

Biological Chemistry Hoppe-Seyler

THE OFFICIAL ORGAN OF THE GESELLSCHAFT FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE

This Journal was founded in 1877 as *Zeitschrift für Physiologische Chemie* by F. Hoppe-Seyler and was continued after his death under the editorship of A. Kossel, F. Knoop, K. Thomas, F. Lynen, A. Butenandt and G. Weitzel as *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* [Volume 21 (1895)–Volume 365 (1984)].

Volume 367

January 1986

Number 1

Inhaltsverzeichnis

Newsletter 1986

Nomenclature Committee of IUB and IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature

Reinigung und Charakterisierung einer 3'-Phosphoadenylylsulfat:Chondroitin-6-Sulfotransferase aus Arteriengewebe
J. Hollmann, R. Niemann und E. Buddecke

Wechselwirkungen zwischen Lectinen und anderen Komponenten der Proteinkörper von Leguminosen
W. Einhoff, G. Fleischmann, T. Freier, H. Kummer und H. Rüdiger

Isolierung, Auftrennung und partielle Charakterisierung der Lectine aus den Samen von *Robinia pseudoacacia*
G. Fleischmann und H. Rüdiger

Das hochmolekulare Glycoprotein der Zelloberfläche von *Halobacterium halobium*: Physikalisch-chemische Charakterisierung bei niedriger und hoher Salzkonzentration
K. Hecht, F. Wieland und R. Jaenicke

Reduzierung des Abbaus von Herzstrukturproteinen im infarzierten Herzgewebe von Hunden durch den Cystein-Proteinase-Inhibitor Ep459
K. Tsuchida, H. Aihara, K. Isogai, K. Hanada und N. Shibata

Gegenseitiger Einfluß der Glucoseanomeren auf deren Phosphorylierung durch Hexokinase
M.-H. Giroix, A. Sener und W.J. Malaisse

Die Primärstruktur der Hämoglobine von Eisbär (*Ursus maritimus*, Carnivora) und Kragenbär (*Ursus tibetanus*, Carnivora)
O. Hofmann, T. Schreitmüller, G. Branitzer und H. Wiesner

Wirkung von Lokalanästhetika auf die Stearoyl-CoA-Desaturase von *Tetrahymena*-Mikrosomen
S. Umeki und Y. Nozawa

Untersuchungen an Cytochrom-c-Oxidase, XIII: Die Aminosäuresequenz des kleinen Membran-Polypeptids VIIIc aus dem respiratorischen Komplex IV von Rinderherzen
L. Meinecke und G. Buse

Carnitin-Stoffwechsel in isolierten Nierenrindentubuli der Ratte
S. Wagner, T. Deufel und W.G. Guder

Indexed in Current Contents

Contents

Newsletter 1986

Nomenclature Committee of IUB and IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature 1

Purification and characterization of a 3'-phosphoadenylylsulfate:chondroitin 6-sulfotransferase from arterial tissue
J. Hollmann, R. Niemann and E. Buddecke 5

Interactions between lectins and other components of leguminous protein bodies
W. Einhoff, G. Fleischmann, T. Freier, H. Kummer and H. Rüdiger 15

Isolation, resolution and partial characterization of two *Robinia pseudoacacia* seed lectins
G. Fleischmann and H. Rüdiger 27

The cell surface glycoprotein of *Halobacterium halobium*: Physico-chemical characterization in the absence and presence of salt
K. Hecht, F. Wieland and R. Jaenicke 33

Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor
K. Tsuchida, H. Aihara, K. Isogai, K. Hanada and N. Shibata 39

Reciprocal influence of glucose anomers upon their respective phosphorylation by hexokinase
M.-H. Giroix, A. Sener and W.J. Malaisse 47

The primary structure of Polar Bear (*Ursus maritimus*, Carnivora) and Asiatic Black Bear (*Ursus tibetanus*, Carnivora) hemoglobin
O. Hofmann, T. Schreitmüller, G. Braunitzer and H. Wiesner 53

Effect of local anesthetics on stearoyl-CoA desaturase of *Tetrahymena* microsomes
S. Umeki and Y. Nozawa 61

Studies on cytochrome c oxidase, XIII: Amino-acid sequence of the small membrane polypeptide VIIIc from bovine heart respiratory complex IV
L. Meinecke and G. Buse 67

Carnitine metabolism in isolated rat kidney cortex tubules
S. Wagner, T. Deufel and W.G. Guder 75

Instructions to authors after page 80

Die Primärstruktur der Hämoglobine von Eisbär (*Ursus maritimus*, Carnivora) und Kragenbär (*Ursus tibetanus*, Carnivora)*

Ottmar HOFMANN^{a**}, Thomas SCHREITMÜLLER^{a***} und Gerhard BRAUNITZER^a unter Mitarbeit von Henning WIESNER^b

^a Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Proteinchemie, Martinsried bei München

^b Tierpark Hellabrunn, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. November 1985)

