

## Die Quartärstruktur der Proteine

VON PRIV.-DOZ. DR. H. SUND<sup>[1a]</sup> UND DR. K. WEBER<sup>[1b]</sup>

CHEMISCHES LABORATORIUM DER UNIVERSITÄT FREIBURG

*Zahlreiche Proteinmoleküle, insbesondere solche mit hohem Molekulargewicht, bestehen nicht aus einer einzigen Polypeptidkette, sondern stellen einen definierten Komplex aus mehreren Polypeptidketten dar. Dieses Bauprinzip bezeichnet man als Quartärstruktur. Die Quartärstruktur eines Proteinmoleküls kann reversibel aufgehoben werden. Einige Stoffwechselphänomene lassen sich mit Hilfe der Quartärstruktur auf molekularer Basis erklären.*

### I. Einleitung<sup>[2]</sup>

In den letzten Jahren sind wesentliche Fortschritte in der Aufklärung der Struktur von Proteinen erzielt worden. Einer dieser Fortschritte besteht in der Erkenntnis, daß Proteinmoleküle in sehr vielen Fällen nicht aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Unter physiologischen Bedingungen verhalten sich diese Proteine zwar molekulareinheitlich und besitzen ein definiertes Molekulargewicht, sie stellen aber einen Komplex aus mehreren Polypeptidketten dar, die nicht durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind<sup>[3]</sup>. In Weiterführung der Terminologie von *Linderström-Lang*<sup>[4]</sup> wurde 1958 von *Bernal* für dieses Phänomen der Begriff Quartärstruktur eingeführt<sup>[5]</sup>.

#### 1. Die Terminologie nach Linderström-Lang<sup>[4]</sup>

Für die Beschreibung einzelner Aspekte der Gesamtstruktur eines Proteinmoleküls führte *Linderström-Lang* die Begriffe Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur ein (vgl. Abb. 1a–1c). Unter Primärstruktur versteht man die Zahl und die Sequenz der durch Peptidbindungen miteinander

verknüpften Aminosäurereste einer Polypeptidkette. Sekundärstrukturen (Helix- und Faltblattanordnung) kommen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen zustande. Mit Tertiärstruktur bezeichnet man die räumliche Anordnung, die durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäurereste hervorgerufen wird. Unter Quartärstruktur versteht man den Aufbau eines Proteinmoleküls aus einer definierten Zahl von Polypeptidketten (Abb. 1d)<sup>[6]</sup>.

#### 2. Polypeptidketten und Untereinheiten<sup>[3]</sup>

Ein Proteinmolekül, das aus mehr als zwei Polypeptidketten besteht, kann stufenweise in die Polypeptidketten dissoziieren. Ein Dissoziationsprodukt, das noch wenigstens zwei Polypeptidketten enthält, wollen wir als Untereinheit bezeichnen. Die Polypeptidketten dagegen bestehen ausschließlich aus Aminosäureresten, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Es gibt daher drei Wege, auf denen ein aus mehreren Polypeptidketten bestehendes Proteinmolekül dissoziieren kann:

(1a) Proteinmolekül  $\rightleftharpoons$  a Polypeptidketten

(1b) Proteinmolekül  $\rightleftharpoons$  a Untereinheiten  $\rightleftharpoons$  x a Polypeptidketten

(1c) Proteinmolekül  $\rightleftharpoons$  a Untereinheiten + b Polypeptidketten  
a Untereinheiten  $\rightleftharpoons$  x a Polypeptidketten

[1a] Erweiterte Fassung von Vorträgen 1964 in Frankfurt-Hoechst, Freiburg, Heidelberg, Kiel, Mannheim, Schloß Schaumburg, Tutzing und Wuppertal-Elberfeld.

[1b] Derzeitige Anschrift: Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA.

[2] Zur historischen Entwicklung der Anschauungen über den Aufbau von Proteinen, über deren Größe und Einheitlichkeit siehe *J. T. Edsall*, Arch. Biochem. Biophysics Suppl. 1, 12 (1962).

