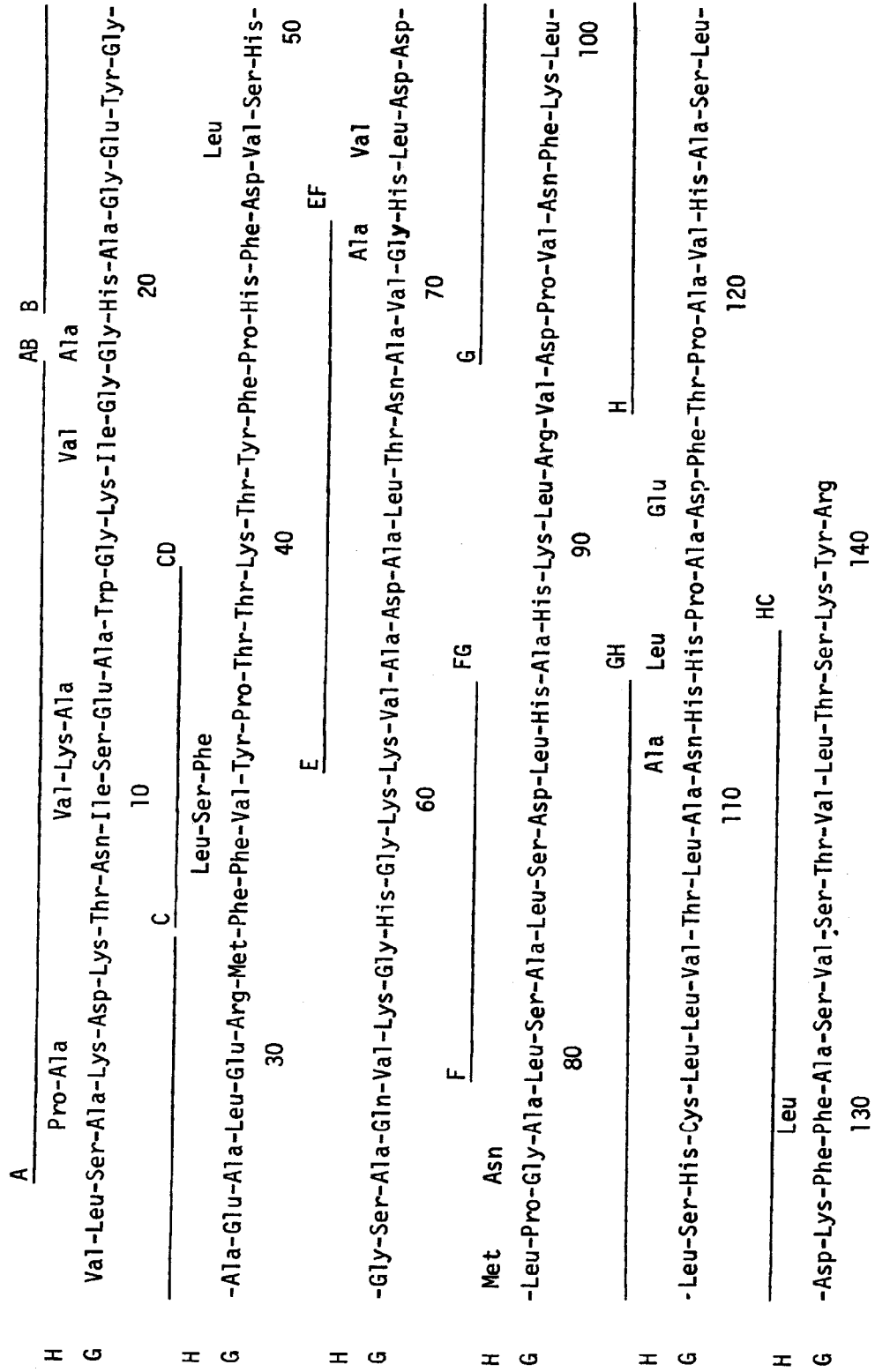
Die hier vorgelegten Daten wurden durch Messungen der  $O_2$ -Affinität am Hämoglobin des Lamas<sup>21</sup>, des Blutes des Dromedars<sup>22</sup>, durch Affinitätsmessungen des  $P_2$ -Glycerats am adulten und foetalen Hämoglobin des Menschen, am Hämoglobin des Lamas und des Kamels vervollständigt<sup>23</sup>. Sie bestätigen die Deutung der Höhenatmung des Lamas also Unterbrechung der  $\beta 2$  (NA2) Bindungsstelle zu  $P_2$ -Glycerat durch Asparagin.

