

ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DES CYTOCHROMES *c* DES STEPPENZEBRAS (*EQUUS QUAGGA BOEHMI*)

L. GÜRTLER und H.J. HORSTMANN

Institut für Physiologische Chemie, Wasserturmstr. 5, 852 Erlangen, Germany

Received 9 August 1971

Cytochrome *c* of the zebra (*Equus quagga Boehmi*) differs from horse cytochrome *c* in having in its polypeptide chain one serine residue instead of none and 9 threonine residues instead of 10. This replacement has been localised at position 47 of the sequence.

1. Einleitung

Innerhalb der Familie der Pferde ist die Aminosäure-Sequenz des Cytochroms *c* von Pferd [1] und Esel [2] bekannt. Die beiden Cytochrom unterscheiden sich in der Position 47 der Polypeptidkette; beim Pferd steht hier ein Threoninrest, beim Esel ein Serinrest. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir das Cytochrom *c* des Böhm-Steppenzebras und stellten fest, dass die Polypeptidkette in der Position 47 einen Serinrest trägt.

2. Material und Methoden

Das Cytochrom *c* (18,3 mg) wurde nach dem Verfahren von Flatmark [3] aus dem Herz eines Steppenzebras isoliert. Quantitative Aminosäure-Analysen wurden mit einem automatischen Aminosäure-Analysator (Biocal BC 200) durchgeführt. Zur Bestimmung des Tryptophans wurde das Protein mit 6 N HCl, 2% Thioglycolsäure [4] in 24 Std. bei 105° hydrolysiert; das Hydrolysat wurde mit 0,7 M Na-Citrat-Puffer, pH 5.15, aus der 60 X 0,9 cm – Säule des Analysators eluiert.

Die enzymatische Spaltung des Cytochroms mit Trypsin und Chymotrypsin und die Auftrennung der Peptide nach der Finger-print-Methode wurden wie früher beschrieben [5] durchgeführt. Die auf Dünnenschichtplatten (Polygram Sil G, Macherey und Nagel) mit Ninhydrin georteten Peptide wurden herausge-

kratzt und in einer Säule (1 X 0,5 cm) mit dem Gemisch Ameisensäure-Essigsäure-Wasser (2:15:85, v/v; Flusstrate 0,5 ml/Std.) aus dem Trägermaterial eluiert, wobei gleichzeitig eine Spannung von 100 V/Säule angelegt wurde. Nach 4 Std. wurde der Inhalt des Kathodengefäßes, welches die Peptide enthielt, gefriergetrocknet.

Die Aminosäure-Sequenz wurde mit der Dansyl-Edman-Methode [6] bestimmt. Die dansylierten Aminosäuren wurden chromatographisch auf Polyamidfolien [5, 7] getrennt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Absorptionsspektrum des Zebra-Cytochroms zeigte einen für Cytochrom *c* charakteristischen Kurvenverlauf [8]. Der Extinktionsquotient E_{550} (reduzierte Form)/ E_{280} (oxydierte Form) [3] betrug 1,26.

In der Tabelle 1 ist die Aminosäure-Zusammensetzung des Zebra-Cytochroms *c* wiedergegeben. Abweichend vom Pferd [1, 9], aber in Übereinstimmung mit dem Esel [2], enthält das Zebra im Cytochrom *c* einen Serinrest, aber nur 9 Threoninreste. Dieser Befund legte den Schluss nahe, dass beim Zebra ein Threoninrest gegen ein Serinrest ausgetauscht worden ist. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz der *c*-Cytochrom der bisher untersuchten Säugetiere liess vermuten, dass dieser Austausch die Position 47 der Polypeptidkette betraf.