[3] Proteinmoleküle, Untereinheiten und Polypeptidketten [vgl. Gl. (1a)–(1c)] besitzen unter definierten Bedingungen ein durch

physikalisch-chemische Methoden zu messendes charakteristisches Teilchengewicht. Dieses soll als Molekulargewicht des Proteinteilchens bezeichnet werden.

[4] *K. U. Linderström-Lang* u. *J. A. Schellman* in *P. D. Boyer, H. Lardy* u. *K. Myrbäck*: The Enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York 1959, Bd. 1, S. 443.

[5] *J. D. Bernal*, Discuss. Faraday Soc. 25, 7 (1958).

[6] Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur sind Ausdruck der Konformation des Proteinmoleküls. *Wetlaufer* [7] hat vorge-

Die Polypeptidketten eines Proteinmoleküls können gleichartig<sup>[11a]</sup> (homogener Typ der Quartärstruktur) oder nicht gleichartig (heterogener Typ) sein.

## II. Stabilisierung der Proteinstruktur

### 1. Bindungsarten

Für die Stabilisierung der nativen Konformation von Proteinmolekülen sind kovalente Bindungen und Nebenvaleanzbindungen verantwortlich. Sie vermindern die Flexibilität der Polypeptidketten und bewirken, daß diese in geordneter, kompakter Form und nicht als statistisches Knäuel (random coil) vorliegen<sup>[12]</sup>. Unter den kovalenten Bindungen scheinen allein die Disulfidbindungen von allgemeiner Bedeutung zu sein. Durch diese können, wie bei der Ribonuclease, in der Sequenz voneinander entfernte Bereiche einer Polypeptidkette<sup>[13,14]</sup> oder wie beim Insulin<sup>[15]</sup> und  $\gamma$ -Globulin (vgl. Abschnitt IV, 3) mehrere Polypeptidketten verknüpft werden. Eindeutige Beweise für kovalente Verknüpfungen durch Peptidbindungen zwischen verschiedenen Polypeptidketten oder -kettenteilen (z.B. zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins und der  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure) stehen noch aus. Ester- oder Phosphoresterbindungen sowie Verknüpfungen durch Kohlenhydrate oder andere Komponenten sind wahrscheinlich nur Besonderheiten einiger weniger Proteine.

Als nicht-kovalente Bindungen (Nebenvaleanzbindungen) kommen in Frage: die Wasserstoffbrücke, die hydrophobe Bindung sowie die ionische Bindung<sup>[16]</sup> (Abb. 2). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bindungsenergie einer Wasserstoffbrücke zwischen Carbonyl-O und Amid-N in wäßriger Lösung höchstens 1,5 kcal/Mol beträgt<sup>[17,18]</sup> und damit erheblich kleiner ist als der früher angenommene Wert von etwa 8 kcal/Mol<sup>[19]</sup>. Sie kann aber in einem apolaren

