

# Embryonale Hämoglobine der Säuger: Die Sequenzen der $\zeta$ -, $\epsilon$ - und $\vartheta$ -Ketten vom Hausschwein (*Sus scrofa domestica*)

Embryonic Hemoglobins in Mammals: The Primary Structures of  $\zeta$ -,  $\epsilon$ - and  $\vartheta$ -Chains of the Pig (*Sus scrofa domestica*)

F. A. Bieber, H. Aschauer, S. M. Bektas und G. Braunitzer

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

Z. Naturforsch. **38c**, 613–616 (1983); eingegangen am 24. Februar 1983

Hemoglobin, Pig Embryo, Sequences of  $\zeta$ -,  $\epsilon$ - and  $\vartheta$ -Chains

The amino-acid sequences of all expressed hemoglobins of the pig embryo are given: Hemoglobin Gower I ( $\zeta_2/\epsilon_2$ ), Hemoglobin Gower II ( $\alpha_2/\epsilon_2$ ), Hemoglobin Heide I ( $\zeta_2/\vartheta_2$ ) and Hemoglobin Heide II ( $\alpha_2/\vartheta_2$ ). The  $\zeta$ -,  $\epsilon$ - and  $\vartheta$ -chains were obtained with chromatography on CM-cellulose from isolated hemoglobin components. The primary structure was established by sequencing the tryptic peptides in the sequenator: they were isolated using HPLC. The  $\zeta$ -chains from pig and human differ in 23, the  $\epsilon$ -chains in 20 positions. The embryonic globin-gene which express the  $\vartheta$ -chains, is a new one in mammals, of  $\epsilon$ -type and up to now it could only be found in pigs: the amino-acid sequence differ in only 4 positions from the  $\epsilon$ -chains. Because no  $\gamma$ -chains (fetal Hb) are expressed the sequences of all hemoglobins (5 hemoglobin chains forming 5 different hemoglobins) of ontogeny in pig are now described.

In dieser Kurzzusammenfassung berichten wir über die Sequenzen der  $\zeta$ -,  $\epsilon$ - und  $\vartheta$ -Ketten der embryonalen Hämoglobine Gower I ( $\zeta_2/\epsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha_2/\epsilon_2$ ), Heide I ( $\zeta_2/\vartheta_2$ ) und Heide II ( $\alpha_2/\vartheta_2$ ) des Schweines [1, 2].

## Material und Methoden

Die Isolierung der Hämoglobin-Komponenten wurde früher beschrieben [1, 2]. Aus Gower I und Heide I wurden die  $\zeta$ -,  $\epsilon$ - und  $\vartheta$ -Ketten über CM-Cellulose gewonnen. Sie wurden mit einem konvexen Salzgradienten (10–150 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,8) eluiert. Die Reinheit der Ketten wurde elektrophoretisch nach Alter [3] gesichert: Die Sequenz wurde an Hand der tryptischen Peptide erarbeitet. Die Spaltung der Ketten durch Trypsin erfolgte nach Standardmethoden. Die „core“-Fraktion wurde durch Ansäuern des tryptischen Hydrolysats auf

pH 6,2 ausgefällt. Nach Gelfiltration der löslichen Fraktion an Sephadex G-25 in 0,1 N HAc wurden die Peptide der Gipfelfraktionen weiter über HPLC an RP2 und RP8 im Acetat-Acetonitril-System [4] aufgetrennt. Die „core“-Fraktionen der  $\epsilon$ - und  $\vartheta$ -Ketten wurden über HPLC im 0,1% TFA-Acetonitril-System an RP2 aufgearbeitet. Die analytisch reinen Peptide wurden automatisch im Sequenator mit Quadrol [5] oder hydrophobem Puffer (Diethylaminopropin) [6] unter Hilfe von hydrophilen Senfölen, Reagenz I und Reagenz II [7, 8] abgebaut und durch homologen Vergleich zugeordnet. Der blockierte N-Terminus der  $\zeta$ -Ketten wurde mit der Massenspektrometrie (FAB-Methode) aufgeklärt [9].

