

Der Nachweis einer strukturellen Änderung des Haemoglobins bei der Aufnahme von Sauerstoff läßt es möglich erscheinen, daß auch andere Enzyme bei der Vereinigung mit ihrem Substrat ihre Struktur ändern und daß dies vielleicht ein wichtiger Faktor bei der enzymatischen Katalyse ist.

Dank

Ich habe bereits gesagt, wie sehr Sir *Lawrence Bragg* diese Untersuchungen förderte, aber ich schulde ihm außerdem großen Dank für viele Ideen und helfende Kritik.

Sir *Harold Himsworth*, Geschäftsführer des Medical Research Council, sorgte dafür, daß uns nie die benötigten Mittel oder Geräte fehlten. Ohne diese ständige Unterstützung wären unsere Arbeiten in dem Umfang unmöglich gewesen. Dr. *G. R. Pomerat*, einer der Direktoren der Rockefeller Foundation, half uns, zusätzliche Ausgaben zu decken, die der Medical Research Council nicht übernehmen konnte. Darüberhinaus unterstützte mich die Rockefeller Foundation in den ersten Jahren. Ohne ihre Hilfe wären die Untersuchungen über Anfänge wahrscheinlich nicht hinausgekommen.

Eingegangen am 1. April 1963 [A 298]
Übersetzt von Dr. *H. Grünwald*, Heidelberg

Myoglobin und die Struktur der Proteine

NOBEL-VORTRAG AM 11. DEZEMBER 1962 [*]

VON DR. J. C. KENDREW

MEDICAL RESEARCH COUNCIL,
LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY, CAMBRIDGE (ENGLAND)

Einleitung

Als ich mich gegen Ende des 2. Weltkrieges zum ersten Male für die Struktur der Proteine interessierte, war ich davon überzeugt, daß dieses Problem vor allen anderen die Aufmerksamkeit derer verdiente, die sich mit den Grundlagen der Biologie befassen. Wäre mein Interesse einige Jahre später geweckt worden, so hätte ich zweifellos bemerkt, daß hier nicht nur eine, sondern sogar zwei grundlegende Fragen unbeantwortet waren: die Struktur der Proteine und die Struktur der Nucleinsäuren. Die zweite Frage wurde später gestellt und früher beantwortet. Für mich jedoch schien in den vierziger Jahren nur eine Frage das Interesse desjenigen wert zu sein, der chemische und physikalische Methoden auf Probleme der Biologie anwenden wollte. Weiter schien die Röntgenstrukturuntersuchung die einzige erfolgversprechende Methode zur Bestimmung der Struktur so großer und kompliziert gebauter Moleküle, wie die Proteine es sind, zu sein. Rückblickend würde ich sagen, daß meine nahezu völlige Unkenntnis dieser Methode ein glücklicher Umstand gewesen ist, insofern als sie mir verbarg, wie wenig sich die damalige Technik der Röntgenkristallographie zur Strukturbestimmung von Molekülen mit vielen tausend Atomen eignete; es war wirklich ein Fall glückseliger Unwissenheit.

Einige Jahre lang blieb die Lage unverändert. Vieles wurde versucht, aber nichts ließ eine endgültige Lösung erhoffen, bis mein Kollege Dr. *Max Perutz* zeigte, daß die Methode des isomorphen Ersatzes, die man bis

dahin in der Kristallographie ziemlich selten und auf dem zur Diskussion stehenden Gebiet überhaupt nicht angewendet hatte, für die Lösung des Protein-Problems geradezu ideal war. Seine erste erfolgreiche Anwendung dieser Methode bei der Untersuchung der Hämoglobin-Struktur gab die Grundlage für alle folgenden Arbeiten, meine eigenen eingeschlossen. *Perutz* hat die Methode in seinem Vortrag [1] beschrieben, so daß ich über Fragen der Methodik nur soweit berichten werde, wie sie spezielle Bedeutung für meine eigenen Arbeiten haben.

Die Wahl des Themas und der Methode waren für mich ohne Problem gewesen; nicht so die Wahl des Materials. Es sollte ein Protein von niedrigem Molekulargewicht sein, das sich leicht in größerer Menge darstellen ließ, gut kristallisierte und noch nicht röntgenographisch untersucht war. Diesen Bedingungen schien das Myoglobin zu genügen; außerdem hatte es den Vorteil, mit dem Hämoglobin verwandt zu sein, dem sich *Perutz* seit einigen Jahren gewidmet hatte, und wie dieses die sehr bedeutende und interessante biologische Funktion der reversiblen Sauerstoff-Aufnahme zu erfüllen. Es zeigte sich später, daß das Myoglobin aus einer einfachen Polypeptidkette von etwa 150 Aminosäureresten besteht, die mit einer Hämgruppe verbunden ist. Daß sein Molekulargewicht zu dem des Hämoglobins im Verhältnis 1:4 steht, ist kein zufälliges Zusammentreffen; vielmehr beruht dieses Verhältnis auf einer grundlegenden strukturellen Verwandtschaft, die beim Vergleich der Molekülmodelle beider Proteine

[*] Wir danken dem Autor und dem Nobel-Komitee, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieses Vortrags.

[1] *M. Perutz*, Angew. Chem. 75, 589 (1963).

deutlich wurde. Am Anfang galt unsere Aufmerksamkeit jedoch stärker den praktischen Problemen, deren Lösung mehrere Jahre brauchte, als hypothetischen strukturellen Beziehungen.

Untersuchungsmaterial

Zunächst war es notwendig, eine Tierart zu finden, deren Myoglobin morphologisch und strukturell brauchbare Kristalle bildete. Die Suche danach führte uns weit umher und schließlich zum Pottwal, *Physeter catodon*. Unser Material kam aus Peru oder der Antarktis. Brauchbar ist auch das Myoglobin des gewöhnlichen Seehunds, dessen Struktur jetzt von Dr. Helen Scouloudi an der Royal Institution in London untersucht wird.

Nachdem sich die Methode des isomorphen Ersatzes zur Aufklärung einer Proteinstruktur als brauchbar erwiesen hatte, bestand unsere Aufgabe darin, jedes Proteinmolekül im Kristall an definierten Stellen mit einer kleinen Zahl sehr schwerer Atome zu markieren. Myoglobin besitzt keine Sulfhydryl-Gruppe, deren Anwesenheit im Hämoglobin *Perutz* und *Ingram* so erfolgreich zur Anlagerung von Quecksilber-Verbindungen benutzt wurden; wir mußten nach anderen Wegen suchen. Versuche, Liganden mit schweren Atomen an die Häm-Gruppe anzulagern, blieben zum größten Teil erfolglos, da die Liganden bereits durch Spuren von Sauerstoff, die praktisch nicht auszuschließen waren, rasch verdrängt wurden. So mußten wir mehr empirisch vorgehen. Wir ließen Myoglobin in Gegenwart von Metallionen kristallisieren und beobachteten, ob auf den Röntgenaufnahmen Änderungen zu erkennen waren. Weitere Untersuchungen waren erforderlich, um festzustellen, ob die Substitution an einer einzigen Stelle stattgefunden hatte, wie wir es wünschten. Da es hierfür keine theoretische Grundlage gab, mußten wir viele Liganden – einige hundert – ausprobieren, bis zwei oder drei gefunden waren, die unsere ziemlich scharfen Bedingungen erfüllten. Mühselige empirische Untersuchungen dieser Art erwarten immer noch alle, die auf diesem Gebiet arbeiten, und begrenzen die Anwendbarkeit der Methode des isomorphen Ersatzes. Eine rationelle und allgemein brauchbare Lösung dieses Problems würde mehr als alles andere zur Erschließung des Gebietes beitragen.