Ce travail est dédié à Monsieur le Professeur Jean Roche à l'occasion de son 85^{ème} anniversaire

Zusammenfassung: Die Erythrocyten des Eisbären (*Ursus maritimus*) und des Kragenbären (*Ursus tibetanus*) enthalten jeweils nur eine Hämoglobinkomponente. Die vollständigen Sequenzen der α - und β -Ketten beider Arten werden angegeben. Die Bestimmung ihrer Primärstrukturen erfolgte an tryptischen Peptiden und

dem Prolylpeptid. Diese wurden über Gelchromatographie und RP-HPLC aufgetrennt. Die Hämoglobinketten von Eis- und Kragenbär zeigen identische Sequenzen. Evolutionäre Aspekte und Aspekte der Systematik werden diskutiert. Es wird eine Tabelle verschiedener Spezies mit identischen Hämoglobinsequenzen gegeben.

*The Primary Structure of Polar Bear (*Ursus maritimus*, Carnivora) and Asiatic Black Bear (*Ursus tibetanus*, Carnivora) Hemoglobin*

Summary: The adult Polar and Asiatic Black Bear have one hemoglobin component each. The complete amino-acid sequences of their α - and β -chains are presented. Their primary structures were determined by sequencing the tryptic and prolyl peptides. The alignment of these peptides

was deduced from homology to human hemoglobin chains. The hemoglobin sequences of the two species proved to be identical. The evolutionary aspects of this result are discussed. A table of identical hemoglobin sequences from different species is given.

Key words: Tetrameric hemoglobin, Polar Bear, Asiatic Black Bear, primary structure, identical hemoglobin sequences.

Die vorgelegte Arbeit steht im größeren Rahmen einer Untersuchung an Carnivoren, um auf molekularbiologischer Ebene die Frage zu beantworten, ob Großer und Kleiner Panda (*Ailuropoda melanoleuca* und *Ailurus fulgens*) Vertreter der Bären (Ursidae), der Kleinbären (Subursiden)

oder einer eigenen Familie sind^[2]. Wir haben deshalb die Sequenz der Hämoglobine zweier Vertreter der Bärenfamilie (Ursidae), nämlich die des Eisbären (*Ursus maritimus*) und des Kragenbären (*Ursus tibetanus*) ermittelt.

Enzym:

Trypsin (EC 3.4.21.4).

Abkürzungen:

Hb = Hämoglobin; TosPheCH₂Cl = (*N*-Tosyl-L-phenylalanyl)chlormethan; Quadrol = *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin; Propin = Diethylaminopropin; CM-Cellulose = Carboxymethylcellulose; Tp = tryptisches Peptid; RP-HPLC = reversed-phase high performance liquid chromatography.

* 89. Mitteilung über Hämoglobine; 87. und 88. Mitteilung s.l.c.^[1a,b].

** Auszug aus der Dissertation von Ottmar Hofmann, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität München, 1986, in Vorbereitung.

*** Auszug aus der Diplomarbeit von Thomas Schreitmüller, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität München, 1985.

Material und Methoden

Die untersuchten Blutproben stammten von einem Eisbären des Münchner Tierparks Hellabrunn, bzw. einem Kragenbären des Frankfurter Zoos. Zur Verhinderung der Koagulation waren sie mit Heparin versetzt. Nach Abzentrifugieren der Erythrocyten wurden diese zweimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen: zur Lyse wurde mit der 1.5fachen Menge (v/v) destillierten Wassers versetzt. Das Entfernen der Lipide erfolgte durch Zugabe eines Viertel Volumenanteils CCl_4 und anschließender Zentrifugation.

Der Hämoglobingehalt wurde nach Cannan bestimmt^[3].

Die Anzahl der Hämoglobinkomponenten der Lösung wurde durch Disk-Gelelektrophorese^[4] bestimmt, die der verschiedenen Untereinheiten über Triton-Gelelektrophorese^[5].

Die Hämabspaltung erfolgte nach der l.c.^[6], die Trennung der Globinuntereinheiten durch Ionenaustauschchromatographie^[7] über CM-Cellulose (Whatman CM-52). Die Fraktionen wurden durch Gelfiltration entsalzt. Die Bestimmung der Primärstruktur erfolgte durch Sequenzieren der Ketten sowie durch Sequenzbestimmung ihrer tryptischen Peptide.

Die Globinketten wurden sowohl in ihrer nativen, wie auch oxidierten Form^[8] mit $\text{TosPheCH}_2\text{Cl}$ -behandeltem Trypsin (Worthington) gespalten^[9]. Die Spaltungsdauer betrug 4 h bei Raumtemperatur (pH 10.9–9.4). Die Fraktionierung der tryptischen Peptide erfolgte über Sephadex G-25 bzw. G-50 (fine) mit 0.1M Essigsäure. Zur weiteren Fraktionierung wurde RP-HPLC eingesetzt. Als Säulenmaterialien fanden hierbei Li-Chrosorb RP2 und RP18 Anwendung.