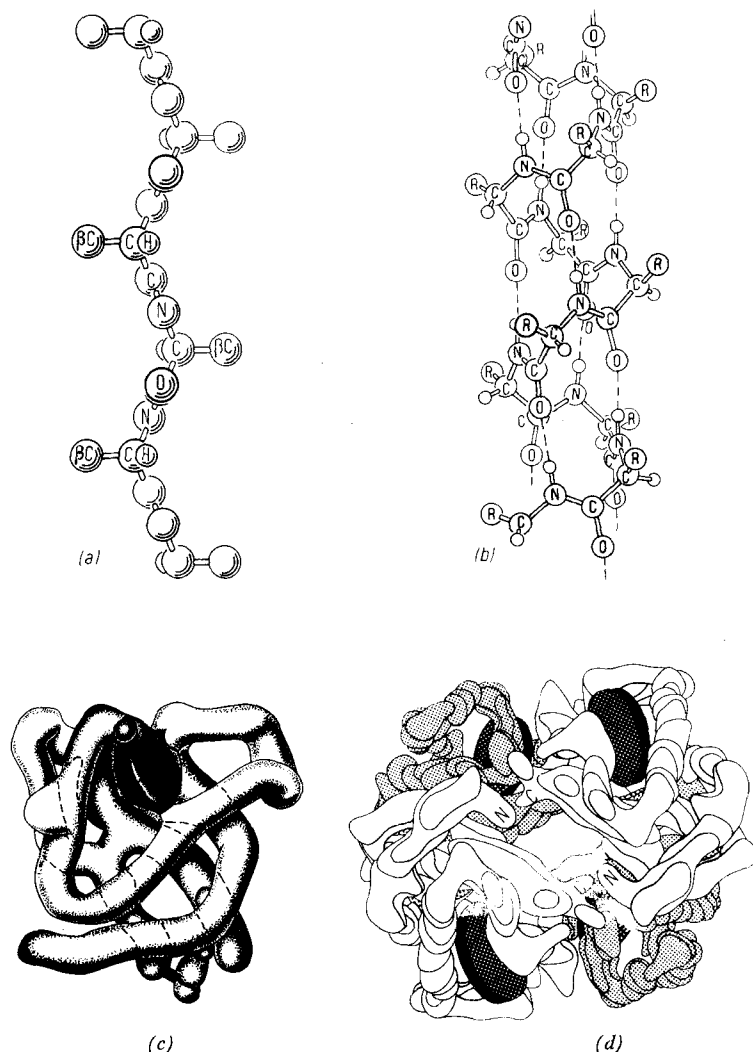


Abb. 1. Die Strukturprinzipien der Proteine (nach Bernal [5])

(a) Primärstruktur (Polypeptidkette nach [9])

(b) Sekundärstruktur (Beispiel:  $\alpha$ -Helix nach Pauling u. Corey [9])

(c) Tertiärstruktur (Beispiel: Myoglobin nach Kendrew [10])

(d) Quartärstruktur (Beispiel: Hämoglobin nach Perutz [11]). Weiß:  $\alpha$ -Polypeptidketten; grau:  $\beta$ -Polypeptidketten; schwarze Scheiben: Hämgruppen; C und N: C- und N-terminale Aminosäurereste der Polypeptidketten.)

schlagen, die räumliche Anordnung der Polypeptidketten und Seitenketten der Aminosäurereste als Kettenkonformation (chain conformation) zu bezeichnen. Dieser Vorschlag hat sich jedoch nicht durchsetzen können. Da im allgemeinen unter Quartärstruktur die oben gegebene Definition verstanden wird und für die verschiedenen Nomenklaturvorschläge<sup>[4,5,7,8]</sup> stets ein Für und Wider anzuführen ist, soll in dem vorliegenden Übersichtsreferat diese Bezeichnung beibehalten werden.

[7] D. B. Wetlaufer, Nature (London) 190, 1113 (1961).

[8] J. P. Changeux, A. Ullmann u. J. Monod, zitiert in A. Ullmann, P. R. Vagelos u. J. Monod, Biochem. biophys. Res. Commun. 17, 86 (1964); J. P. Changeux, Brookhaven Symposia Biol. 17, 182 (1964).

[9] L. Pauling u. R. B. Corey, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 11, 180 (1954); L. Pauling: Die Natur der chemischen Bindung. 2. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim 1964, S. 459 ff.

[10] J. C. Kendrew, Angew. Chem. 75, 595 (1963).

[11] M. F. Perutz, Angew. Chem. 75, 589 (1963); Sci. American 211, Nr. 5, S. 64 (1964).

[11a] Unter gleichartigen Polypeptidketten verstehen wir Polypeptidketten mit identischer Primärstruktur.