Gang der Analyse [2,3]

Perutz hatte die Methode des isomorphen Ersatzes beim Hämoglobin zunächst angewendet, um eine zweidimensionale Projektion der Struktur zu erhalten. Wir taten das gleiche beim Myoglobin. Die Zahl der Röntgenreflexe, die man für eine solche Projektion benötigt, ist verhältnismäßig klein, und die Lösung des Phasen-Problems ist einfach; sogar mit einem einzigen isomor-

[2] J. C. Kendrew u. R. G. Parrish, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A 238, 305 (1956).

[3] M. M. Bluhm, C. Bodo, H. M. Dintzis u. J. C. Kendrew, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A, 246, 369 (1958).

phen Ersatz sind die Resultate eindeutig. Doch ist die Auskunft über die Struktur, die eine solche Projektion hergibt, praktisch gleich Null, da sich in einem so komplizierten Molekül viele Atome überlagern. Es war daher von vornherein klar, daß eine dreidimensionale Strukturbestimmung nötig sein würde, um eine räumliche Wiedergabe der Elektronendichte über den ganzen Kristall zu erhalten. Dies erforderte die Einbeziehung einer viel größeren Zahl von Reflexen, die Berechnung von allgemeinen Phasen und schließlich für eine eindeutige Lösung den Vergleich mehrerer Derivate, die an verschiedenen Stellen des Moleküls mit schweren Atomen substituiert waren.

Das Beugungsbild eines Myoglobinkristalls enthält mindestens 25000 Reflexe. Als wir 1955 mit diesen Untersuchungen begannen, standen keine Rechenanlagen zur Verfügung, die schnell genug arbeiteten, um Fourier-Synthesen mit so vielen Gliedern zu berechnen; außerdem war die Methode unbewiesen, und es schien ratsam, sie zunächst an einem kleinen Teil der Daten zu überprüfen.

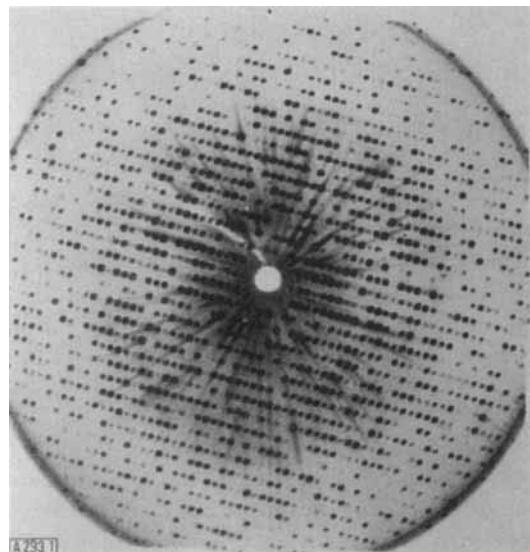


Abb. 1. Beugungsbild eines Myoglobin-Kristalls, aufgenommen mit der Präcessionskamera.

Wir können die Röntgenaufnahme eines Myoglobinkristalls (Abb. 1) als zweidimensionalen Schnitt durch eine dreidimensionale Anordnung von Reflexen betrachten. Jeder Reflex entspricht einem Fourier-Koeffizienten, und die gesamte Struktur läßt sich durch Verwendung aller dieser Koeffizienten als Glieder einer Fourier-Reihe rekonstruieren.

Wie *Perutz* in seinem Vortrag [1] gezeigt hat, liegen die Reflexe der höheren Ordnungen, aus denen sich die Feinheiten der Struktur ergeben, an der Außenseite der Aufnahme. Daher erhält man eine Wiedergabe des Moleküls mit geringer Auflösung, wenn man nur die Reflexe innerhalb einer kugelförmigen Oberfläche in der Mitte der Aufnahme berücksichtigt. Durch Verdopplung des Radius der Kugel (die dann achtmal so viel Reflexe enthält) wird auch die Auflösung der Elektronendichteverteilung verdoppelt.

Wir beschlossen, die Strukturaufklärung in drei Stufen vorzunehmen. Für die erste, 1957 abgeschlossene Stufe

berücksichtigten wir 400 Reflexe und erhielten eine Auflösung von 6 Å; die zweite Stufe (1959) umfaßte etwa 10000 Reflexe und ergab eine Auflösung von 2 Å; die dritte (noch nicht beendete) Stufe berücksichtigt alle zu beobachtenden Reflexe – ca. 25000 – und gibt eine Auflösung von 1,4 Å. Es sei daran erinnert, daß sich Polypeptidketten in Abständen von 5 bis 10 Å zusammenlagern, daß Atome (außer Wasserstoff) benachbarter Gruppen, die durch van der Waalsche Kräfte, Wasserstoffbrücken oder Ladungsübergänge zusammengebracht werden, 2,8 bis 4 Å voneinander entfernt sind, und daß der Abstand zweier kovalent gebundener Atome 1 bis 1,5 Å beträgt. Daraus folgt, daß in den drei Stufen zunächst die Gestalt der Polypeptidketten, dann die Lage von Atomgruppen und schließlich die Lage einzelner Atome sichtbar werden sollten. Der dritte Schritt mit einer Auflösung von 1,4 Å müßte benachbarte, kovalent gebundene Atome unterscheiden können, aber damit ist die Grenze des Verfahrens erreicht, denn über diesen Punkt hinaus können auf der Beugungsaufnahme keine Reflexe mehr beobachtet werden. Diese Grenze entspricht einem geringeren Ordnungsgrad als er bei Kristallen von weniger kompliziert gebauten Molekülen üblich ist; der Ordnungsgrad des Myoglobins ist jedoch höher als der fast aller anderen Proteine, und auch dies war ein Grund für die Wahl dieses Proteins zur Untersuchung.

Bevor ich die Ergebnisse der drei Schritte beschreibe, will ich noch einmal auf die Frage der Rechenautomaten zurückkommen. Wie aus dem folgenden hervorgeht, wächst die Zahl der strukturellen Informationen mit der Auflösung. Da der Helix-Anteil des Myoglobins mit 75 % beträchtlich größer ist als der der meisten anderen Proteine, ließen sich hier die Polypeptidketten bereits bei 6 Å Auflösung und die Verzweigungsstellen der Seitenketten schon bei 2 Å Auflösung gut erkennen. Oft konnte die Seitenkette bereits identifiziert werden, ohne daß die einzelnen Atome sichtbar waren. Wahrscheinlich ist man bei anderen Proteinen viel stärker auf höhere Auflösungen angewiesen.

Der Rechenaufwand nimmt aber sehr rasch mit der Höhe der Auflösung zu. Bereits beim ersten Schritt unserer Analyse arbeiteten wir mit einem elektronischen Rechenautomaten, EDSAC I, der – obwohl an den heutigen Verhältnissen gemessen klein und langsam – damals eines der ersten Geräte dieser Art war; die Fourier-Synthesen des Myoglobins waren meines Wissens die ersten kristallographischen Berechnungen, die mit einem Elektronenrechner ausgeführt wurden. Die so begründete Methode wurde später allgemein gebräuchlich. Auf jeder Stufe der Myoglobin-Untersuchung verwendeten wir Rechenanlagen, die zu den schnellsten gehörten. Heute stehen uns sehr große und sehr schnelle Rechenautomaten wie EDSAC II und IBM 7090 zur Verfügung. Aber viele Proteine sind größer als das Myoglobin und werden noch bessere Rechenanlagen erfordern.