Beim Kragenbären wurden die nativen α -Ketten einer Asp-Pro-Spaltung unterzogen^[10]. Die Reinigung des Peptids wurde auf einer Sephadex-G-50-fine-Säule durchgeführt.

Die Analysen wurden in einem Biotronik-Aminosäureanalysator Model LC 5000 vorgenommen. Hydrolysiert wurden jeweils 3–4 nmol Peptid oder Protein in 200 μl 5.7M HCl bei 110 °C 20 h. Die Tryptophanbestimmung erfolgte in Gegenwart von 6% Thioglycolsäure.

Sequenziert wurde^[11] in Beckman-Sequenzern 890 B und C, wobei sowohl das Quadrol-Programm^[12,13] (für große- und Lysin-Peptide), als auch das Propin-Programm^[14] (für Arginin- und Lysin-Peptide) Anwendung fanden. Die Identifizierung der Phenylthiohydantoin-Derivate der Aminosäuren erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie^[14,15] oder HPLC^[16,17].

Ergebnisse

Das Hämolyat des Eis- bzw. Kragenbärenbluts zeigte je eine Bande bei der Disk-Elektrophorese, nach Hämabspaltung ergaben sich jeweils zwei Banden bei der Triton-Elektrophorese (Abb. 1).

Bei der Chromatographie des Globins auf CM-Cellulose (8M Harnstoff, 0.05M Natriumacetat, 0.01% Dithioerythrit, pH 5.8; linearer NaCl-Gradient von 0.02M–0.1M NaCl) wurden daher

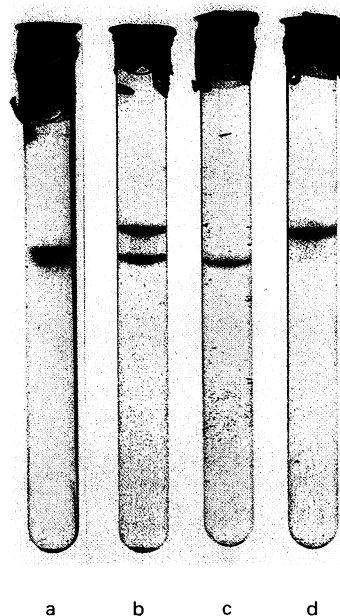


Abb. 1. Disk-Gelelektrophorese des Eisbärenhämoglobins (a) und Triton-Gelelektrophoresen des Gesamtglobins (b) sowie der α - und β -Ketten (c, d).

Das Globin des Kragenbären zeigte analoges Verhalten.

zwei Fraktionen erhalten. Die β -Ketten, die zwei Tryptophanreste enthalten zeigten die höhere Extinktion bei 280 nm (Abb. 2).

Nach Bestimmung der Bruttoformeln wurden 42 Reste der nativen α - und β -Ketten nach der automatischen Edman Methode sequenziert.

Die tryptischen Spaltungen und deren anschließende Fraktionierung über Sephadex-Gelchromatographie und RP-HPLC lieferten für die α -

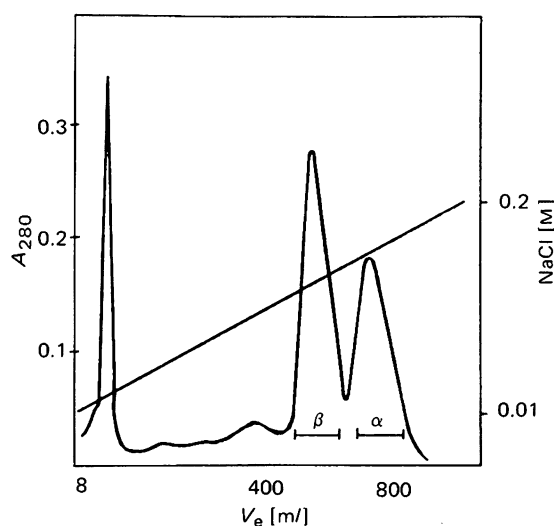


Abb. 2. Trennung der α - und β -Ketten des Eisbärenhämoglobins auf CM-Cellulose (pH = 5.8).

Die Trennung von Kragenbärglobin ist unter gleichen Bedingungen identisch.

Ketten 14, für die β -Ketten 16 Peptide. Diese wurden sowohl quantitativ charakterisiert (Tab. 2–5, Ergänzendes Material) als auch sequenziert.

Schließlich konnten die Primärstrukturen der beiden Bärenhämoglobine abgeleitet werden (Abb. 3).