## Ergebnisse und Diskussion

Embryonale Hämoglobine wurden erstmals – durch Alkalidenaturierung – von Künzler beim Menschen [10] beschrieben; später konnte elektrophoretisch gezeigt werden, daß zwei neue Gene ( $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) exprimiert werden, die zwei Hämoglobine, Gower II ( $\alpha_2/\epsilon_2$ ) [11] und Gower I ( $\zeta_2/\epsilon_2$ ) [12] bilden. Inzwischen sind die Sequenzen der  $\epsilon$ - [13, 14] und  $\vartheta$ -Ketten des Menschen bekannt [15]:  $\zeta$ -Ketten liegen ferner blockiert vor, der N-Terminus ist acetyliert [6].

Es wurden weitere Untersuchungen an Embryonen der Säuger, hauptsächlich elektrophoretisch, durch-

**Abkürzungen:** Hb, Hämoglobin; HbA, adultes Hämoglobin; DPG, 2,3-Bisphosphoglycerat; Reagenz I, 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natriumsalz; Reagenz IV, 7-(Isothiocyanato)-naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Trinatriumsalz.

Teile dieser Ergebnisse sind Auszug aus: F. A. Bieber, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, in Vorbereitung.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Braunitzer

0341-0382/83/0700-0613 \$ 01.30/0



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 digitalized 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.

geführt. Wir konnten ältere Ergebnisse [17] am Schwein bestätigen (Gower I und Gower II), haben die Befunde insofern erweitert, indem wir ein neues Genprodukt ( $\vartheta$ -Gen) [1, 2] nachweisen konnten, das zwei neue embryonale Hämoglobine, Heide I ( $\zeta_2/\vartheta_2$ ) und Heide II ( $\alpha_2/\vartheta_2$ ) bildet [2]. Hier berichten wir über die vollständigen Sequenzen der  $\zeta$ -,  $\varepsilon$ - und  $\vartheta$ -Ketten des Schweines.

Die präparative Isolierung der  $\varepsilon$ -,  $\vartheta$ - und insbesondere der  $\zeta$ -Ketten zur späteren Sequenzierung bereitete zunächst Schwierigkeiten; so wurde noch keine Isolierung von  $\zeta$ -Ketten über CM-Cellulose beschrieben: in Puffer mit 8 M Harnstoff wandern  $\zeta$ -Ketten mit der Front und zu Beginn des Gradienten, sie werden bei pH 6.8 und niedriger Ionenstärke kaum an das Gel adsorbiert, die Ketten vom  $\beta$ -Typ ( $\varepsilon$ ,  $\vartheta$ ) sowie  $\alpha$ -Ketten werden stärker gebunden, „schmieren“ jedoch bei einem linearen Gradienten. Durch einen konvexen Salzgradienten werden aber alle Ketten als scharfe Gipfel eluiert. Die Trennung der Ketten von Gower II und Heide II gelang trotzdem nur schlecht, weil die  $\alpha$ -Ketten des Schweines

bei ähnlicher Ionenstärke eluieren wie  $\varepsilon$ - und  $\vartheta$ -Ketten.

Das Kettenmaterial der einzelnen Gipfel wurde durch Elektrophorese [3] identifiziert; die  $\zeta$ -Ketten spalten allerdings in zwei Banden auf, sind aber nach der Sequenzanalyse einheitlich. Außer Tp10b der Ketten vom  $\beta$ -Typ konnten alle Peptide aus dem normalen tryptischen Ansatz an der Umkehrphase RP8 oder RP2 mit der HPLC isoliert werden. Aus einem tryptischen Hydrolysat mit Perameisensäure oxidierte Kette gelang die Reinigung von Tp10b/11. Der N-Terminus der  $\zeta$ -Ketten, deren Sequenz dem  $\alpha$ -Typ entspricht, wurde massenspektrometrisch (FAB Methode) [9] erarbeitet: die blockierende Endgruppe ist ein Acetylrest.