Ein weiteres Problem ist die Datensammlung und Datenverarbeitung. Bei der Myoglobin-Untersuchung wurden die Meßwerte für die Synthesen bei 6 Å und 2 Å zum größten Teil auf dem konventionellen photographischen Weg erhalten, aber bereits bei der 2-Å-Stufe erforderte die Phasenbestimmung für 9600 Reflexe die Messung von insgesamt etwa 250000 Werten für mehrere Schweratom-Derivate und bei unterschiedlichen Belichtungszeiten. Dies liegt an der Grenze des praktisch Möglichen, besonders da wir uns das Ziel gesetzt hatten (und erreichten), daß der mittlere Fehler bei der Bestimmung der Strukturamplituden nur 2 bis 4 % betragen sollte; persönlich würde ich eine solche Arbeit kein zweites Mal unternehmen.

Bei höherer Auflösung machen Bestrahlungsschäden an den Kristallen die photographische Technik sehr schwierig,

wenn nicht ganz unmöglich [*]. Glücklicherweise wurde gerade zu der Zeit, als wir mit der letzten Stufe der Arbeit begannen, ein automatisches Diffraktometer verfügbar, das meine Kollegen Dr. U. W. Arndt und Dr. D. C. Phillips entworfen hatten; mit diesem Gerät können wir die Intensitäten aufeinanderfolgender Reflexe mit einem Proportionalzähler messen, auf Lochstreifen schreiben und diese direkt in einen schnell arbeitenden Rechenautomaten geben. Zweifellos sind Apparaturen zur automatischen Datensammlung sowie große und schnell arbeitende Rechenanlagen für Röntgenstrukturuntersuchungen, besonders der Proteine, wesentlich.

Myoglobin bei 6 Å Auflösung [4,5]

Die dreidimensionale Elektronendichteverteilung in einem Kristall stellt man gewöhnlich mit einer Serie von Konturzeichnungen auf transparenten Blättern dar, die übereinandergelegt werden; das so für Myoglobin bei 6 Å Auflösung erhaltene Bild zeigt Abb. 2.

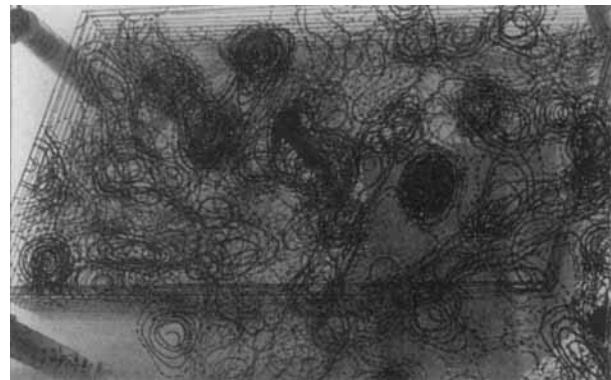


Abb. 2. Fouriersynthese von Myoglobin bei einer Auflösung von 6 Å.

Bei einem flüchtigen Blick auf die Zeichnung scheint sie aus einer großen Zahl stabförmiger Abschnitte zu bestehen, die an den Enden zusammenhängen und sich unregelmäßig über die Struktur verteilen. In jedem Molekül finden sich weiter eine stark abgeflachte Scheibe hoher Elektronendichte und mehrere Gebiete gleicher niedriger Elektronendichte, die miteinander verbunden sind. Die stabförmigen Abschnitte können mit den Polypeptidketten, die Scheibe mit dem Eisenatom und seinem angegliederten Porphyrinring und die Gebiete geringer Elektronendichte mit der Flüssigkeit identifiziert werden, welche die Räume zwischen benachbarten Molekülen ausfüllt. Aus dieser Darstellung ließ sich ein einzelnes Protein-Molekül „herausschneiden“; seine Grenzen deutet die umgebende Flüssigkeit an. Ein maßstäbliches Modell dieses Protein-Moleküls ist in Abb. 3 wiedergegeben.

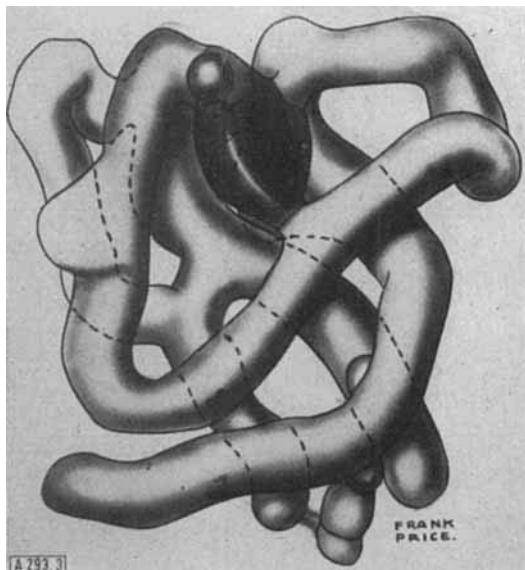
[*] Anm. d. Übers.: Die Reflexe der höheren Ordnungen, die zur höheren Auflösung benötigt werden, sind gewöhnlich sehr schwach und erfordern daher eine sehr lange Belichtungszeit. Bei sehr langer, seltener bei kurzer, Bestrahlungsdauer können im Kristall morphologische oder chemische Veränderungen auftreten; die Röntgenaufnahmen sind dann nicht mehr brauchbar.

[4] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff u. D. C. Phillips, *Nature (London)* 181, 666 (1958).

[5] G. Bodo, H. M. Dintzis, J. C. Kendrew u. H. W. Wyckoff, *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A*, 253, 70 (1959).

Die Polypeptidkette konnte zum größten Teil als kontinuierliches Gebiet hoher Elektronendichte verfolgt werden, doch blieben einige zweifelhafte Stellen, besonders in den unregelmäßigen Gebieten zwischen zwei stabförmigen Gebilden.

Das Auffälligste an diesem Molekül war seine Unregelmäßigkeit und das völlige Fehlen einer Symmetrie. Um so bemerkenswerter war daher die spätere Beobachtung von *Perutz*, daß jede der vier Untereinheiten des Häm-



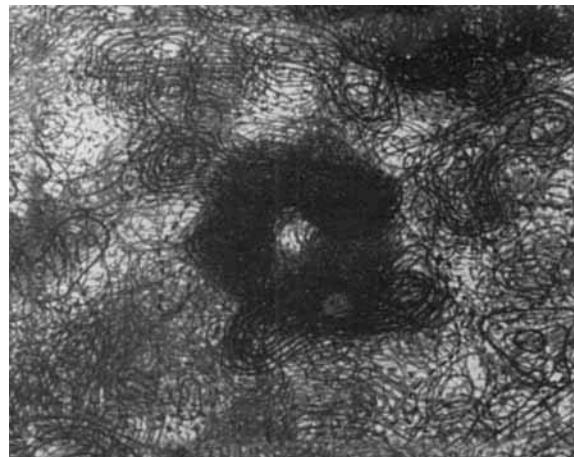
globins dem Myoglobin-Molekül trotz der großen Unterschiede in Herkunft und Aminosäurezusammensetzung sehr ähnlich ist. Wie erwartet, war es bei der Auflösung von 6 Å nicht möglich, irgendwelche Schlüsse auf die Faltung der Polypeptidkette zu ziehen und Seitenketten zu sehen oder gar zu identifizieren.