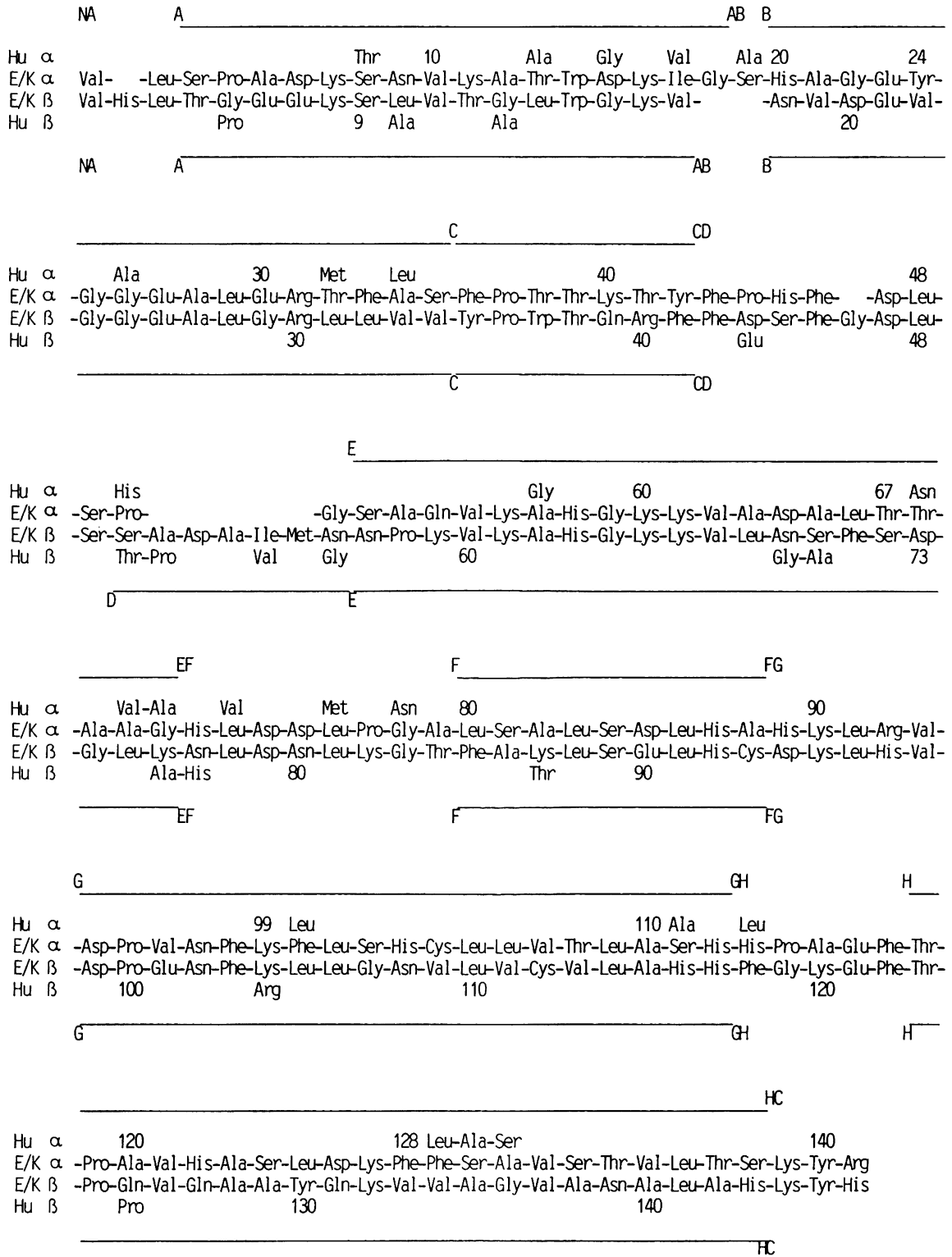


Abb. 3. Die Aminosäuresequenzen der α - und β -Ketten der Eis- und Kragenbärenhämoglobine (*Ursus maritimus* und *Ursus tibetanus*) im Vergleich zu denen des Humanhämoglobins (HbA).

Diskussion

Physiologie

Die Sequenz des Eis- bzw. Kragenbärenhäoglobins weist gegenüber Human-HbA 22 (α -Ketten) und 15 (β -Ketten) Unterschiede auf^[18], wovon nur zwei funktionell wichtige Bereiche des Moleküls betreffen [α 1/ β 2-Kontakt: β 43 (CD 2) Glu \rightarrow Asp; α 1/ β 1-Kontakt: α 34(B 15)Leu \rightarrow Ala; α 111(G 18)Ala \rightarrow Ser und β 125(H3)Pro \rightarrow Gln]^[19]. Da die Austauschungen zwischen Aminosäuren gleichen oder doch sehr ähnlichen Charakters erfolgten, sollten analoge physiologische Eigenschaften zu erwarten sein.

Erwähnenswert ist, daß beide Bärenhäoglobine zu der Gruppe von Säugerhäoglobinen gehören, die eine hohe intrinsische Sauerstoffaffinität aufweisen (Pos. β NA 2 ist His)^[20].