Die komplette Sequenz der  $\varepsilon$ -,  $\zeta$ - und  $\vartheta$ -Ketten wird in Abb. 1 und Abb. 2 wiedergegeben. Die  $\zeta$ -Ketten unterscheiden sich in 23, die  $\varepsilon$ -Ketten in 20 Resten gegenüber den entsprechenden Humanketten.  $\vartheta$ -Ketten, deren Sequenzanalyse ebenfalls vollständig durchgeführt wurde, sind – wie schon früher gezeigt [1] – vom  $\varepsilon$ -Typ und unterscheiden sich von

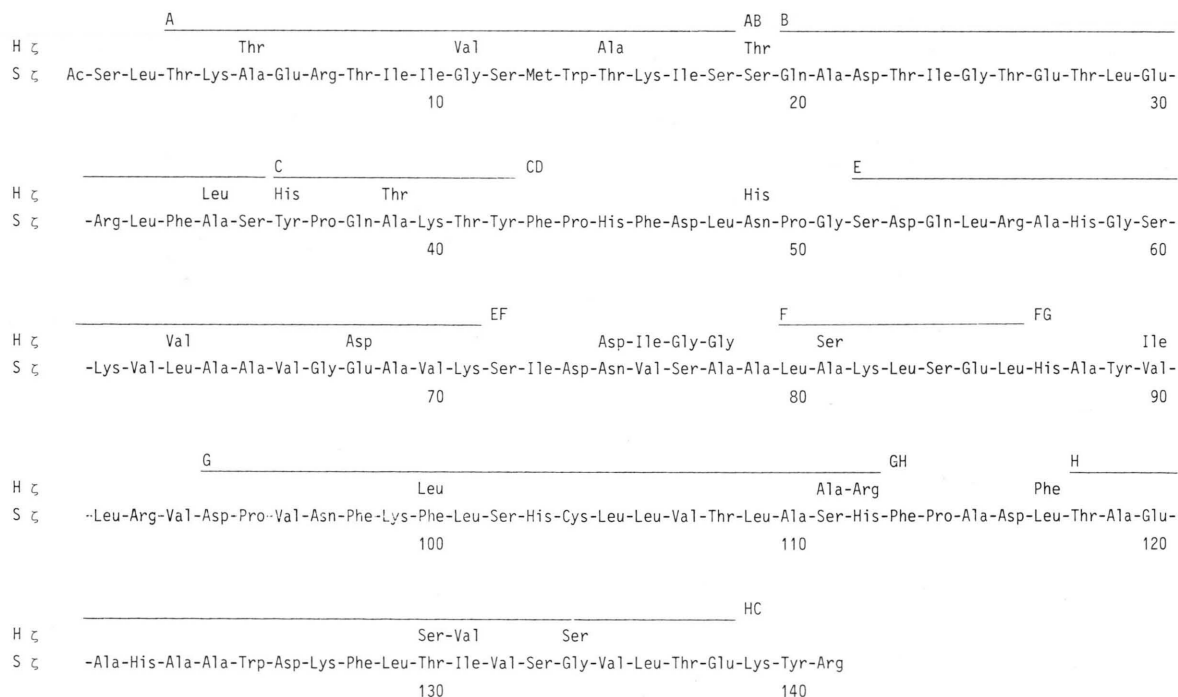


Abb. 1. Die Sequenz der  $\zeta$ -Ketten des Embryos des Schweines. Die  $\alpha$ -helicalen Bereiche A...H, die interhelicalen Teile der Peptidketten (CD, EF...) sind eingetragen. Die 23 Austausche gegenüber den menschlichen embryonalen  $\zeta$ -Ketten wurden in homologer Weise [23] dadurch gekennzeichnet, daß die in den menschlichen  $\zeta$ -Ketten vorkommenden unterschiedlichen Reste der Sequenz übergestellt wurden. Die  $\zeta$ -Ketten sind vom  $\alpha$ -Typ und durch Duplikation des  $\alpha$ -Gens vor  $400 \times 10^6$  Jahren daraus hervorgegangen.

