

Die Sequenz eines dimeren Hämoglobins (Erythrocrutorin), Komponente CTT-IX von *Chironomus thummi thummi* (Insecta Diptera)*

The Sequence of a Dimeric Hemoglobin (Erythrocrutorin), Component IX, from *Chironomus thummi thummi* (Insecta Diptera)

Wolfgang Steer und Gerhard Braunitzer

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

Z. Naturforsch. **34 c**, 882 – 884 (1979);
eingegangen am 16. Mai 1979

Dimeric Hemoglobin, Primary Structure, Insects

The primary structure of the dimeric hemoglobin (erythrocrutorin) CTT-IX from the insect larva *Chironomus thummi thummi* (Insecta Diptera) is given. The sequence was determined automatically. The primary structure is compared with human α -chains.

Die Larven verschiedener Chironomiden (Diptera) zeigen einen ausgeprägten Polymorphismus und enthalten bis zu zwölf elektrophoretisch unterscheidbare Hämoglobine [1, 2]. Bei physiologischem pH liegen diese teils als Monomere (mindestens 4), teils als Dimere [3] vor. Der hohe Grad an Polymorphismus ist sowohl in struktureller, funktioneller genetischer und evolutionärer Hinsicht von Interesse. Die Primärstrukturen zweier monomerer und dreier dimerer Hämoglobine von *Chironomus thummi thummi* wurden bereits vorgelegt [4–8]. Näher untersucht wurde bisher das monomere Hämoglobin CTT-III [4], dessen Röntgenstruktur (1,4 Å) vorliegt [9] und dessen Affinität zu verschiedenen Liganden gut charakterisiert ist [10a–10e]. In dieser Mitteilung berichten wir über die Primärstruktur der dimeren Komponente, CTT-IX, die – im Gegensatz zu anderen bisher beschriebenen Komponenten – keine Heterogenität aufweist.

Material und Methoden

Chironomus thummi thummi Larven wurden von zoologischen Händlern in München bezogen. Die einheitliche Artzugehörigkeit des Materials wurde durch Elektrophorese überprüft.

* Auszug Dissertation Dipl.-Chem. W. Steer, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Ludwigs-Maximilians-Universität, München 1979.

Abkürzungen: CTT, *Chironomus thummi thummi*; CTT-IX, Hämoglobin von *Chironomus th. th.*, Komponente IX.

Sonderdruckanforderungen an Dr. G. Braunitzer
0341-0382/79/0900-0882 \$ 01.00/0

Isolierung

Das Rohhämoglobin wurde aus den Larven nach beschriebenen Methoden [1] isoliert. Zur Isolierung der Komponente CTT-IX mußten folgende Schritte ausgeführt werden: Trennung des Rohhämoglobins in eine monomere und eine dimere Fraktion und anschließende Chromatographie des dimeren Gemisches über Sephadex A₅₀. Die ausführliche Beschreibung der Isolierung erfolgt später. Die Homogenität der Komponente CTT-IX wurde durch Gelelektrophorese und N-terminalen Abbau im Sequenator überprüft. Das Globin wurde nach der Äthylmethylketon-Methode [11] erhalten.

Spaltungen, Isolierung der Peptide

An chemischen Methoden wurde die Spaltung mit Bromcyan [12] und die selektive Spaltung der Peptidbindungen C-terminal von Tryptophan mit BNPS-Skatol [14] angewandt. Zusätzlich wurde das an den ϵ -Aminogruppen mit Maleinsäureanhydrid [13] blockierte Globin mit Trypsin gespalten.

Die Vortrennung der Spaltgemische erfolgte an Sephadex G 50 in 8 M Harnstoff/10% Essigsäure bzw. in 6 M Guanidinhydrochlorid/0.1 M Tris HCl. Die einzelnen, mehrere Peptide enthaltenden Gipfel wurden an DEAE-Cellulose (-Sephacel) oder an CM-Cellulose (-Sephadex) in 8 M Harnstoff rechromatographiert.