Evolution

Durch die vollständigen Sequenzen kann die Vermutung B. Brimhalls^[21] bestätigt werden, daß es drei, für die Sequenz von Carnivora-Häoglobinen charakteristische Reste gibt:

- 1) Rest Thr ^{α 32} im Gegensatz zu anderen Säugern, die hier Met haben
- 2) Rest Tyr ^{α 89} mit Ausnahme von Eis- und Kragenbär, die hier wie die anderen Säuger, ein His aufweisen.
- 3) Rest Pro ^{α 50}, wobei Katze und Löwe, wie die anderen Säuger, hier ein His haben.

Vergleicht man die Sequenzen des Waschbären^[22] mit denen von Eis- bzw. Kragenbär, ergeben sich bezüglich der α - und β -Ketten 9 bzw. 10 Austauschungen. Bei einer Evolutionsrate von 1.5×10^{-9} pro Aminosäure pro Jahr^[23,24] ergibt sich, daß sich Ursidae und Procyonidae von den Canoidae vor 22 Mio. Jahren getrennt haben müssen^[25], gut in Einklang mit der Paläontologie.

Ebenfalls weitgehende Übereinstimmung mit der Paläontologie ergibt sich beim Sequenzvergleich Eisbären-/Braunbärenhäoglobin; die beiden Untergattungen sollen sich vor 1.5 Mio. Jahren getrennt haben^[25]. Hier liegt bzgl. der ersten 42 Reste in den α -Ketten ein Austausch vor, die β -Ketten sind soweit identisch*.

Schwarz- und Braunbärenstamm sollen sich vor 5–10 Mio. Jahren getrennt haben und dementsprechend sollten sich ihre Häoglobinsequenzen in 3–5 Resten unterscheiden^[25,26]. Tatsächlich sind sie jedoch identisch. Als Analogon, sowohl auf phänotypischer, wie auch auf molekularer Ebene, erweist sich der Vergleich zwischen Hominiden (*Homo sapiens*) und Pongiden (*Pan paniscus*, *P. troglodytes*). Hier liegen bei gleicher

Tab. 1. Identische Häoglobine.

Species	Identische Ketten
<i>Homo sapiens</i> , <i>Pan paniscus</i> und <i>P. troglodytes</i>	α , β
<i>Homo sapiens</i> , und <i>P. troglodytes</i>	γ
<i>Camelus dromedarius</i> und <i>C. ferus bactrianus</i>	α , β
<i>Lama guanicoe</i> und <i>L. vicugna</i>	β
<i>Bos primigenius</i> und <i>B. grunniens</i>	γ
<i>Branta canadensis</i> und <i>Cygnus olor</i>	β
<i>Ursus maritimus</i> und <i>U. tibetanus</i>	α , β
<i>Chironomus thummi thummi</i>	I, Ia
<i>Ch. thummi thummi</i> und <i>Ch. thummi piger</i>	III

zeitlicher Distanz ebenfalls identische Häoglobinkomponenten vor^[27,28].

Die Antwort auf die Frage, warum keine Unterschiede zu verzeichnen sind, kann nur spekulativer Art sein. Deutlich wird auf jeden Fall die Unabhängigkeit der molekularen Evolution von der phänotypischen^[24,29,30].

Das Phänomen identischer Häoglobine zeigt sich außer im oben genannten Fall noch bei folgenden Species (Tab. 1):

Dromedar (*Camelus dromedarius*) und Trampeltier (*C. ferus bactrianus*)^[27]: allerdings handelt es sich beim Trampeltier um einen domestizierten Abkömmling des Wildkamels (*C. ferus ferus*).

Interessant ist der Zusammenhang zwischen *Lama guanicoe* und *L. vicugna* (die zweite noch wildlebende Lamagattung)^[25,26]; hier sind die β -Ketten identisch, während in den α -Ketten drei Austauschungen gefunden wurden^[27,**].

Als letztes Säugerbeispiel soll erwähnt werden, daß Yak (*Bos grunniens*) und Rind (*Bos primigenius*) identische γ -Ketten besitzen^[31,***].

Bei Vögeln haben Kanadagans (*Branta canadensis*) und Höckerschwan (*Cygnus olor*) identische β -Ketten^[32]. Bei Insekten sind ebenfalls identische Häoglobine bekannt. So sind die Komponenten der Larven von *Chironomus thummi thummi* CTT I und CTT Ia identisch^[33]. Desweiteren existieren für die Komponenten CTT III und CTP III (*Ch. thummi piger*) je 2 Gene, wobei je eines identisch ist**.

* Braunitzer, G., Stangl, A., Müller, E., unveröffentlichte Ergebnisse.

** Braunitzer, G. & Kleinschmidt, T., unveröffentlichte Ergebnisse.

*** Lalthantluanga, R. & Braunitzer, G., unveröffentlichte Ergebnisse.

Wie in der Einleitung erwähnt stehen diese Daten im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Hämoglobine des Kleinen und Großen Pandabären, deren Daten zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht werden.