#### *Camelus ferus, Camelus dromedarius*

Die hier vorgelegte Sequenz des *Camelus ferus* und die früher veröffentlichte Sequenz von *Camelus drome-*

<sup>†</sup>Die Heimat des Goldhamsters ist Syrien. Der heutige Wohnraum erstreckt sich von Rumänien bis Iran.

Abb. 1 Die Konstitution der  $\alpha$ -Ketten der Hauptkomponente des Hamoglobins des Goldhamsters. Die helicalen und die interhelicalen Teile (A ... H, bzw. AB, EF, ...) der Peptidketten sind eingetragen. Die Austauschgenenüber Human-Hamoglobin wurden in homologer Weise dadurch gekennzeichnet, daß die beim Menschen vorkommenden unterschiedlichen Reste der Sequenz ubergestellt wurden.





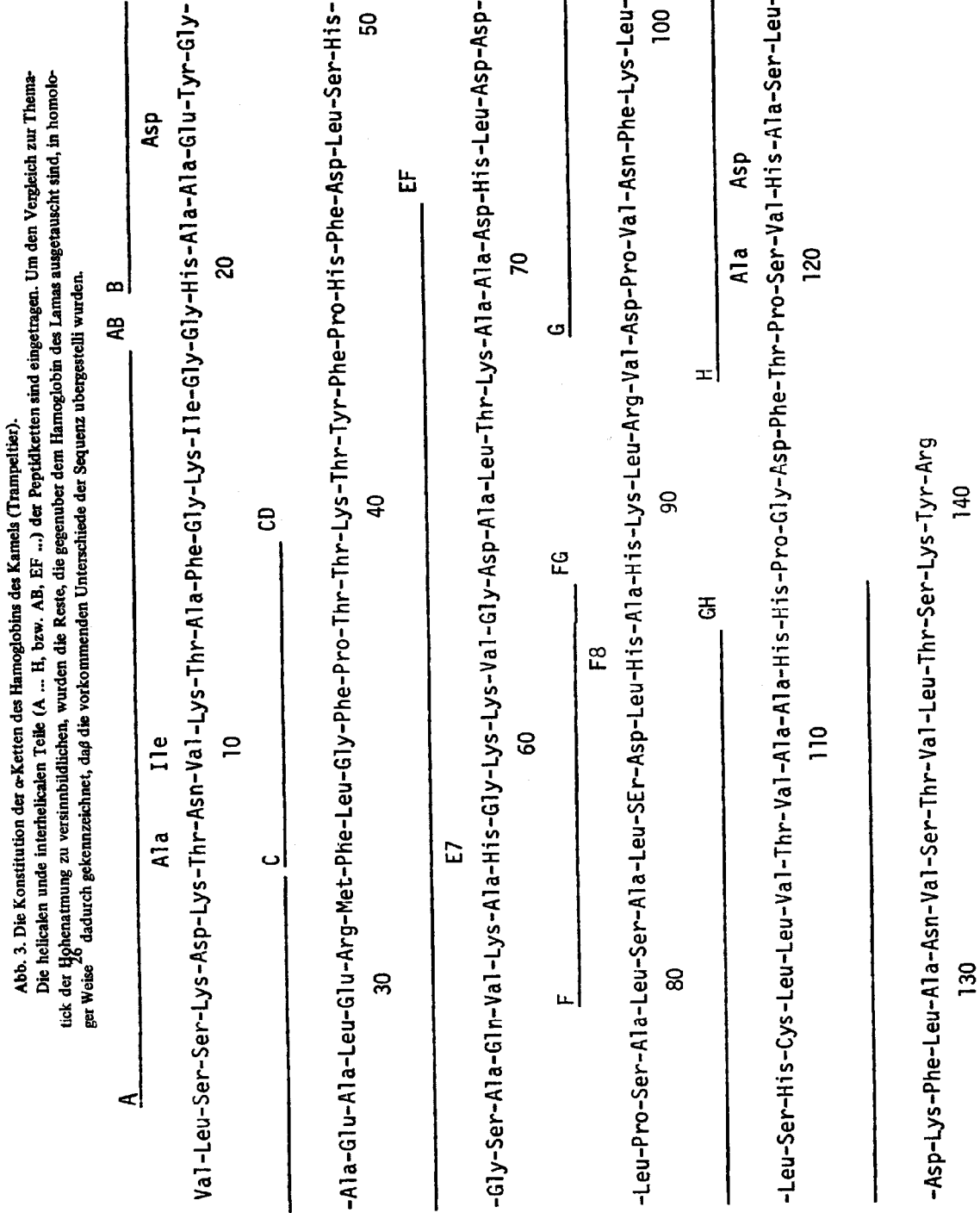
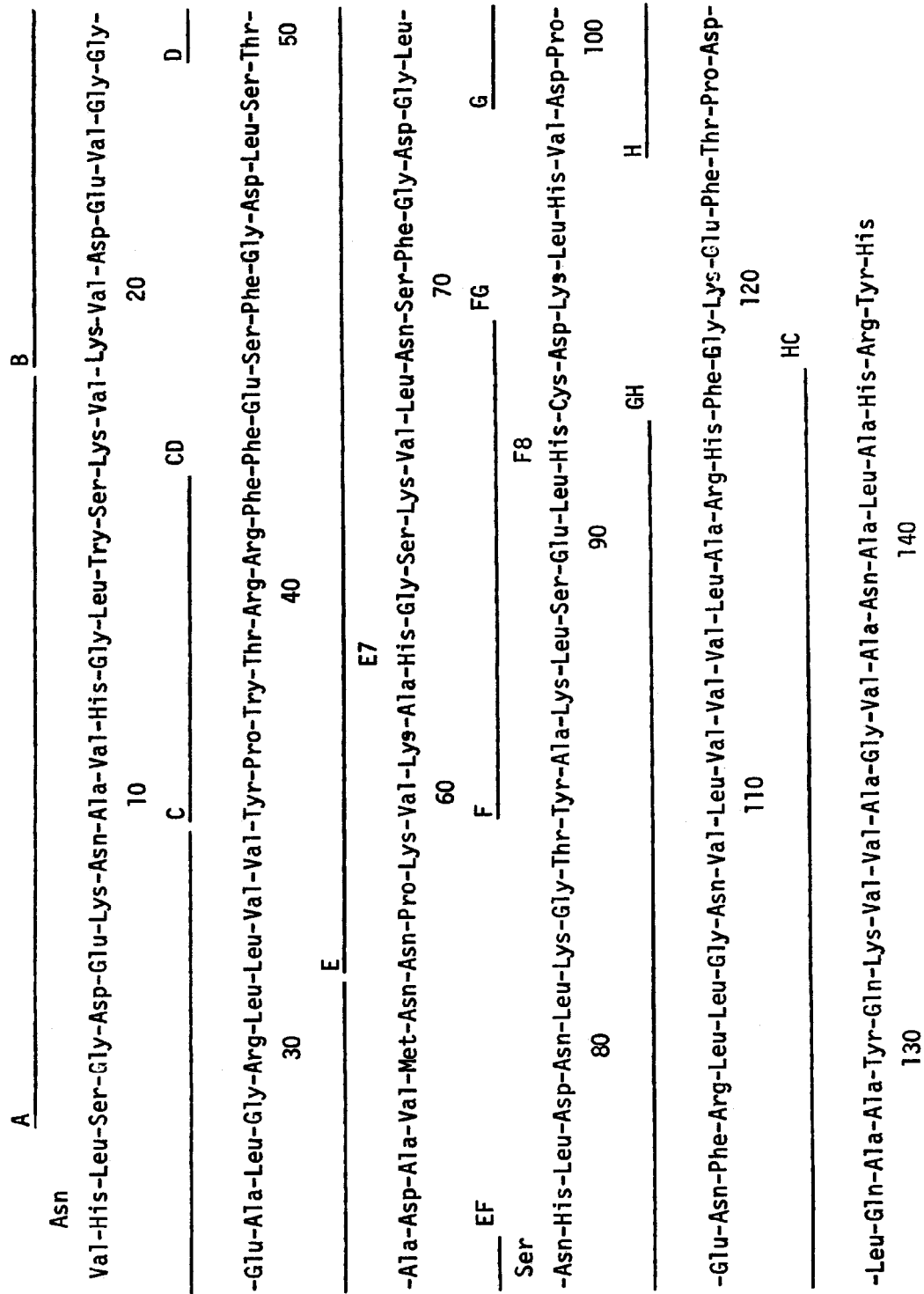