Myoglobin bei 2 Å Auflösung [6]

Um eine Auflösung von 2 Å zu erhalten, mußten die Phasen von etwa 10000 Reflexen bestimmt und eine Fourier-Synthese mit der gleichen Zahl von Gliedern berechnet werden. Wie bereits erwähnt, ist mit dieser Aufgabe etwa die Grenze der photographischen Aufnahmetechnik erreicht. Die Fourier-Synthese (vorbereitende Rechnungen von beträchtlichem Umfang und großer Schwierigkeit nicht eingeschlossen) beanspruchte etwa 12 Stunden ununterbrochener Rechenzeit auf einer sehr schnellen Maschine (EDSAC II). Die Elektronendichtefunktion wurde für etwa 100000 Punkte im Molekül berechnet und ist in Abb. 4 in einer dreidimensionalen Zeichnung dargestellt.

In dieser Abbildung blickt man entlang der Achse eines der geraden, stabförmigen Abschnitte der Polypeptidkette, die bei geringerer Auflösung zu erkennen waren;

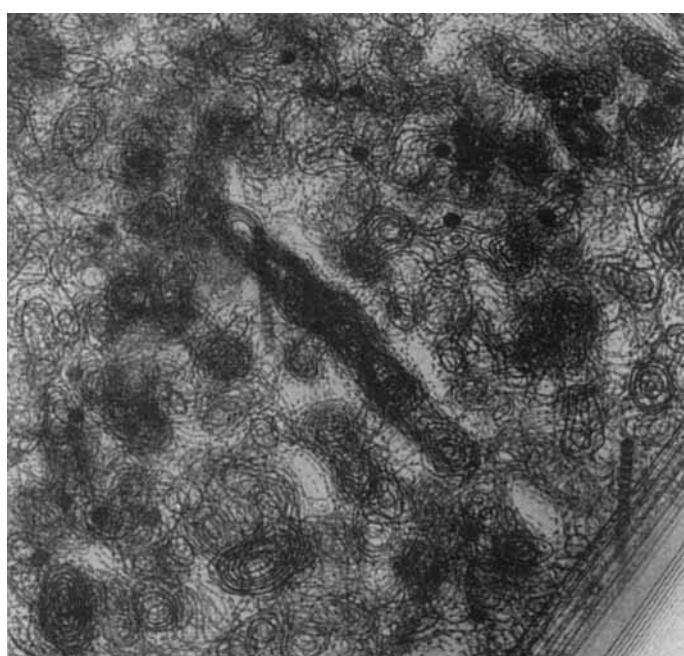
[6] J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips u. V. C. Shore, *Nature (London)* 185, 422 (1960).



A 293.4

Abb. 4. Fourier-Synthese von Myoglobin bei einer Auflösung von 2 Å (Ausschnitt). Die Abbildung zeigt einen Helix-Abschnitt der Polypeptidkette vom Ende her gesehen.

man sieht, daß der Stab sich nun zu einem geraden hohlen Zylinder aufgelöst hat. Eine Untersuchung der Elektronendichteverteilung auf der Oberfläche dieses Zylinders (und anderer) zeigte, daß sie auf die Anordnung von Atomen in einer α -Helix paßt, wie sie *Pauling* und *Corey* 1951 für die Ketten-Konfiguration in der α -Familie faserförmiger Proteine gefordert haben. Eine sorgfältige Analyse der Elektronendichteverteilung ergab, daß nahezu alle Helix-Abschnitte genau gerade sind und daß ihre Abmessungen innerhalb der Fehlergrenze der Analyse mit den Daten von *Pauling* und *Corey* übereinstimmen. Weiter kann man direkt die Orientierung jeder Seitenkette relativ zu den Atomen der Helix erkennen und auf Grund unserer Kenntnis der absoluten Konfiguration der L-Aminosäuren zeigen, daß alle Helices rechtsgängig sind.



A 293.5

Abb. 5. Fourier-Synthese von Myoglobin bei einer Auflösung von 2 Å (Ausschnitt). Häm-Gruppe von der Seite gesehen.

Ein anderer Blick auf die Elektronendichtevertteilung (Abb. 5) zeigt die Häm-Gruppe von der Seite als flache Scheibe mit dem Eisenatom in der Mitte. Zu unserer Überraschung fanden wir, daß das Eisenatom um mehr als 0,25 Å außerhalb der Ebene dieser Gruppe liegt. Wenig später hörten wir von Dr. Koenig von der John-Hopkins-Universität, daß er die gleiche Erscheinung bei der Strukturanalyse des Hämmins beobachtet hatte. Wir konnten weiter sehen, daß das Eisenatom mit einem der Helix-Abschnitte der Polypeptid-Kette durch eine Gruppe verknüpft ist, die wir später als Histidin identifizierten, ein Beweis für die vor mehr als 30 Jahren gemachte Annahme, daß Histidin die vom Häm gebundene Gruppe im Hämoglobin und Myoglobin sei.

In unserer vorläufigen Veröffentlichung [6] über diese Fourier-Synthese (1960) führten wir aus, daß bei einer Auflösung von 2 Å benachbarte, kovalent gebundene Atome nicht unterschieden werden, und daß eine systematische Identifizierung der Seitenketten daher nicht möglich wäre. Wir waren aber zu pessimistisch: An der Polypeptidkette befinden sich in bestimmten Abständen Vorsprünge der Elektronendichte. Wir untersuchten die Gestalt dieser Vorsprünge sehr sorgfältig und konnten sie oft eindeutig mit einem der 17 aus der Zusammensetzung des Myoglobin-Moleküls bekannten Seitenketten-Typen identifizieren. Eine Bestätigung und Erweiterung unserer Ergebnisse kam von einer ganz anderen Seite: Als das Myoglobin-Programm in vollem Gange war, fragte ich Dr. W. H. Stein und Dr. Stanford Moore vom Rockefeller Institut in New York, ob nicht einer ihrer Mitarbeiter die Aminosäuresequenz des

	Phe	Phe	Phe	5
	Lys	[Lys]	Thr	3, 1,ys 2
	Ser	Ser	Ser	3, Thr 2
C1	His	His	His	5
	Pro	Pro	Pro	4
	Glu.C	Glu	Glu.C	5
	Thr	Thr	Thr	4
	Leu	Leu	Leu	4
	Glu	Glu	Ser	2, Thr 2
	Lys	Lys	Lys	3
CD1	Phe	Phe	Phe	5
	Asp	Asp	Asp	2
	Arg	Arg	Arg	3
	Phe	Phe	Phe	4
	Lys	Lys	Lys	3
	His	His	His	4
	Leu	Leu	Leu	2, Asp 2
	Lys	Lys	Lys	1
D1	Thr	Thr	Thr	5
	Glu.C	Glu	Glu	4
	Ala	Ala	Ala	5
	Glu.C	Glu	Glu	3
	Met	Met	Met	5
	Lys		Lys	4

Schema 1. Vergleich zwischen einer chemisch und röntgenographisch abgeleiteten Aminosäure-Teilsequenz des Myoglobins.

Linke Spalte: tryptische Peptide; mittlere Spalte: chymotryptische Peptide; rechte Spalte: Röntgenuntersuchung. Die Peptide sind durch Klammern eingeschlossen. In der rechten Spalte gibt die Ziffer den Grad der Wahrscheinlichkeit an (5 = sicher, 1 = reine Annahme).