Wir danken Frau B. Schrank, Fräulein R. Gautsch, Fräulein E. Müller, Frau B. Bless und Herrn C. Krombach für die Arbeiten an Sequenator und Analysator. Herzlichen Dank an Dr. R. Faust, Direktor des Zoologischen Gartens der Stadt Frankfurt, für die Bereitstellung des Krakenbärenblutes.

Literatur

- 1a Bauer, H., Braunitzer, G., Oberthür, W., Kösters, J. & Grimm, F. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**, 1141–1148.
- 1b Weber, R. F., Braunitzer, G. & Kleinschmidt, T. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 747–753.
- 2 Thenius, E. (1979) *Z. Säugetierkd.* **44**, 286–305.
- 3 Cannan, R. K. (1961) *Science* **127**, 1376–1378.
- 4 Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404–427.
- 5 Alter, B. P., Goff, S. C., Ettremov, G. D., Gravely, M. E. & Huisman, T. H. J. (1980) *Br. J. Haematol.* **44**, 527–534.
- 6 Rossi-Fanelli, A. & Antonini, E. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 608–615.
- 7 Clegg, G. B., Naughton, M. A. & Weatherall, D. J. (1966) *J. Mol. Biol.* **19**, 91–108.
- 8 Hirs, C. H. W., Stein, W. H. & Moore, S. (1956) *J. Biol. Chem.* **221**, 151–159.
- 9 Hirs, C. H. W. (1967) *Methods Enzymol.* **11**, 218.
- 10 Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) *Anal. Biochem.* **69**, 468–473.
- 11 Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.) 2nd edn. pp. 229–240, Springer-Verlag, Berlin.
- 12 Edman, P. & Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- 13 Thomsen, J., Bucher, D., Brunfeldt, K., Nexø, E. & Olesen, H. (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 87–91.
- 14 Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 137–146.
- 15 Pfletschinger, J. & Braunitzer, G. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 925–931.
- 16 Zimmermann, C. L. & Pisano, J. J. (1977) *Methods Enzymol.* **47**, 45–51.
- 17 Gates, F. T., Caligan, J. E. & Kindt, T. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 2267–2272.
- 18 Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B. (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **325**, 283–286.
- 19 Fermi, G. & Perutz, M. F. (1981) in *Atlas of Molecular Structures in Biology* (Phillips, D. C. & Richards, F. M., eds.) Clarendon Press, Oxford.
- 20 Perutz, M. F. & Imai, K. (1980) *J. Mol. Biol.* **136**, 183.
- 21 Brimhall, B., Stenzel, P., Dresler, L., Hermodson, M., Stangland, K., Joyce, J. & Jones, R. T. (1977) *J. Mol. Evol.* **9**, 237–260.
- 22 Brimhall, B., Stangland, K., Jones, R. T., Becker, R. R. & Bailey, T. J. (1978) *Hemoglobin* **2**, 351–370.
- 23 Goodman, M. (1981) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **38**, 105–164.
- 24 Kimura, M. (ed.) (1982) *Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory*, Japan Scientific Societies Press.
- 25 Thenius, E. (1969) *Phylogenie der Mammalia*, Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- 26 Grzimek, B. & Wendt, H. (eds.) (1972) *Grzimeks Tierleben, Ergänzungsband Entwicklungsgeschichte der Lebewesen*, Kindler-Verlag, Zürich.
- 27 Dayhoff, M. O. (ed.) (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Natl. Biomed. Research Foundation, Georgetown, Washington D.C.
- 28 Goodman, M., Braunitzer, G., Stangl, A. & Schrank, B. (1983) *Nature (London)* **303**, 546–548.
- 29 Dickerson, R. E. & Geis, I. (eds.) (1983) *Hemoglobin*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- 30 Grzimek, B. (ed.) (1972) *Grzimeks Tierleben, Säugetiere*, Kindler-Verlag, Zürich.
- 31 Babin, D. R., Schroeder, W. A., Shelton, J. R. & Robberson, B. (1966) *Biochemistry* **5**, 1297.
- 32 Oberthür, W., Godovac-Zimmermann, J. & Braunitzer, G. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 777–787.
- 33 Goodman, M., Braunitzer, G., Kleinschmidt, T. & Aschauer, H. (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 205–217.

Ottmar Hofmann, Thomas Schreitmüller und Prof. Dr. Gerhard Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, D-8033 Martinsried bei München.

Priv.-Doz. Dr. Henning Wiesner, Tierpark Hellabrunn, D-8000 München 90, Siebenbrunner Str. 6.

Ergänzendes Material

Tab. 2. Aminosäurezusammensetzung der α -Ketten und der tryptischen Peptide des Eisbärenhäoglobins.