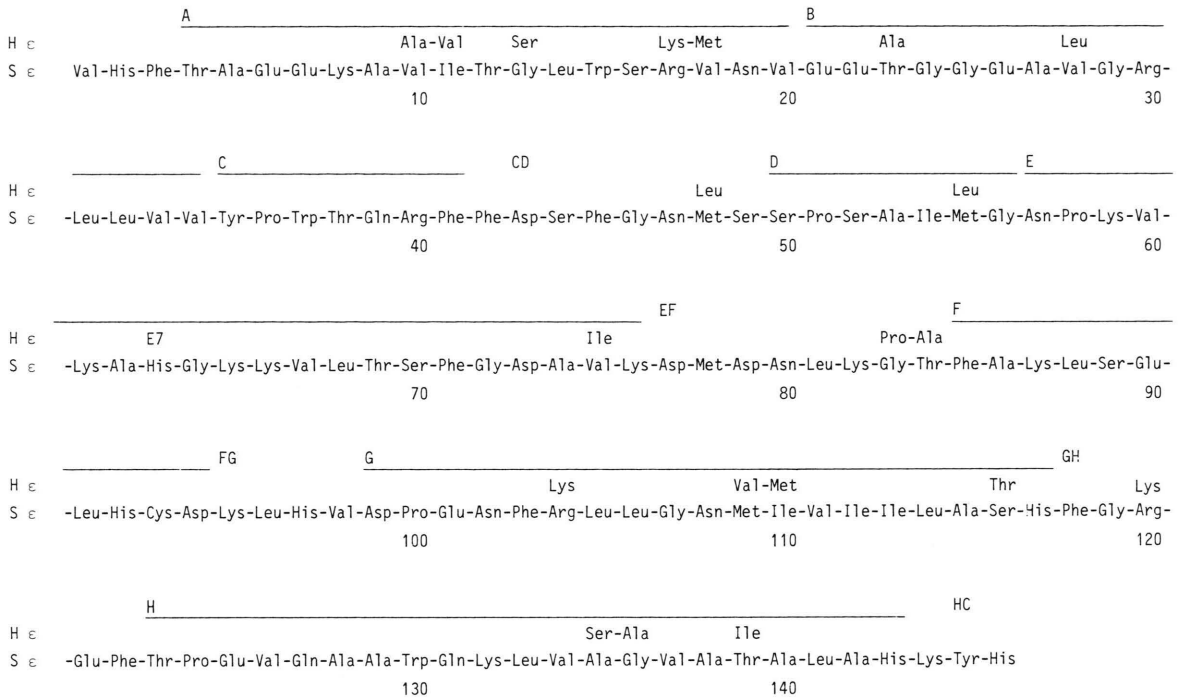


Abb. 2. Die Sequenz der  $\epsilon$ - und  $\beta$ -Ketten der embryonalen Hämoglobine des Schweines. In der Abb. ist die Sequenz der  $\epsilon$ -Ketten wiedergegeben. Die  $\alpha$ -helicalen Bereiche A . . . H, die interhelicalen Teile der Peptidketten (CD, EF . . .) sind eingetragen. Die 20 Austausche gegenüber den  $\epsilon$ -Ketten der embryonalen Hämoglobine des Menschen wurden in homologer Weise [23] dadurch gekennzeichnet, daß die im Human-Hämoglobin vorkommenden unterschiedlichen Reste der Sequenz übergestellt wurden. Die  $\beta$ -Ketten, ein neues Genprodukt der embryonalen Hämoglobine der Säuger, sind vom  $\epsilon$ -Typ und wurden ebenfalls komplett sequenziert. Sie unterscheiden sich von den  $\epsilon$ -Ketten des Schweines im Austausch von nur 4 Aminosäuren ( $\beta = \epsilon 9$  Ala  $\rightarrow$  Ser,  $\epsilon 16$  Ser  $\rightarrow$  Gly,  $\epsilon 17$  Arg  $\rightarrow$  Lys,  $\epsilon 120$  Arg  $\rightarrow$  Gly). Aufgrund der Sequenzunterschiede ergibt sich, daß das  $\beta$ -Gen durch Duplikation des  $\epsilon$ -Gens vor ca.  $20 \times 10^6$  Jahren entstand.

ihnen in nur 4 Sequenzen.  $\beta$ -Ketten sind daher ein Produkt der Duplikation des  $\epsilon$ -Gens, die aber vor relativ kurzer Zeit, etwa  $20 \times 10^6$  Jahren erfolgte.

