

**Direkte allosterische Wechselwirkung von Sauerstoff und Bicarbonat: N-Acetyl-Ala-Ser-Phe, die N-terminale Sequenz der  $\beta$ -Ketten der Hämoglobine des Nilkrokodils (*Crocodylus niloticus*) und des Mississippi-krokodils (*Alligator mississippiensis*)**

Direct Allosteric Interaction of Oxygen and Bicarbonate: N-Acetyl-alanyl-seryl-phenylalanine, N-Terminal Sequence of the  $\beta$ -Chains of the Haemoglobins of Nil Crocodile (*Crocodylus niloticus*) and Mississippi Crocodile (*Alligator mississippiensis*)

W. Schäfer, G. Braunitzer und A. Stangl

Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried bei München

Z. Naturforsch. 36 c, 902–903 (1981); eingegangen am 15. Mai 1981

Haemoglobin, Reptilia, Allosteric Interaction, Oxygen, Bicarbonate

To elucidate the molecular mechanism of the direct allosteric exchange of oxygen and hydrogen carbonate in the hemoglobins of crocodiles, the N-terminal sequence of the  $\beta$ -chains of the crocodiles of the Nile (*Crocodylus niloticus*) and of the Mississippi (*Alligator mississippiensis*) was studied. The N-terminal end of the peptide is blocked. By mass spectrometry the N-terminal sequences of both species were found to be N-acetyl-alanyl-seryl-phenylalanine. These data explain the absence of hemoglobin-phosphate interaction, the data are in good agreement with the stereochemistry postulated for allosteric exchange of oxygen and hydrogen carbonate in crocodilian hemoglobins.

**Material und Methoden**

Die Gewinnung der Hämoglobine und die Trennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten erfolgte nach Standardmethoden. Die  $\beta$ -Ketten wurden mit Trypsin gespalten und das Hydrolysat über Sephadex G-25 in 0,1 M Essigsäure getrennt. Das N-terminale tryptische Peptid mit blockierter Endgruppe wurde mit Pepsin nachgespalten und das Peptidgemisch über Dowex 50X4 H<sup>+</sup> Form getrennt. Das mit der Front wandernde Spaltprodukt hatte eine blockierte Endgruppe und die Bruttoformel Ser<sub>1</sub>, Ala<sub>1</sub>, Phe<sub>1</sub>.

Dieses Tripeptid (200 nm) wurde in Methanol gelöst, 2 min mit Diazomethan in Äther umgesetzt, dann zur Trockene gebracht und er Rückstand aus

Sonderdruckanforderung an Dr. W. Schäfer.

0341-0382/81/0900-0902 \$ 01.00/0

Essigesterlösung zur MS-Analyse vorbereitet. Die MS-Untersuchungen wurden durchgeführt mit dem Massenspektrometer-Datensystem Varian MAT 312/SS 188.

**Ergebnisse und Diskussion**

Aus dem Massenspektrum (Abb. 1) ergibt sich die Struktur als N-Acetyl-Ala-Ser-Phe-OCH<sub>3</sub>. Das Molekülion bei *m/e* 379 verliert Wasser ( $\rightarrow$  *m/e* 361) und spaltet anschließend OCH<sub>3</sub> ( $\rightarrow$  *m/e* 330) und CO ( $\rightarrow$  *m/e* 302) ab. Die Eliminierung von Formaldehyd aus dem Molekülion ( $\rightarrow$  *m/e* 349) weist auf die Anwesenheit von Serin im Peptid.

Die in der Abbildung gekennzeichneten Sequenzionen bei *m/e* 43, 86, 114, 173, 201 und 320 beweisen die Sequenz der Aminosäuren [1]. Mit Ausnahme von *m/e* 320 wurden von diesen Ionen ausgehend die Acetylgruppe charakterisierende Ketenabspaltungen zu den Ionen bei *m/e* 44, 72, 120 und 159 beobachtet. Zusätzlich ist das Ion bei *m/e* 162 beweisend für Phe-methylester am Carboxylenende des Peptides. Die Ionen bei *m/e* 266 und 248 (266-H<sub>2</sub>O) könnten als Ser-Phe-OCH<sub>3</sub> aus dem Peptid durch Abspaltung des aminoendständigen Restes als  $\beta$ -Acetylaminomethyl-keten entstanden sein.

Die Peptide der beiden Crocodilia ergaben, was die Sequenzinformation angeht, identische Spektren; Unterschiede im Massenbereich unter *m/e* 100 werden durch unterschiedliche Verunreinigungen verursacht.

Die Affinität des Hämoglobins ist meist höher als die der Erythrozyten. Wir kennen mehrere Cofaktoren, die die Affinität des „stripped“ Hämoglobins kontrollieren; Polyphosphate [2] (2,3-Diphosphoglycerat bei Säugern, bei Vögeln Inositolpentaphosphat und bei Fischen Adenosintriphosphat), weiterhin H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und CO<sub>2</sub> (Carbamat) [3].