In Klammern steht die aus der Sequenzbestimmung ermittelte Anzahl der Aminosäuren, sofern die Analysenwerte zu weit abweichen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	0.95	0.99	0.95	--	--	0.98	--	--
Thr	--	--	0.94	--	2.93	0.90	--	--
Ser	0.82	0.89	--	0.95	0.98	1.72	--	--
Glx	--	--	--	2.87	--	0.92	--	--
Pro	0.97	--	--	--	1.02	2.02	--	--
Gly	--	--	--	4.00	--	0.99	1.16	--
Ala	0.92	--	1.25	2.15	0.97	1.04	1.01	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.01	1.12	--	--	--	1.02	--	--
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	0.93	--	--	--	--
Leu	1.24	--	--	1.38(1)	--	1.24(1)	--	--
Tyr	--	--	--	0.93	--	0.88	--	--
Phe	--	--	--	--	2.07	2.03	--	--
His	--	--	--	0.96	--	1.14	0.78(1)	--
Trp	--	--	0.77(1)	--	--	--	--	--
Lys	0.99	0.87	0.96	--	1.05	1.01	1.04	1.00
Arg	--	--	--	0.83(1)	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.92	--	1.89	1.11	--	--	12.03(11)
Thr	1.84	--	--	1.81	1.86	--	10.86(11)
Ser	1.88	--	--	2.86	2.84	--	13.25(14)
Glx	--	--	--	0.77(1)	--	--	5.20(5)
Pro	0.95	--	1.18	2.40(2)	--	--	7.89(8)
Gly	1.94	--	--	--	--	--	8.55(8)
Ala	7.00	--	--	3.98	1.03	--	18.16(19)
Cys	--	--	--	1.02	--	--	1.03(1)
Val	0.94	--	1.97	1.93	2.05	--	10.30(10)
Met	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	0.97(1)
Leu	6.44(6)	1.04	--	5.46(5)	1.23(1)	--	16.31(16)
Tyr	--	--	--	--	--	0.97	2.60(3)
Phe	--	--	0.99	1.96	1.99	--	9.37(9)
His	2.92	--	--	3.76(4)	--	--	10.09(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	1.05(1)
Lys	1.12	--	0.99	1.04	1.01	--	10.98(11)
Arg	--	0.96	--	--	--	1.02	2.66(3)
Summe	29	2	7	28	12	2	141

Tab. 3. Aminosäurezusammensetzung der β -Ketten und der tryptischen Peptide des Eisbärenhäoglobins.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	2.06	--	5.05	--	--	--	1.76(2)
Thr	0.75(1)	0.79(1)	--	1.14	--	--	--	--	--
Ser	--	1.24(1)	--	--	2.51(3)	--	--	--	1.72(2)
Glx	1.88(2)	--	1.95	1.10	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.14	1.26(1)	--	--	--	--
Gly	1.23(1)	1.81	3.07	--	1.43(1)	--	1.05	--	1.34(1)
Ala	--	--	1.06	--	2.09	--	0.95	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.80(1)	0.92	3.03	1.67(2)	--	0.92	--	--	1.41(1)
Met	--	--	--	--	0.27(1)	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	0.96	--	--	--	--
Leu	1.07	1.69(2)	0.97	2.00	1.13	--	--	--	2.17
Tyr	--	--	--	1.06	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.71(3)	--	--	--	1.11
His	1.04	--	--	--	--	--	1.00	--	--
Trp	--	0.72(1)	--	0.88(1)	--	--	--	--	--
Lys	1.06	0.93	--	--	1.04	1.02	1.00	1.00	1.00
Arg	--	--	0.86(1)	1.00	--	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b11 88-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 144-146	Ketten- analyse
Asx	2.95	--	3.21	0.96	--	1.14	--	17.25(17)
Thr	--	0.98	--	--	0.95	--	--	5.03(5)
Ser	--	--	0.91	--	--	--	--	6.49(7)
Glx	--	--	2.13	--	4.28	--	--	10.51(11)
Pro	--	--	0.90	--	0.95	--	--	3.66(4)
Gly	--	1.03	--	2.01	--	1.21	--	12.83(13)
Ala	--	0.96(1)	--	0.95	2.02	3.92	--	12.74(12)
Cys	--	--	0.99	1.00	--	--	--	2.17(2)
Val	--	--	1.09	2.94	1.17	2.15(3)	--	16.89(17)
Met	--	--	--	--	--	--	--	0.85(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	1.19(1)
Leu	1.95	--	2.88	4.39(4)	--	1.18	--	19.35(19)
Tyr	--	--	--	--	0.65(1)	--	0.94	3.37(3)
Phe	--	0.99	0.94	0.94	0.94	--	--	8.10(8)
His	--	--	1.96	1.88	--	1.11	1.05	8.58(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	2.15(2)
Lys	1.00	1.04	2.00	0.94	1.01	1.15	--	13.56(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	2.21(2)
Summe	6	5	17	16	12	12	2	146