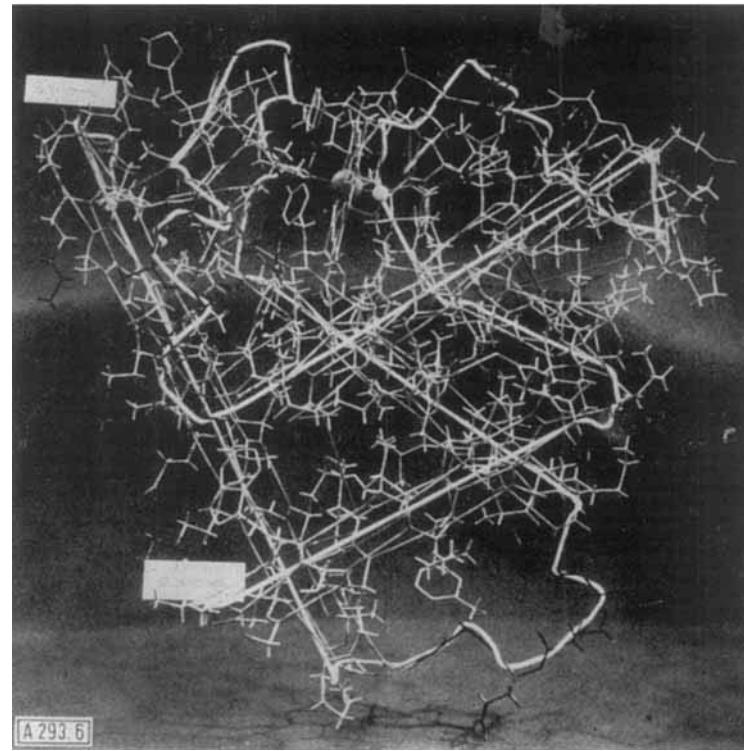


Abb. 6. Modell des Myoglobin-Moleküls aus der 2-Å-Fourier-Synthese. Die weiße Linie deutet den Verlauf der Polypeptid-Kette an; das Eisenatom ist durch eine graue Kugel, sein angelagertes Wassermolekül durch eine weiße Kugel gekennzeichnet.

Myoglobins bestimmen könnte nach der Methode, die Sanger bei seinen Untersuchungen über das Insulin angewendet hatte und die später im Rockefeller Institut bei der Untersuchung der Ribonuclease weiter entwickelt und ausgebaut worden war. Dr. Allen Edmundson, der damals als graduate student unter der Anleitung von Dr. C. H. W. Hirs arbeitete, übernahm diese Aufgabe. Als unsere 2-Å-Synthese fertig war, hatte Dr. Edmundson die meisten Peptide, die bei der tryptischen Verdauung des Myoglobins entstehen, bereits untersucht, ihre Zusammensetzung ermittelt und in einigen Fällen die Sequenz bestimmt. Beim Vergleich seiner Peptide mit den unvollständigen und nur vermuteten Sequenzen, die wir aus der Röntgenanalyse abgeleitet hatten, konnten wir in vielen Fällen Zusammenhänge finden, die sowohl unsere Zuordnungen als auch seine Analysen bestätigten und Unklarheiten auf beiden Seiten aufhoben (Schema 1) [7].

Alles in allem konnten wir etwa 2/3 aller Aminosäuren im Molekül mit einiger Sicherheit bestimmen, obwohl sich einige Reste sehr ähnlicher Gestalt nur schwierig unterscheiden ließen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben wir in einem Modell zusammengefaßt (Abb. 6), das die räumliche Lage der helixförmigen Abschnitte der Polypeptidkette, der Häm-Gruppe und der meisten Seitenketten zeigt; es gibt, weniger genau, auch die Lage der Atome in den meisten nicht-helixförmigen Abschnitten und in vielen der restlichen Seitenketten wieder.

[7] J. C. Kendrew, H. C. Watson, B. E. Strandberg, R. E. Dickerson, D. C. Phillips u. V. C. Shore, Nature (London) 190, 666 (1961).

Myoglobin bei 1,4 Å Auflösung

In den letzten zwei Jahren haben wir uns damit befaßt, die Auflösung des Elektronendichte-Bildes durch Verwertung praktisch aller 25000 Reflexe, die sich auf den Aufnahmen erkennen lassen, auf 1,4 Å zu verbessern. Wir kennen jetzt die Elektronendichte an 500000 Punkten im Molekül. Es wurde bereits erwähnt, daß diese Erweiterung der Analyse dadurch möglich wurde, daß ein Gerät zur automatischen Datensammlung unter Benutzung von Proportional-Zählern und eine noch größere Rechenanlage, die IBM 7090, zur Verfügung standen. Trotzdem wäre dies eine enorme Arbeit gewesen, wenn wir weiter die Methode des isomorphen Ersatzes angewendet hätten, bei der man die Daten für mehrere

isomorphe Derivate sammeln muß. Statt dessen sind wir zur konventionelleren Methode der successiven Verfeinerung zurückgekehrt und haben die Verwendung von Schweratom-Derivaten aufgegeben. Mit Hilfe der 2-Å-Synthese konnten wir die räumlichen Koordinaten für etwa 75 % der Atome mit Sicherheit festlegen. Infolge

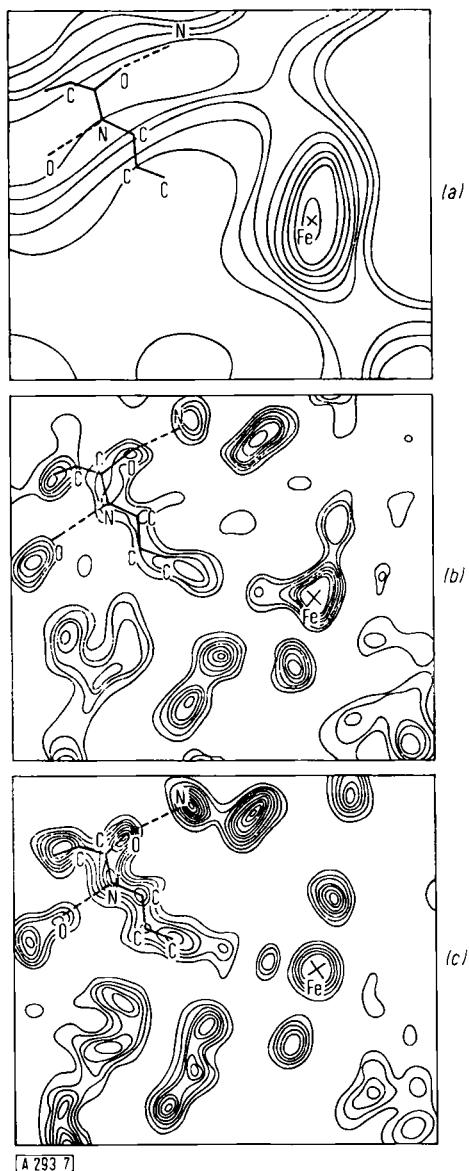


Abb. 7. Schnitt durch das Myoglobin-Molekül

- a) bei 6 Å Auflösung (Phasen durch isomorphen Ersatz bestimmt)
- b) bei 2 Å Auflösung (Phasen durch isomorphen Ersatz bestimmt)
- c) bei 1,4 Å Auflösung (Phasen aus den lokalisierten Atomen berechnet)

Oben links: Längsschnitt durch eine Helix; rechts Mitte: Häm-Gruppe von der Seite. Die durch Buchstaben angedeuteten Atome sind Teil des von der Häm-Gruppe gebundenen Histidin-Moleküls. Bemerkenswert ist, daß einige benachbarte Atome bei 1,4 Å bereits aufgelöst sind.