Beim Schwein wird kein foetales Hämoglobin gefunden: nach der embryonalen Phase wird – im Gegensatz zum Menschen und vielen höheren Säugern – sofort das HbA ( $\alpha_2/\beta_2$ ) [17, 18], also der adulte Blutfarbstoff nachgewiesen. Die foetale Phase der Atmung mit erniedrigten  $P_{50}O_2$ -Werten ist durch eine niedrige DPG-Konzentration ( $Hb > DPG$ ) gekennzeichnet [19–22], doch – post partem – wird durch Ankurbelung der DPG-Biosynthese der Normalwert des erwachsenen Tieres ( $Hb < DPG$ ) erreicht. Durch diese Arbeit sind beim Schwein sämtliche Hämoglobine (5 Genprodukte = 5 Ketten, die 5 Hämoglobine bilden) der exprimierten Hb-Gene beschrieben. Während für die embryonale Phase der Ontogenese 4 Hämoglobine bereitgestellt werden, steht für die foetale Phase und für das erwachsene Schwein ein einziger Blutfarbstoff zur Verfü-

gung. Diese Daten sollen durch physiologische Untersuchungen der 4 embryonalen Hämoglobine ergänzt werden und aufgrund der vorgelegten Primärstruktur erstmals eine vollständige (molekulare) Deutung der Aufnahme des Sauerstoffs aus dem Blutkreislauf der Mutter, dessen Transport und dessen kontrollierte Abgabe an den Embryo ermöglichen. Die Ausführliche Diskussion der Daten erfolgt später.

#### Dank

Wir danken Frau B. Marquarding für wertvolle Mitarbeit, Herrn A. Stangl, Frau B. Schrank und Herrn C. Krombach für die Arbeit am Analysator bzw. Sequenator. Herr Prof. W. Schäfer, Martinsried, hat freundlicherweise – massenspektrographisch – die N-Acetylgruppe der  $\zeta$ -Ketten bestimmt. Herrn Prof. Dr. H. Probst, Tübingen danken wir für die großzügige Förderung der Arbeit.

- [1] W. Steer und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1165–1169 (1980).
- [2] M. S. Bektas, F. A. Bieber und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **362**, 991–995 (1981).
- [3] B. P. Alter, S. C. Goff, G. D. Efremov, M. E. Gravely und T. H. J. Huisman, Br. J. Haematol. **44**, 527–534 (1980).
- [4] H. Kratzin, C. Yang, J. U. Krusche und N. Hilschmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1591–1598 (1980).
- [5] P. Edman und G. Begg, Eur. J. Biochem. **1**, 80–91 (1967).
- [6] G. Braunitzer, B. Schrank und A. Ruhfus, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 1589–1590 (1970).
- [7] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Stangl und U. Scheithauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 137–146 (1978).
- [8] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Ruhfus, S. Petersen, und U. Petersen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 1730–1732 (1971).
- [9] H. R. Morris, Nature **286**, 447–452 (1980).
- [10] H. Drescher und W. Künzer, Klin. Wochenschrift **32**, 92 (1954).
- [11] E. R. Huehns, F. V. Flynn, E. A. Butler und G. H. Beaven, Nature (London) **189**, 496–497 (1961).
- [12] G. L. Gapp, D. A. Rigas und R. T. Jones, Science **157**, 65–66 (1967).
- [13] F. E. Baralle, C. C. Shoulders und N. J. Proudfoot, Cell **21**, 621–626 1980.
- [14] R. E. Gale, J. B. Clegg und E. R. Huehns, Nature **280**, 162–164 1979.
- [15] H. Aschauer, T. Sanguansermisri und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **362**, 1159–1162 (1981).
- [16] H. Aschauer, W. Schäfer, T. Sanguansermisri und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **362**, 1657–1659 (1981).
- [17] C. H. Tautz und E. Kleihauer, Res. Exp. Med. **159**, 44–49 (1972).
- [18] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Stangl und U. Scheithauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 137–146 (1978).
- [19] D. K. Hyun und J. Duhm, Am. J. Physiol. **226**, 1001–1006 (1974).
- [20] R. Baumann, F. Teischel, R. Zoch und H. Bartels, Resp. Physiol. **19**, 153 (1973).
- [21] P. M. Tweedale, Resp. Physiol. **19**, 12 (1973).
- [22] G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 1237–1242 (1979).
- [23] G. Braunitzer, R. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff und B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **325**, 283–286 (1961).