Tab. 4. Aminosäurezusammensetzung der α -Ketten, des Prolylpeptids und der tryptischen Peptide des Kragenbärenhämoglobins.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.14	0.99	0.99	--	--	0.97	--	--
Thr	--	--	1.06	--	2.88	1.05	--	--
Ser	1.06	0.87	--	0.92	1.02	2.18	--	--
Glx	--	--	--	3.08	--	1.08	--	--
Pro	0.91	--	--	--	1.11	1.54(2)	--	--
Gly	--	--	--	4.15	--	1.12	1.01	--
Ala	1.09	--	1.00	2.00	0.96	1.04	0.97	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.86	0.98	--	--	--	0.92	--	--
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	0.91	--	--	--	--
Leu	1.15	--	--	1.02	--	0.99	--	--
Tyr	--	--	--	0.93	--	0.93	--	--
Phe	--	--	--	--	2.05	2.19	--	--
His	--	--	--	1.01	--	1.11	0.97	--
Trp	--	--	0.76	--	--	--	--	--
Lys	1.20	1.15	1.18	--	0.98	0.90	1.06	1.00
Arg	--	--	--	0.97	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Tab. 5. Aminosäurezusammensetzung der β -Ketten und der tryptischen Peptide des Kragenbärenhämoglobins.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	1.81	--	5.21	--	--	--	2.07
Thr	1.31(1)	0.93	--	1.18	--	--	--	--	--
Ser	--	1.04	--	--	3.02	--	--	--	1.72
Glx	2.44(2)	--	2.13	1.12	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.19	1.07	--	--	--	--
Gly	1.27	2.06	3.15	--	1.04	--	0.99	--	1.03
Ala	--	--	1.19	--	2.14	--	0.95	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.86	1.10	2.77	1.34(2)	--	1.10	--	--	0.97
Met	--	--	--	--	0.71	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	0.74	--	--	--	--
Leu	1.20	2.24	1.02	2.22	1.24	--	--	--	2.16
Tyr	--	--	--	1.02	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	3.18	--	--	--	0.96
His	0.91	--	--	--	--	--	0.81	--	--
Trp	--	0.67	--	0.88	--	--	--	--	--
Lys	1.22	0.95	--	--	1.04	0.90	1.25	1.00	1.09
Arg	--	--	0.93	1.06	--	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse	Prolyl- Peptid
Asx	4.42(4)	--	1.67(2)	1.10	--	--	11.58(11)	2.47(2)
Thr	1.94	--	--	2.00	1.93	--	10.46(11)	3.84(4)
Ser	1.91	--	--	3.14	3.11	--	13.54(14)	5.72(6)
Glx	--	--	--	1.00	--	--	5.15(5)	1.44(1)
Pro	0.97	--	1.49(1)	1.90	--	--	7.62(8)	2.79(3)
Gly	1.95	--	--	--	--	--	8.46(8)	--
Ala	6.76(7)	--	--	4.02	1.06	--	18.97(19)	4.83(5)
Cys	--	--	--	0.98	--	--	0.99(1)	0.95(1)
Val	0.88	--	2.02	1.68(2)	1.92	--	9.75(10)	4.45(5)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	0.97(1)	--
Leu	6.24	0.86	--	5.36	1.14	--	16.45(16)	6.01(6)
Tyr	--	--	--	--	--	0.89	3.33(3)	1.19(1)
Phe	--	--	0.83	2.08	1.86	--	9.08(9)	4.49(5)
His	3.02	--	--	3.86	--	--	9.78(10)	3.73(4)
Trp	--	--	--	--	--	--	0.89(1)	--
Lys	1.03	--	0.91	0.96	0.98	--	10.96(11)	3.24(3)
Arg	--	1.14	--	--	--	1.11	2.92(3)	0.96(1)
Summe	29	2	7	28	12	2	141	47

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b 88-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	3.16	--	1.07	2.00	1.04	--	1.20	--	17.02(17)
Thr	--	1.05	--	--	--	0.99	--	--	5.35(5)
Ser	--	--	1.04	--	--	--	--	--	7.11(7)
Glx	--	--	0.98	0.98	--	3.95	--	--	10.72(11)
Pro	--	--	--	0.95	--	0.82	--	--	3.86(4)
Gly	--	0.99	--	--	2.00	--	1.31	--	12.99(13)
Ala	--	1.04	--	--	1.13	1.99	3.87	--	12.37(12)
Cys	--	--	0.89	--	0.98	--	--	--	1.94(2)
Val	--	--	--	1.02	2.87	1.13	2.01(3)	--	16.59(17)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	1.05(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	1.17(1)
Leu	1.83	--	1.92	1.23	4.05	--	1.37	--	18.84(19)
Tyr	--	--	--	--	--	0.99	--	1.04	3.07(3)
Phe	--	0.90	--	0.95	1.02	1.12	--	--	8.09(8)
His	--	--	1.00	0.89	1.94	--	0.99	0.96	8.09(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	1.59(2)
Lys	1.02	1.02	1.10	1.03	0.97	1.01	1.14	--	13.84(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	--	2.16(2)
Summe	6	5	8	9	16	12	12	2	146