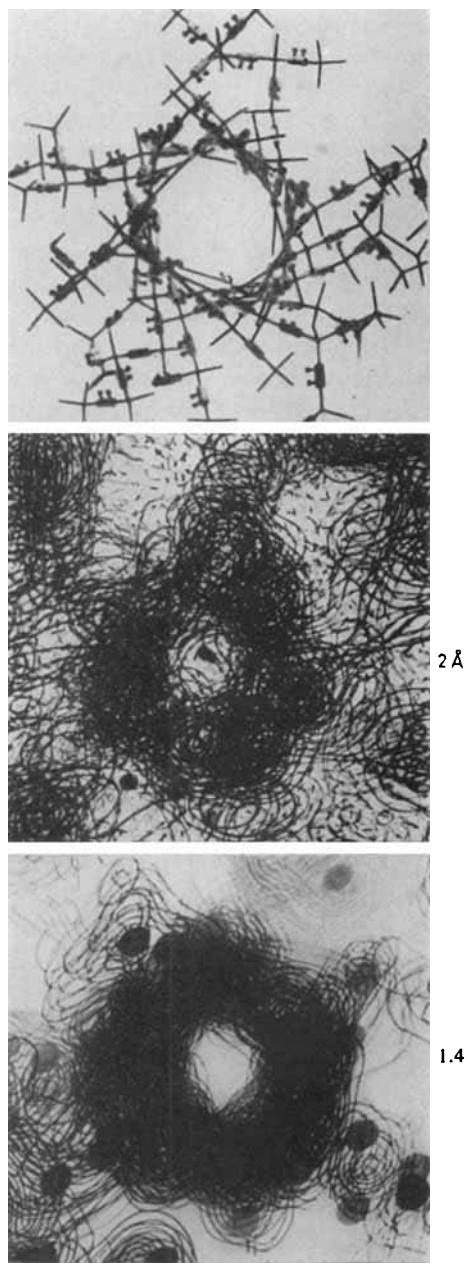


Abb. 8. Blick auf eine Helix bei 2 Å und 1,4 Å Auflösung.
Oben: eine Modell-Helix zum Vergleich.

der begrenzten Auflösung dieser Synthese war die Genauigkeit, mit der die Atome lokalisiert werden konnten, ein gut Teil geringer als erwünscht, aber diese Ungenauigkeit wurde ausgeglichen durch die Zahl der so festgelegten Atome, die im Verhältnis zur Größe des Moleküls wesentlich höher war, als es im allgemeinen für den Erfolg der Methode der successiven Verfeinerung erforderlich ist.

Diese Methode besteht darin, daß man die Phasen aller Reflexe aus den Koordinaten der Atome, die lokalisiert werden konnten, ermittelt. Dann wird eine Fourier-

Synthese gerechnet, wobei man beobachtete Strukturamplituden und berechnete Phasen benutzt. Diese Synthese zeigt notwendigerweise alle Atome, die zur Berechnung der Phasen benutzt wurden, außerdem aber zusätzliche Atome in Umrissen von geringerer Elektronendichte. Sie lässt darüber hinaus Fehler in den Koordinaten der vorläufig festgelegten Atome erkennen. Unter Verwendung der zuerst festgelegten Atome mit ihren korrigierten Koordinaten und derjenigen Atome, die im ersten Cyclus zusätzlich aufgetreten sind, rechnet man nun den nächsten Verfeinerungscyclus. Nach eini-

zusätzlich zu den oben erwähnten tryptischen Peptiden charakterisiert. Nimmt man die röntgenographischen und chemischen Ergebnisse zusammen, so sind zur Zeit etwa 120 Aminosäurereste mit nahezu völliger Sicherheit, und viele der restlichen 30 mit hoher Wahrscheinlichkeit bekannt. Zweifellos wird es bald gelingen, die noch verbliebenen Unklarheiten zu lösen und die Lage aller Atome recht genau zu bestimmen; eine Ausnahme machen einige lange Seitenketten (z. B. die des Lysins), die anscheinend beweglich sind und im Kristall keine festen Lagen einnehmen.

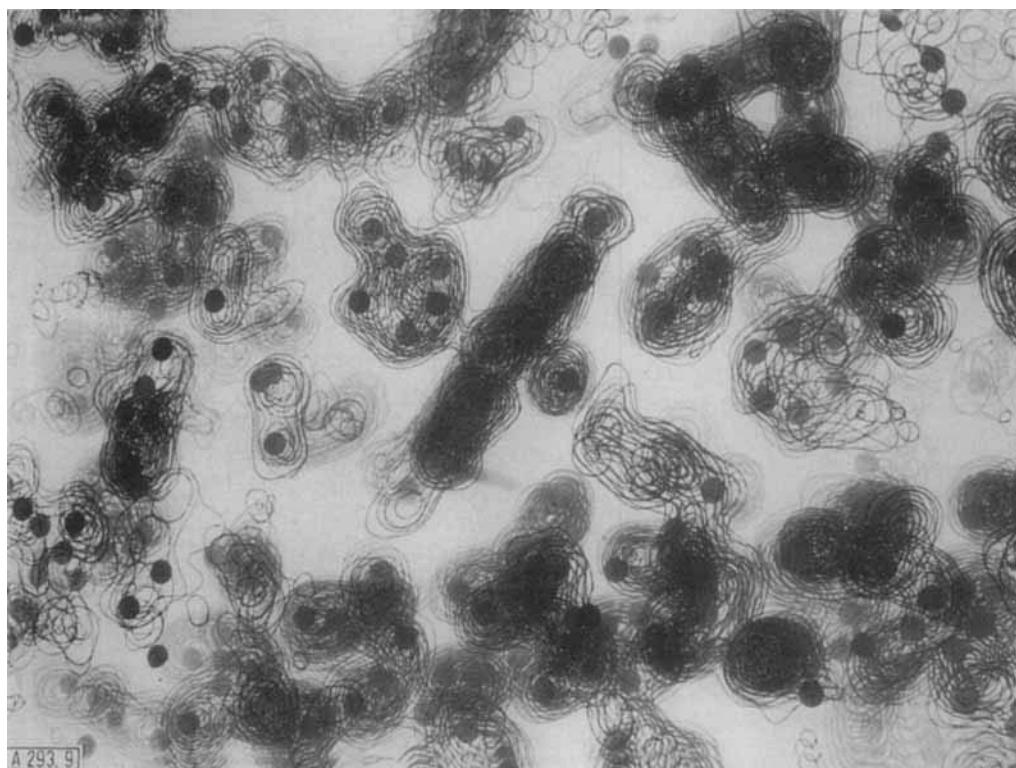


Abb. 9. Teil der 1,4-Å-Fourier-Synthese.

Mitte: die Häm-Gruppe von der Seite gesehen mit Histidin. Am Eisen-Atom ist rechts ein Wassermolekül gebunden.