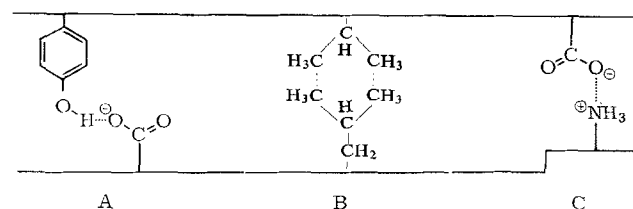


Abb. 2. Beispiele für Nebenvaleanzbindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäurereste, die die Konformation eines Protein-Moleküls stabilisieren (vgl. auch [16]).

A: Wasserstoffbrücke; B: Hydrophobe Bindung; C: Ionische Bindung.

[12] W. Kauzmann, Advances Protein Chem. 14, 1 (1959).

[13] D. H. Spackman, W. H. Stein u. S. Moore, J. biol. Chemistry 235, 648 (1960).

[14] R. E. Canfield u. C. B. Anfinsen in H. Neurath: The Proteins. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1963, Bd. 1, S. 311.

[15] F. Sanger in D. E. Green: Currents in Biochemical Research 1956. Interscience, New York, London 1956, S. 434.

[16] H. A. Scheraga in H. Neurath: The Proteins. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1963, Bd. 1, S. 477.

[16a] W. Luck, Fortschr. chem. Forsch. 4, 653 (1964).

[17] J. A. Schellman, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 29, 223 (1955).

[18] I. M. Klotz u. J. S. Franzen, J. Amer. chem. Soc. 84, 3461 (1962).

[19] L. Pauling, R. B. Corey u. H. R. Branson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 205 (1951).

(hydrophoben) Medium wesentlich höher sein<sup>[16]</sup>. Neben den Peptidwasserstoffbrücken treten Wasserstoffbrücken zwischen Donatoren und Acceptoren der Aminosäure-Seitenketten (z. B. zwischen der OH-Gruppe eines Tyrosylrestes und einer Carboxylatgruppe) auf. Heute wird die hydrophobe Bindung häufig als der wichtigste Beitrag zur Stabilisierung der Proteinstruktur angesehen. Bei den meisten Proteinen haben etwa 40 % der Aminosäurereste apolare Seitenketten. Nach *Kauzmann*<sup>[12]</sup> sind Proteinkonformationen besonders stabil, die möglichst viele apolare Gruppen in gegenseitigen „Kontakt“ bringen und der wäßrigen Phase entziehen. Dadurch bilden sich „hydrophobe Micellen“ im Proteinmolekül. Nach *Némethy* und *Scheraga*<sup>[16]</sup> ist die hydrophobe Bindung nicht allein durch van-der-Waalsche Kräfte zwischen den apolaren Gruppen, sondern wesentlich durch die physikalischen Eigenschaften des flüssigen Wassers und seiner Tendenz zur Bildung wasserstoffverbrückter Schwärme (Cluster) bedingt (vgl. auch<sup>[16a]</sup>).

Ionische Gruppen im Proteinmolekül können durch Coulombsche Kräfte ebenfalls stabilisierend wirken. Solche Ionenbindungen sollten wie Wasserstoffbrücken in apolaren Medien stärker sein als in polaren.

Zu erwähnen sind ferner die Stabilisierung der nativen Konformation durch Metallionen und prosthetische Gruppen sowie durch die Bindung von Coenzym und Substrat.

## 2. Denaturierung

Eine Veränderung der nativen Struktur eines Proteinmoleküls bezeichnen wir im folgenden als Denaturierung. Sie ist im allgemeinen mit einer Änderung der optischen Eigenschaften und einem Verlust der biologischen Aktivität verbunden. Auch ist die ungewöhnliche Reaktionsfähigkeit von funktionellen Gruppen des nativen Proteinmoleküls oftmals nach Denaturierung nicht mehr zu beobachten. Globuläre Proteinmoleküle gehen bei der Denaturierung in eine weniger kompakte Form über und können bei genügend tiefgreifenden Veränderungen durch das Modell eines statistischen Knäuels beschrieben werden. In manchen Fällen wird auch die Löslichkeit des Proteins durch Denaturierung stark verändert.