Aminosäureanalysen, automatische Sequenzanalyse

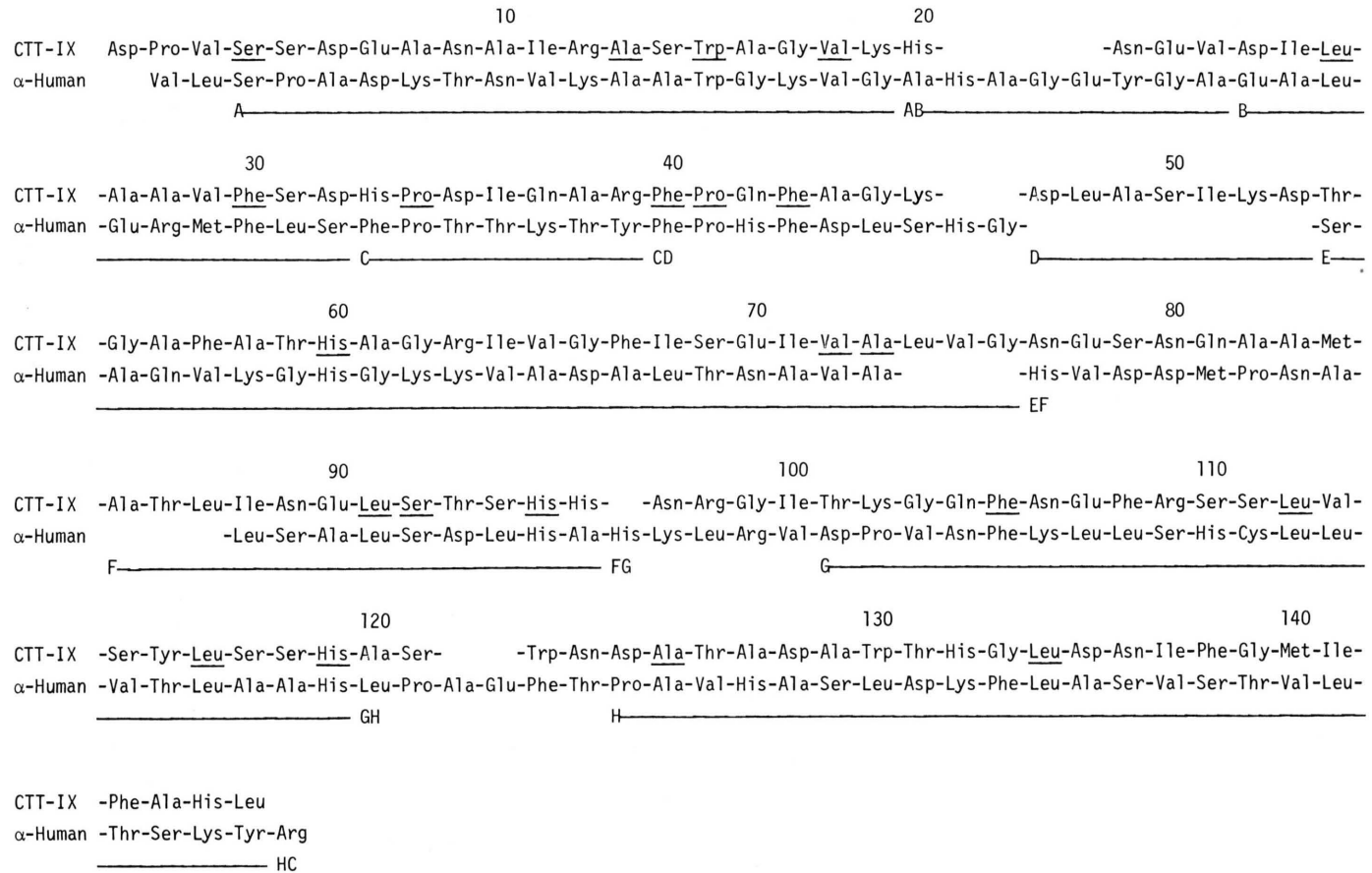
Die Proben wurden in konstant siedender 5,7 N HCl 20 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Analysen wurden mit einem Beckman-Aminosäureanalysator, Model 121 C, durchgeführt.