Zur Prüfung dieser Annahme wurde das Zebra-

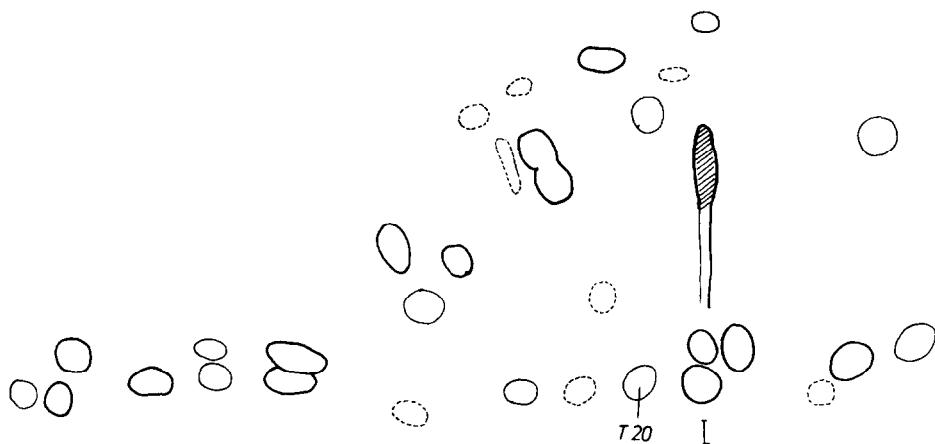


Abb. 1. Fingerprint-Muster der tryptischen Peptide aus dem Cytochrom *c* des Zebras. Dünnschichtplatte (Polygram Sil G, 40 × 20 cm). (1) Dimension (horizontal): Elektrophorese (Pyridin-Eisessig-Wasser, pH 5,8), Anode rechts. (2). Dimension (vertikal): Chromatographie (Laufmittel: n-Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 68:40:14:25, v/v), dreimal aufsteigend. Der Start lag bei I. Färbung mit Ninhydrin.

Tabelle 1
Aminosäure-Zusammensetzung des Zebra-Cytochroms *c*.

Aminosäure	Zebra		Pferd [9]	Esel [2]
	a	b		
Aminosäurereste pro Molekül				
Asparaginsäure	8,29	8	8	8
Threonin	8,30	9 ^c	10	9
Serin	1,30 ^c	1	—	1
Glutaminsäure	12,43	12	12	12
Prolin	3,96	4	4	4
Glycin	11,60	12	12	12
Alanin	5,86	6	6	6
Cystein	1,33	2	2	2
Valin	2,99	3	3	3
Methionin	1,72	2	2	2
Isoleucin	5,80	6	6	6
Leucin	6,12	6	6	6
Tyrosin	3,60	4	4	4
Phenylalanin	3,92	4	4	4
Histidin	2,96	3	3	3
Lysin	18,93	19	19	19
Arginin	2,13	2	2	2
Tryptophan ^d	1,24	1	1	1
Gesamt	104	104	104	104

^a Mittelwert aus je 2 20 Std. und 70 Std. Hydrolysaten.

^b Angenommenes ganzzahliges Verhältnis.

^c Extrapoliert auf die Hydrolysezeit 0 Std.

^d Nach HCl/Thioglycolsäure-Hydrolyse [4] bestimmt.

Tabelle 2
Aminosäure-Zusammensetzung des tryptischen Peptids T20 aus dem Zebra-Cytochrome *c*.

Aminosäure	T20 (Zebra)		T17 (Pferd [10])
	a	b	
Asparaginsäure	2,13	2	2
Threonin	1,63	2	3
Serin	1,28	1	—
Glutaminsäure	1,43	1	1
Prolin	0,86	1	1
Glycin	2,20	2	2
Alanin	1,94	2	2
Tyrosin	0,99	1	1
Phenylalanin	1,00	1	1
Lysin	1,40	1	1
Gesamt	14	14	14

^a Im 20 Std. Hydrolysat gefundenes Mol-Verhältnis.

^b Angenommenes ganzzahliges Verhältnis.

Cytochrom *c* mit Trypsin gespalten und das Hydrolysat der Peptid-Analyse unterworfen. Die Abb. 1 zeigt das Fingerprint-Muster der tryptischen Peptide. Ein tryptisches Hydrolysat des Pferde-Cytochroms *c* (Boehringer, Mannheim) lieferte unter den gleichen Bedingungen ein identitisches Fingerprint-Muster.