Eine Denaturierung läßt sich meist durch Veränderung des Lösungsmittels (Zusatz von organischen Lösungsmitteln, Salzen, Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid), des pH-Wertes (saure oder alkalische pH-Werte), Zusatz von Detergentien, Schwermetallionen oder Komplexbildnern sowie durch Veränderung der Temperatur erreichen. Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Veränderung des Proteinmoleküls durch oxidative oder reduktive Spaltung von Disulfidgruppen, durch Oxidation von Thiolgruppen zu Sulfonsäuregruppen sowie durch Substitution funktioneller Gruppen.

Frühere Versuche, denaturierte Proteine wieder in den biologisch aktiven Zustand zu überführen, schlugen meist fehl. Es gab nur wenige erfolgreiche Renaturie-

rungen<sup>[20]</sup>, so daß die Denaturierung im allgemeinen als irreversibel galt und die denaturierte Form gegenüber der nativen Struktur als besonders stabil angesehen wurde. Heute hat man diese Vorstellung insbesondere auf Grund zahlreicher erfolgreicher Reaktivierungen und der Kenntnisse über die Proteinbiosynthese verlassen. Die native Konformation eines Proteinmoleküls wird heute vielfach allein als die Folge der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette und des sie umgebenden Milieus betrachtet (vgl. auch Abschnitt V).

Beim Renaturierungsprozeß muß eine erhebliche Konformationsentropie überwunden werden, was zu einem Anstieg der freien Energie der nativen Konformation führt. Wenn die native Konformation dennoch gegenüber dem statistischen Knäuel begünstigt ist, so muß durch die Bildung von Wasserstoffbrücken, hydrophoben und ionischen Bindungen ein erheblicher negativer Beitrag zur freien Energie geleistet werden, damit die Reaktion möglich wird. Die gesamte Änderung der freien Energie bei der Bildung der nativen, kompakten Struktur aus dem statistischen Knäuel sollte dann ein kleiner, aber negativer Wert sein. Die wenigen bekannten thermodynamischen Messungen stützen diese Vorstellung<sup>[20]</sup>. Auf erste Versuche, die Stabilisierung der nativen Struktur durch Nebenvalenzbindungen abzuschätzen, kann hier nur hingewiesen werden<sup>[16, 21, 22]</sup>.

## III. Nachweis der Quartärstruktur

Für die Untersuchung der Quartärstruktur stehen folgende Methoden zur Verfügung<sup>[23]</sup>:

1. Die Röntgenstrukturanalyse gestattet schon bei relativ geringer Auflösung eine Differenzierung der einzelnen Untereinheiten oder Polypeptidketten und läßt ihre räumliche Anordnung erkennen.
2. Elektronenmikroskopisch, besonders mit der Technik des negative staining, läßt sich die Anordnung der Untereinheiten direkt sichtbar machen.
3. Die „klassische“ Methode der Proteinchemie ist die Endgruppenanalyse. Hier wird mit spezifischen Reagentien oder durch enzymatische Hydrolyse der N-terminale oder C-terminale Aminosäurerest jeder Polypeptidkette bestimmt.
4. Bei der „Fingerprint“-Analyse wird das Protein mit Trypsin gespalten und das entstandene Peptidgemisch chromatographisch und elektrophoretisch getrennt. Aus dem Lysin- und Arginingehalt des Proteins und der Zahl der Peptide läßt sich das Äquivalentgewicht der Polypeptidkette bestimmen. Statt des enzymatischen Abbaus kann auch die chemische Umsetzung mit BrCN dienen, bei der die Polypeptidketten am Methionin gespalten werden<sup>[24]</sup>.
5. Bei der Denaturierung dissoziiert ein aus mehreren Polypeptidketten bestehendes Proteinmolekül häufig in seine Untereinheiten oder Polypeptidketten. Dadurch wird das Problem der Bestimmung der Zahl der Untereinheiten bzw. Polypeptidketten auf eine Molekulargewichtsbestimmung reduziert. Die meisten Untersuchungen werden heute mit der von *Svedberg*<sup>[25, 25a]</sup> entwickelten Ultrazentrifuge vorgenom-

[20] Zusammenstellung bei *F. Haurowitz*: The Chemistry and Function of Proteins. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1963.