Die Sequenzanalyse wurde im Sequenator [15], im Sequencer der Firma Beckman, Modell 890 B bzw. 890 C, durchgeführt. Zwei Programme kamen zur Anwendung: a) Quadrolprogramm [15] mit verlängerter Lösungsphase im Quadrolpuffer [16] für intaktes Protein und lange Peptide (> 50 AS), b) N,N-Dimethylaminopropin-Programm [17] für kurze Peptide (< 50 AS). Die Phenylthiohydantoinderivate der Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Resultate und Diskussion

Bei der Aufklärung der Primärstruktur von CTT-IX wurde den Anforderungen einer modernen Se-





Homologe Zuordnung von CTT-IX zu α-Human

Abb. 1. Die Konstitution des Hämoglobins (Erythrocrurin) CTT-IX, von *Chironomus thummi thummi* (Insecta Diptera) der Sequenz der menschlichen α-Ketten homolog²³ gegenübergestellt. A, B, . . . , AB . . . helicale Bereiche, BC usw. interhelicale Bereiche.

quenzierung Rechnung getragen: Es wurde auf kleine Peptide verzichtet. Die Primärstruktur konnte unabhängig und ohne Zuhilfenahme der Homologie durch überlappende Peptide vollständig belegt werden. Das methodische Problem dieser Arbeit war die Isolierung stark aggregierender Peptide: Die Reindarstellung derselben konnte nur in stark denaturierenden Puffern erreicht werden.

Die vollständige Sequenz ist in der Abb. 1 wiedergegeben und in homologer Weise [18] den α -Ketten des Menschen gegenübergestellt. Das Globin ist aus 145 Aminosäuren aufgebaut und enthält unter anderem 8 Histidine, 2 Methionine und 3 Tryptophane. Wie in allen bisher untersuchten CTT-Hämoglobinen ist auch in CTT-IX kein Cystein zu finden. Beim Vergleich mit den α -Ketten zeigt sich, daß nur 22 Aminosäuren invariant sind. Trotz der geringen Anzahl identischer Positionen kann ein hoher Grad an isopolaren Austausch festgestellt werden. Auf einige Punkte der Sequenz sei besonders hingewiesen. Das NA-Segment ist in CTT-IX um eine Aminosäure verlängert. Das Tryptophan in Position 15 ist invariant. Die B-Helix ist um 4 Aminosäuren verkürzt (N-terminal). Der CD-Abschnitt ist C-terminal um 2 Aminosäuren kürzer, die D-Helix hingegen ist vollständig (wie β -Human) vorhanden. Die E-Helix kann C-terminal um eine Helixwindung (3 Reste) verlängert angenommen werden. Ebenso sollte die

F-Helix N-terminal um eine Windung länger sein. Diese Interpretation genügt auch den Kriterien nach Chou und Fasman [19]. Im GH-Bereich fehlen gegenüber α -Human zwei Aminosäuren. Die H-Helix wird durch Leucin beendet und zeigt sich um eine Aminosäure verkürzt (α -Human: HC Arg).