Oben rechts: Blick auf das Ende einer Helix. Unten: Helix von der Seite gesehen mit einigen Seitenketten.

gen Cyclen sollten die Fourier-Synthesen eine genaue Darstellung der gesamten Struktur geben. Wir haben jetzt zwei Cyclen gerechnet. Der erste enthielt 825, der zweite 925 Atome (Myoglobin besitzt 1260 Atome, Wasserstoff ausgenommen; dazu kommen ca. 400 Atome an Flüssigkeit und Salzlösung, die zum Teil an bestimmte Stellen der Oberfläche des Moleküls gebunden sind). Einer oder zwei weitere Cyclen werden wahrscheinlich noch nötig sein, doch inzwischen ist die 1,4-Å-Fourier-Synthese, die sich auf dem zweiten Cyclus aufbaut, schon wesentlich stärker aufgelöst als die 2-Å-Synthese. In vielen Fällen sind benachbarte, kovalent gebundene Atome gerade zu unterscheiden, der Untergrund zwischen den einzelnen Atomgruppen ist wesentlich sauberer und schließlich sind viele Störungen im Bereich des schweren Atoms verschwunden. Die Abb. 7 bis 9 geben einen Eindruck von dieser Synthese.

Inzwischen hat Dr. *Edmundson* große Fortschritte beim Studium der Aminosäuresequenz gemacht. Insbesondere hat er eine große Zahl chymotryptischer Peptide

Das allgemeine Bild der Struktur

Wie ist das Molekül beschaffen, das sich aus den aufeinanderfolgenden Fourier-Synthesen mit zunehmender Klarheit ergeben hat? Etwa 118 der insgesamt 151 Aminosäurereste bilden acht als rechtsgängige α -Helices ausgebildete Abschnitte, deren Länge zwischen 7 und 24 Resten variiert. Diese Abschnitte sind durch zwei stark gebogene Zwischenstücke (deren Reste einer oder der anderen Helix angehören) sowie durch fünf nicht-helixartige Abschnitte aus einem bis acht Resten zusammengefügt. Am Carboxyende der Kette tritt ferner ein nicht-helixartiger Abschnitt von fünf Aminosäuren auf. Das Ganze ist in einer komplizierten und unsymmetrischen Weise gefaltet und bildet ein abgeflachtes, ungefähr dreieckiges, $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}^3$ großes Prisma. Die ganze Struktur ist äußerst kompakt. Innerhalb des Moleküls befindet sich kein Wasser, wahrscheinlich mit Ausnahme einer sehr kleinen Zahl (weniger als fünf) einzelner

Wassermoleküle, die vermutlich bei der Faltung des Moleküls eingeschlossen werden. Durch das Molekül führen keine Kanäle, und der freie Raum im Inneren ist sehr gering. Die Häm-Gruppe steht nahezu senkrecht zur Oberfläche des Moleküls; diejenige Kante, welche die polaren Propionsäure-Reste enthält, liegt an der Oberfläche, der Rest ist tief im Molekül vergraben.

Fast alle Aminosäure-Seitenketten, die polare Gruppen enthalten, befinden sich auf der Oberfläche. Dies gilt mit wenigen Ausnahmen für alle Lysin-, Arginin-, Glutaminsäure-, Asparaginsäure-, Histidin-, Threonin-, Serin-, Tyrosin- und Tryptophan-Reste. Die seltenen Ausnahmen scheinen spezielle Funktionen innerhalb des Moleküls zu erfüllen, wie etwa das ans Häm gebundene Histidin. Das Innere des Moleküls besteht dagegen nahezu völlig aus nicht-polaren Resten, die meist dicht gepackt sind und in van der Waalsschen Bindungen zu ihren Nachbarn stehen.

Durch welche Kräfte wird diese Struktur aufrecht erhalten? Die Zahl der Berührungs punkte zwischen benachbarten Gruppen im Molekül ist sehr groß, und um diese zu untersuchen, mußten wir mit einem Rechenautomaten alle interatomaren Abstände ermitteln und prüfen, welche innerhalb der Grenzen liegen, die den verschiedenen Bindungstypen entsprechen. Die Ergebnisse sind noch nicht im einzelnen ausgewertet worden, aber es ist sicher, daß von der Waalssche Kräfte zwischen nicht-polaren Resten bei weitem den größten Beitrag liefern [8]. Es gibt zwar auch einige Ladungsübergänge und Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten polaren Resten auf der Oberfläche des Moleküls, aber man gewinnt den Eindruck, daß diese meist sozusagen zufällig sind. Eine polare Gruppe auf der Oberfläche ist mit einem Wassermolekül oder einem Ion der umgebenden Flüssigkeit durchaus zufrieden und geht eine Bindung mit einer benachbarten Seitenkette nur dann ein, wenn dies ohne große Auslenkung aus der normalen Lage möglich ist. Diese Feststellung sollte vielleicht mit der Bemerkung eingeschränkt werden, daß auf der letzten Windung der Helix-Abschnitte polare Wechselwirkungen zwischen Seitenketten (z. B. von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Threonin) und freien Aminogruppen auftreten. Möglicherweise haben sie einige Bedeutung für die Bestimmung des Punktes, an dem die Helix abbricht und in einen ungeordneten Abschnitt der Kette übergeht. Träfe das zu, so könnten diese Wechselwirkungen die dreidimensionale Struktur der Proteine festlegen, und ihre Kenntnis wäre für die Voraussage einer Struktur aus der Aminosäuresequenz von Nutzen.

Die Wechselwirkungen der Häm-Gruppe bedürfen besonderer Betrachtung, denn sie sind für die Funktion des Myoglobins verantwortlich; eine isolierte Häm-Gruppe läßt sich nicht reversibel oxygenieren. Im Augenblick können wir diese Wechselwirkungen nur aufzählen; die Aufgabe, mit ihrer Hilfe die reversible Oxygenierung zu erklären, ist noch ungelöst. Wie erwähnt, ist die fünfte Koordinationsstelle des Eisenatoms vom Ringstickstoff eines Histidin-Restes, des häm-gebunde-

nen Histidins, besetzt. Auf der gegenüberliegenden Seite des Eisenatoms belegt ein Wassermolekül die 6. Koordinationsstelle, wie das im Ferrimyoglobin, der zur Röntgenuntersuchung verwendeten Form, zu erwarten war. Jenseits des Wassermoleküls befindet sich in einer für die Bildung von Wasserstoffbrücken passenden Entfernung ein zweiter Histidin-Rest. Es ist bemerkenswert, daß die gleiche Anordnung von zwei Histidin-Resten auch im Hämoglobin auftritt. Im übrigen ist die Umgebung der Häm-Gruppe völlig unpolar; sie wird durch zahlreiche van der Waalssche Kräfte in ihrer Lage gehalten. Im Hämoglobin scheint die Umgebung der Häm-Gruppe ähnlich zu sein. Bei beiden Proteinen warten noch viele Erkenntnisse auf ihre Entdeckung, denn wir können hoffen, daß sich die sehr ausführlichen Untersuchungen des letzten halben Jahrhunderts über die Oxygenierungsreaktion bald strukturell interpretieren lassen.

Einige Folgerungen

Die Oxygenierungsreaktionen des Myoglobins und des Hämoglobins sind interessant und bedeutend genug, um die Untersuchung dieser beiden Proteine zu rechtfertigen, wenngleich wir unsere Wahl – wie schon gesagt – ursprünglich aus anderen Gründen trafen. Es gibt viele Proteine, deren Funktionen genauso bedeutend oder noch wichtiger sind. Jedes Enzym – man kennt heute mehrere hundert – erfüllt eine eigene Aufgabe, die für einen Prozeß in der Zelle lebenswichtig ist. Viele Enzyme werden zur Zeit mit Röntgenstrahlen untersucht, und in einigen Fällen steht die Analyse kurz vor dem Erfolg. Stets wird die Kenntnis der Struktur und des Molekülbauens der aktiven Zentren einen Einblick in wesentliche biologische Prozesse geben.