In jüngster Zeit wurde eine Ausnahme gefunden: Die Hämoglobine der Crocodilia deren Sauerstoffaffinität durch diese Cofaktoren nicht oder nur unwesentlich beeinflußt werden. Durch Studium der direkten Oxygenierung des Hämoglobins wurde gezeigt, daß Kohlendioxid allein die Sauerstoffaffinität dieser Hämoglobine kontrolliert und um den Faktor 13 erniedrigt [4]. Durch kinetische Messungen der Deoxygenation konnten diese Daten weiterhin bestätigt werden. Spätere Versuche haben gezeigt, daß das Bicarbonation direkt die Kontrolle der Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff als hete-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

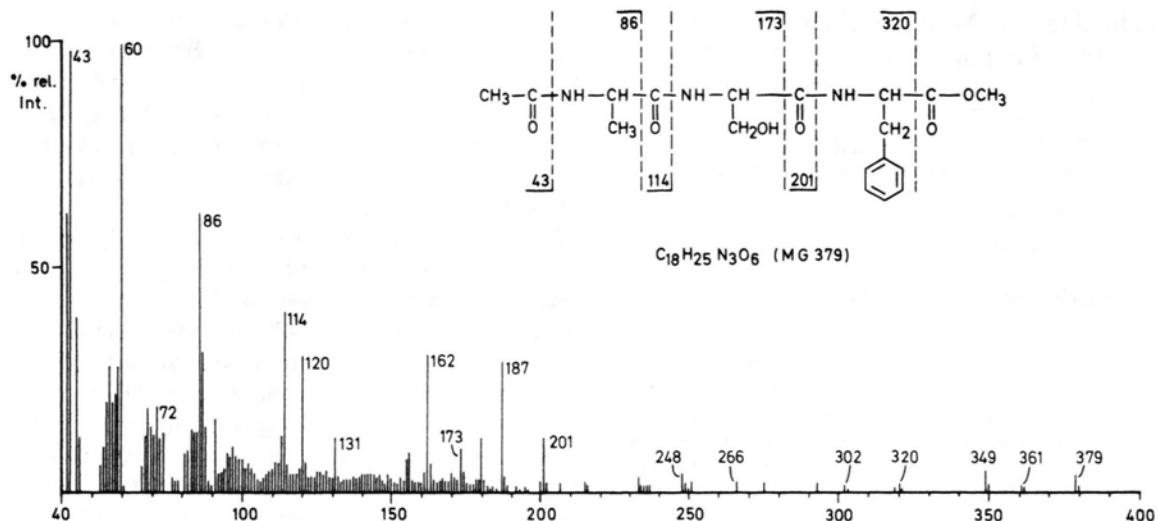


Abb. 1. Massenspektrum (70 eV) von N-Acetyl-Leu-Ser-Phe-methylester,  $m/e$  40–200 alle Signale rel. Int. > 5%,  $m/e$  200–400 alle Signale rel. Int. > 1%.

rotroper, allosterischer Effektor übernimmt: Pro Molekül (Tetramer) werden 2 mol Bicarbonat und die Desoxyform gebunden [5].

Zur Frage des molekularen Mechanismus wurde die Sequenz der Hämoglobine von drei Krokodilia, dem Kaiman (*Caiman crocodylus*), dem Nilkrokodil und dem Mississippikrokodil erarbeitet [6], um am Modell der Sägerhämoglobine [7] die Stereochemie der Sauerstoff-Bicarbonat-Wechselwirkung zu studieren.

Wir fanden beim Kaiman freie Endgruppen der Ketten, beim Nilkrokodil und dem Mississippikrokodil sind jedoch die  $\beta$ -Ketten blockiert. In dieser Arbeit beschreiben wir die N-terminale Sequenz dieser beiden Hämoglobine, weiterhin weisen wir nach, daß die N-Termini durch eine Acetylgruppe blockiert sind. Die hier angegebene Sequenz Ac-

Ala-Ser-Phe klärt eindeutig die Abwesenheit einer Wechselwirkung von niedermolekularen Phosphaten, da sowohl die Reste  $\beta 1$  und  $\beta 2$  blockiert bzw. durch eine neutrale Aminosäure ersetzt sind und so keine Bindungsstellen sowohl zum 2,3-diphosphoglycerat [8] wie auch zum Inositolpentaphosphat möglich sind. Diese Daten stehen weiterhin in sehr guter Übereinstimmung mit der Stereochemie der Bindung des Bicarbonats, die über die Reste  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 144$  erfolgt [9].

#### Dank

Fräulein I. Buhrow danken wir für wertvolle Hilfe bei den spektroskopischen Untersuchungen. Wir danken Frau C. Felsmann, Fräulein B. Schrank und Fräulein H. Mairhofer für wertvolle Mitarbeit.

- [1] K. Biemann, in: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry* (First Suppl. Vol.), G. R. Waller und O. C. Dermer, Herausg., J. Wiley & Sons, New York 1980.
- [2] J. V. Kilmartin, *Brit. med. Bull.* **32**, 209–212 (1976).
- [3] S. Rapoport u. G. M. Guest, *J. Biol. Chem.* **138**, 269–282 (1941).
- [4] C. Bauer u. W. Jelkmann, *Nature* **209**, 825–827 (1977).
- [5] C. Bauer, G. Gross, A. Mons, H. Perella, H. Rollema u. D. Vogel, *J. Biol. Chem.*, im Druck (1981).
- [6] G. Schnek, F. Leclercq, G. Braunitzer, A. Stangl u. B. Schrank, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 1151–1158 (1981).
- [7] M. F. Perutz, *Brit. Med. Bull.* **32**, 195–208 (1976).
- [8] A. Arnone u. M. F. Perutz, *Nature* **249**, 34–36 (1974).
- [9] M. F. Perutz, C. Bauer, G. Gross, F. Leclercq, C. Vancleccasserie, A. G. Schnek, G. Braunitzer, A. E. Friday, and K. A. Joysey, *Nature* **291**, 682–684 (1981).