Aus der Tatsache, daß in E 7 His, in E 11 Ile und in F 8 His gefunden wird, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob der Hämkomplex normal (wie im Vertebratenhämoglobin [20, 21]) oder wie bei CTT-III vorliegt, wo His-E 7 nach außen, d. h. an die Oberfläche des Proteins weist und dabei eine Wasserstoffbrücke zu einem Propionsäurerest des Häms ausbildet, während andererseits dem Ligenbindungsstelle Ile E 11 am nächsten liegt [9, 22]: Dimere Hämoglobine besitzen allgemeineres Interesse, da diese eine Zwischenstufe zu den tetrameren Hämoglobinen darstellen könnten. Welche Kontakte bewirken eine Dimerisierung dieser CTT-Hämoglobine, welcher Umstand verhindert eine Tetramerisierung? Was ist deren physiologische Bedeutung? Ansätze zur Lösung dieser Frage sind in Arbeit. Eine eingehende Diskussion der Befunde erfolgt später.

Acknowledgements

Wir danken Herrn Anton Stangl und Fräulein Barbara Schrank für ausgezeichnete Arbeit am Analysator bzw. Sequenator.

- [1] G. Braunitzer u. V. Braun, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **346**, 303 – 305 (1966).
- [2] H. Tichy, Chromosoma (Berlin) **29**, 131 (1970).
- [3] V. Braun, R. R. Crichton u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 197 – 210 (1968).
- [4] G. Buse, G. J. Steffens, G. Braunitzer u. W. Steer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 89 – 97 (1979).
- [5] T. Kleinschmidt, H. v. d. Mark-Neuwirth u. G. Braunitzer, Heterocycles **10**, 251 – 256 (1978).
- [6] T. Kleinschmidt u. G. Braunitzer, Liebigs Ann. Chem. **1978**, 1060 – 1075.
- [7] D. Sladic-Simic, T. Kleinschmidt u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 591 – 594 (1977).
- [8] R. Lalthantluanga u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 99 – 101 (1979).
- [9] W. Steigemann u. E. Weber, J. Mol. Biol. **127**, 309 – 338 (1979).
- [10a] K. Gersonde, H. Sick, A. Wollmer u. G. Buse, Eur. J. Biochem. **25**, 181 – 189 (1972).
- [10b] K. Gersonde, H. Sick u. A. Wollmer, Eur. J. Biochem. **15**, 237 – 244 (1970).
- [10c] K. Gersonde u. A. Wollmer, Eur. J. Biochem. **15**, 226 – 236 (1970).
- [10d] H. Sick, K. Gersonde, J. C. Thompson, W. Maurer, W. Haar u. H. Rüterjans, Eur. J. Biochem. **29**, 217 – 223 (1972).
- [10e] K. Gersonde, L. Noll, H. T. Gaud u. S. J. Gill, Eur. J. Biochem. **62**, 577 – 582 (1976).
- [11] F. W. J. Teale, Biochim. Biophys. Acta **35**, 543 (1959).
- [12] E. Gross u. B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc. **83**, 1510 – 1511 (1961).
- [13] P. J. G. Butler, J. I. Harris, B. S. Hartley u. R. Leberman, Biochem. J. **103**, 78 – 79 (1967).
- [14] G. S. Omenn, A. Fontana u. Ch. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. **245**, 1895 – 1902 (1970).
- [15] P. Edman u. G. Begg, Eur. J. Biochem. **1**, 80 – 91 (1967).
- [16] J. Thomsen, T. Bucher, K. Brunfeldt, E. Nexö u. H. Olesen, Eur. J. Biochem. **69**, 87 – 96 (1976).
- [17] G. Braunitzer u. B. Schrank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 417 (1970).
- [18] G. Braunitzer, R. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff u. B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **325**, 283 – 286 (1961).
- [19] P. Y. Chou u. G. D. Fasman, Biochemistry **13**, 222 (1974).
- [20] M. F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Cox u. L. C. G. Goman, Nature **219**, 131 – 139 (1968).
- [21] J. C. Kendrew, H. C. Watson, B. E. Strandberg, R. E. Dickerson, D. C. Phillips u. V. C. Shore, Nature **190**, 666 – 670 (1961).
- [22] G. Braunitzer, H. Neuwirth u. F. Reinhard, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 757 – 758 (1971).