Abb. 4 Die Konstitution der  $\beta$ -Ketten des Hamoglobins des Kamels (Trampeltier).  
Wie ersichtlich unterscheiden sich die Ketten gegenüber dem Lama im Austausch von nur zwei Aminosäuren: Dem Austausch in  
Position  $\beta 2$  (Phosphatbindungsstelle) kommt besonderer Bedeutung zu.



darius<sup>24</sup> sind identisch. Die Auswanderung des Kamels aus Nordamerika in die heutigen Regionen Asiens und Afrikas ist paläontologisch belegt, lediglich die Datierungen schwanken. Diese spielen insofern keine Rolle, da die Mutationskonstante für Hämoglobin  $\sim 6 \cdot 10^6$  Jahre beträgt, die Auswanderung aus Nordamerika bzw. die Immigration der Cameliden in Eurasien erst im Pleistozän erfolgte ( $1-2 \cdot 10^6$  Jahre): Die Ausgrabungen im Pleistozän zeigen aber *einen* gemeinsamen Vorfahren (Paracamelus<sup>16</sup>): Die Differenzierung zum Kamel (Trampeltier) und Dromedar erfolgte später und in den heutigen Regionen, die gleiche Sequenz ist daher nicht überraschend. Identische Hämoglobine wurden bei Primaten, beim Menschen und Schimpansen gefunden<sup>25</sup> Herrn Prof. Dr. C. Bauer, Regensburg, danken wir für viele wertvolle Diskussionen. Wir danken Fräulein Helga Mairhofer für wertvolle Mitarbeit und Herrn Claus Krombach für die Hilfe bei der Trennung der Peptidketten. Herrn Dr. med. vet. V. Hornberger danken wir für die Bereitstellung von Blut des Goldhamsters.

#### References

- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Bauer, C. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 921-925 (1977).
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Bauer, C. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 547-558 (1978).
- Clegg, J.B., Naughton, M.A. & Weatherall, D.J., *J. Mol. Biol.*, **19**, 91-108 (1966).
- Gross, E. & Witkop, B. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1510-1511 (1961).
- Rudloff, V. & Braunitzer, G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **323**, 129-144 (1961).
- Edman, P. & Begg, J. *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80-91 (1967).
- Braunitzer, G., Schrank, B., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 417 (1976).
- Braunitzer, G., Schrank, B. & Ruhfus, A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 1589-1590 (1970).
- Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1730-1732 (1971).
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 137-146 (1978).
- Yoshida, H., Zimmerman, C.L., Pisano, J.J. "Peptides: Chemistry, Structure and Biology," Walter, R. & Meienhofer, J., Eds., S. 955-965, Ann Arbor, Science Publ., Inc., Ann Arbor, Mich., USA (1975).
- Sikkema, D.A., Nion-Ching, W. & Zucker, R.M., *Biochem. Biophys. Acta.*, **493**, 393-399 (1977).
- Arnone, A. *Nature (London)*, **237**, 146-149 (1972).
- Arnone, A. & Perutz, M.F. *Nature (London)* **249**, 34-36 (1974).
- Braunitzer, G., Schrank, B. & Stangl, A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 409-412 (1977).
- Thenius, E. *Phylogenie der Mammalia*, Walter de Gruyter, Berlin (1969).
- Colbert, E.H. *Die Evolution der Wirbeltiere*, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1965).
- Petschow, D., Wurdinger, J., Baumann, R., Duhm, J., Braunitzer, G. & Bauer, C. *J. Appl. Physiol.*, **42**, 139-143 (1977).
- Frier, J.A. & Perutz, M.F. *J. Mol. Biol.*, **112**, 97-112 (1977).
- Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Cormick, J. & Jones, R.T. *Biochemistry*, **2**, 992-1008 (1963).
- Bartels, H., Hilpert, P., Barbey, K., Betke, K., Riegel, K., Long, E.M. & Metcalfe, J. *Am. J. Physiol.*, **205**, 331-336 (1963).
- Riegel, K., Bartels, H., El Yassim, D., Oufi, J., Kleihauer, E., Darer, J.T. & Metcalfe, J. *Resp. Physiol.*, **2**, 173-181 (1967).
- Bauer, C., Rollema, H.S., Till, H.W. & Braunitzer, G. *J. comp. Physiol.*, im Druck (1979).
- Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Wiesner, H. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, im Druck (1979).
- Rifkin, D.B. & Konigsberg, W. *Biochem. Biophys. Acta*, **104**, 457-461 (1965).
- Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **325**, 283-286 (1961).