Aus unseren Untersuchungen über das Cytochrom *c* des Karpfens [5] war bekannt, an welcher Stelle des

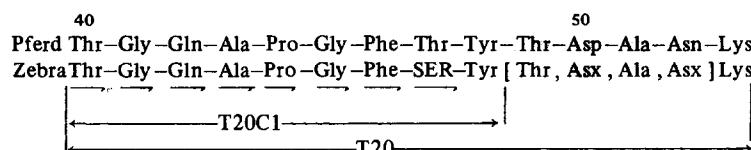


Abb. 2. Vergleich der Aminosäure-Sequenz in den Positionen 40 bis 53 der Polypeptidkette des Cytochroms *c* vom Pferd [10] und Steppenzebra. → bezeichnet einen Aminosäurerest, der durch Dansyl-Edman-Abbau bestimmt wurde.

Fingerprint-Musters das tryptische Peptid, welches die in Position 47 stehende Aminosäure enthält, abgelagert wird. Wir isolierten daher dieses Peptid (T20) und bestimmten seine Aminosäure-Zusammensetzung. Wie die Tabelle 2 zeigte, enthielt das Peptid T20 einen Threoninrest weniger und einen Serinrest mehr als das gleichartige Peptid (T17, [10]) aus dem Pferde-Cytochrom *c*.

Zur Lokalisation des Austausches wurde das Peptid T20 mit Chymotrypsin gespalten. Aus dem Hydrolysat wurde durch Elektrophorese auf Dünnschichtplatten ein Peptid T20C1 isoliert, das folgende Aminosäure-Zusammensetzung hatte: $\text{Thr}_1, \text{Ser}_1, \text{Glu}_1, \text{Pro}_1, \text{Gly}_2, \text{Ala}_1, \text{Tyr}_1, \text{Phe}_1$. Da das Peptid bei pH 5,8 keine negative Überschussladung besass, muss die Seitenkette der Glutaminsäure im Peptidverband amidiert gewesen sein. Mittels Dansyl-Edman-Abbau konnte die Sequenz des Peptides T20 bis zur Position 8 aufgeklärt werden. In der Abb. 2 werden die Ergebnisse der Untersuchung zusammengefasst.

Die *c*-Cytochrom von Pferd und Steppenzebra unterscheiden sich in der Position 47 der Polypeptidkette. Das Zebra-Cytochrom *c* trägt in dieser Position einen Serinrest und stimmt hierin mit dem Cytochrom *c* des Esels [2] überein.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch Sachbeihilfen von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Für das Zebrafherz danken wir Herrn Dr. M. Kraus vom Tiergarten Nürnberg.

Literatur

- [1] E. Margoliash, E.L. Smith, G. Kreil und H. Tuppy, Nature 192 (1961) 1125.
- [2] O.F. Walasek und E. Margoliash, in: Handbook of Biochemistry, ed. H.A. Sober (The Chemical Rubber Co., Cleveland, 1968) p. C156.
- [3] T. Flatmark, Acta Chem. Scand. 18 (1964) 1517.
- [4] H. Matsubara und R.H. Sasaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969) 175.
- [5] L. Gürtler und H.J. Horstmann, European J. Biochem. 12 (1970) 48.
- [6] W.R. Gray und B.S. Hartley, Biochem. J. 89 (1963) 59P.
- [7] V. Neuhoff, F. von der Haar, E. Schlimme und M. Weise, Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 121.
- [8] E. Margoliash und N. Frohwirt, Biochem. J. 71 (1959) 570.
- [9] E. Margoliash, J.R. Kimmel, R.L. Hill und W.R. Schmidt, J. Biol. Chem. 237 (1962) 2148.
- [10] H. Tuppy und G. Kreil, Monatsh. Chem. 93 (1962) 780.