Wir können aber auch fragen, welche Merkmale allen Proteinen gemeinsam sind, und in diesem Sinne das Myoglobin als typischen Vertreter dieser riesigen Verbindungsklasse nehmen. Wahrscheinlich ist auf die Proteine mehr experimentelle Arbeit verwendet worden als auf jede andere Verbindungsart. Dadurch ist eine große Zahl von Erkenntnissen gewonnen worden. Viele Verallgemeinerungen wurden möglich, aber sie blieben begrenzt, da es kein präzises Molekülmodell gab, auf das man sich beziehen konnte. Schon das Vorhandensein eines solchen Modells nur für ein Protein ermöglicht es, die Verallgemeinerungen des Chemikers zu prüfen und zu präzisieren. Das Pottwal-Myoglobin ist in dieser Hinsicht bereits in mehreren Laboratorien untersucht worden. Man hat, um nur einige Beispiele zu nennen, den Zusammenhang zwischen optischer Drehung und Helix-Anteil studiert, das Titrationsverhalten, seine Fähigkeit, Metalle zu binden, den Einfluß chemischer Veränderungen in den Seitenketten und sein hydrodynamisches Verhalten. Diese Studien dienen der Vertiefung unseres Wissens vom Verhalten der Proteine und von den Eigenschaften, die sie befähigen, eine so zentrale Rolle im lebenden Organismus zu spielen.

Die Genetiker glauben heute – obwohl es dafür noch keinen ganz festen Beweis gibt –, daß die Erbmasse nur

[8] J. C. Kendrew, Brookhaven Symposia in Biology 15 (1962), im Druck.

die Aminosäuresequenz eines Proteins bestimmt, nicht aber seine dreidimensionale Struktur. Das würde bedeuten, daß eine Polypeptidkette, wenn sie einmal synthetisiert worden ist, fähig sein müßte, sich selbst zusammenzufalten, ohne mit einer zusätzlichen Information versehen zu sein. Tatsächlich konnte *Anfinsen* vor kurzem diese Fähigkeit *in vitro* für ein Protein, die Ribonuclease, nachweisen. Wenn diese Annahme richtig ist, so müßte man die dreidimensionale Struktur eines Proteins allein aus seiner Aminosäuresequenz bestimmen können. Es sollte also schließlich nur noch nötig sein, die Aminosäuresequenz zu ermitteln, um die dreidimensionale Struktur vorauszusagen. Meiner Meinung nach wird dieser Tag noch nicht so bald kommen, aber wenn er kommt, können die Röntgenkristallographen aus dem Geschäft aussteigen, vielleicht mit einem Gefühl der Erleichterung. Es wäre dann auch möglich, die Strukturen vieler Proteine zu diskutieren, die sich nicht kristallisieren lassen und daher außerhalb der Reichweite der Kristallographen liegen.

Wir haben vom Standpunkt des Kristallographen einen ersten Blick auf die Struktur des Myoglobins geworfen und müssen bekennen, daß die Schwierigkeiten groß sind. Die Struktur ist höchst unregelmäßig; die sieben Verbindungsstücke zwischen den Helix-Abschnitten sind verschieden, so daß eine Verallgemeinerung unmöglich ist. Die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten sind zahlreich und von verschiedener Art, und es ist nicht leicht zu sehen, welche für die Struktur entscheidend sind. Das Myoglobin ist zwar sehr kompliziert gebaut, es ist aber wahrscheinlich einfacher als die meisten anderen Proteine: nicht nur wegen seines niedrigen Molekulargewichtes, sondern auch infolge seines hohen Helix-Gehaltes. Wir können heute nicht einmal eine Vermutung wagen, warum der Helix-Gehalt so hoch ist, von einer detaillierten Voraussage der Struktur ganz zu schweigen.

Eine große Hilfe bei der Lösung dieser Probleme könnte ein Vergleich des Myoglobins mit den Untereinheiten des Hämoglobins bringen. Beide sind nach den Untersuchungen von *Perutz* trotz bedeutender Unterschiede in der Aminosäuresequenz einander sehr ähnlich. Legt man das Myoglobin und die α - und β -Ketten des Hämoglobins nebeneinander und macht einige plausible Annahmen, um die (verhältnismäßig geringen) Abweichungen in der Länge zu erklären, so findet man Übereinstimmungen, d. h. Punkte, an denen die gleiche Aminosäure in allen drei Ketten in der gleichen Stellung auftritt [9]. Die Zahl dieser Übereinstimmungen ist überra-

schend klein, aber vermutlich sind sie dafür verantwortlich, daß alle drei Ketten die gleiche dreidimensionale Anordnung besitzen (einige Übereinstimmungen entstanden möglicherweise zufällig im Lauf der Evolution). Wir werden diese Übereinstimmungen bald auch an Proteinen anderer Species prüfen – an menschlichem Myoglobin, menschlichem (auch embryonalem) Hämoglobin, an Hämoglobin von Pferden und Kaninchen und an den anomalen Hämoglobinen, deren Fehler in der Aminosäuresequenz für so viele Erbkrankheiten des Blutes verantwortlich sind.

Wir, d. h. *Perutz* und ich mit unseren Mitarbeitern, haben beim Studium dieser Übereinstimmungen schon viele interessante Tatsachen entdeckt. Doch stecken unsere Untersuchungen selbst auf diesem begrenzten Gebiet noch in den Anfängen. Auf jeden Fall werden Myoglobin und Hämoglobin allein nur begrenzte Verallgemeinerungen zulassen. Die Strukturen einiger anderer Proteine werden bald bekannt sein; aber aus dem hier Gesagten sollte deutlich geworden sein, daß wir dringend die Strukturen vieler anderer Proteine kennen lernen müssen, denn in den Proteinen vereinigen sich sehr unterschiedliche Funktionen und komplizierte Strukturen mit einer relativ einfachen und einheitlichen chemischen Zusammensetzung. Die Bestimmung der Struktur von zwei Proteinen ist ein Anfang, nicht das Ende. Wir haben die Küste eines riesigen Kontinents gesichtet, der auf seine Entdeckung wartet.

Das Werk, das hier beschrieben wurde, ist von vielen Händen getan worden und die Liste derer, die dazu beigetragen haben, wäre lang. Sie kamen aus vielen Ländern und aus vielen Fachrichtungen und ihre Beiträge, die in der Summe entscheidend waren, lassen sich nicht im einzelnen abschätzen. Sie waren von so unterschiedlicher Bedeutung, daß jede Liste ungerecht und unvollständig wäre. Nichtsdestoweniger möchte ich die Namen einiger Kollegen nennen, deren Ideen und deren Mitarbeit besonders wichtig und manchmal wesentlich waren: J. M. Bennett, C. Blake, Joan Blows, M. M. Bluhm, G. Bodo, Sir Lawrence Bragg, C. I. Branden, D. A. G. Broad, C. L. Coulter, Ann Cullis, D. R. Davies, R. E. Dickerson, H. M. Dintzis, A. B. Edmundson, R. G. Hart, Ann Hartley, W. Hoppe, V. M. Ingram, L. H. Jensen, J. Kraut, R. G. Parrish, P. Pauling, M. F. Perutz, D. C. Phillips, Mary Pinkerton, Eva Rowlands, Helen Scouloudi, Violet Shore, B. Strandberg, I. F. Trotter, H. C. Watson, Joyce Wheeler, Ann Woodbridge, H. W. Wyckoff und die Mitarbeiter des Mathematischen Instituts, Cambridge.

[9] H. C. Watson u. J. C. Kendrew, *Nature (London)* 190, 670 (1961).