[21] *C. Tanford*, J. Amer. chem. Soc. 84, 4240 (1962).

[22] *H. K. Schachman*, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 28, 409 (1963).

[23] Beispiele für die angegebenen Methoden finden sich im Teil IV.

[24] *E. Gross* u. *B. Witkop*, J. Amer. chem. Soc. 83, 1510 (1961).

[25] *T. Svedberg* u. *K. O. Pedersen*: Die Ultrazentrifuge. Theodor Steinkopff, Dresden, Leipzig 1940.

[25a] *H. Sund* u. *K. Weber*, Beckman Report 3/4, 7 (1965).

men. Sind die Polypeptidketten nicht gleichartig, so lassen sie sich im denaturierten Zustand durch Elektrophorese, Gegenstromverteilung oder Chromatographie trennen.

6. Besteht wie bei Bakterien die Möglichkeit, ein isotope-markiertes Proteinmolekül zu erhalten, so kann man die Hybridisierungstechnik anwenden: dissoziiert das Proteinmolekül bei der Denaturierung reversibel in seine Untereinheiten, dann lassen sich Hybride zwischen „isotopenschweren“ und „isotopen-leichten“ Molekülen gewinnen, die durch Dichtegradientenzentrifugation zu trennen sind. Aus dem Dichteunterschied zwischen den „schweren“, „leichten“ und „hybriden“ Molekülen erhält man direkt die Zahl der Untereinheiten, die bei der Denaturierung entstehen.

7. Besitzt ein Enzym mehrere aktive Zentren, dann liefert die Bestimmung der Zahl der Substrat-Bindungsstellen einen Beitrag zur Untersuchung der Quartärstruktur.

#### IV. Die Quartärstrukturen verschiedener Proteine

Eine Auswahl der bisher auf ihre Quartärstruktur untersuchten Proteine ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt (zu anderen siehe [25–30]). Einige von ihnen werden in den folgenden Abschnitten ausführlicher besprochen.

[26] D. F. Waugh, *Advances Protein Chem.* 9, 325 (1954).

[27] R. Jaenicke: Der native Zustand und die Phänomene der Dissoziation und Aggregation von Proteinen. Zur Quaternärstruktur globulärer Proteine in Lösung. Habilitationsschrift, Universität Frankfurt/Main 1963.

[28] F. J. Reithel, *Advances Protein Chem.* 18, 123 (1963).

[29] H. Sund in: Mechanismen enzymatischer Reaktionen (14. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie, 25./27. April 1963). Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964, S. 318.

[30] C. W. Cater, W. E. F. Naismith, R. H. K. Thomson u. G. R. Ure, *Nature (London)* 180, 971 (1957); C. M. Kay u. K. Bailey, *Biochim. biophysica Acta* 40, 149 (1960); E. A. Stein u. E. H. Fischer, *Biochim. biophysica Acta* 39, 287 (1960); T. Ooi, K. Mihashi u. H. Kobayashi, *Arch. Biochem. Biophysics* 98, 1 (1962); R. H. Himes u. J. C. Rabinowitz, *J. biol. Chemistry* 237, 2903 (1962); A. M. Crestfield, W. H. Stein u. S. Moore, *Arch. Biochem. Biophysics Suppl.* 1, 217 (1962) u. *J. biol. Chemistry* 238, 2421 (1963); S. Bouchilloux, P. McMahon u. H. S. Mason, *J. biol. Chemistry* 238, 1699 (1963); R. G. Martin, *J. biol. Chemistry* 238, 257 (1963); E. F. Woods, S. Himmelfarb u. W. F. Harrington, *J. biol. Chemistry* 238, 2374 (1963); C. R. Zobel u. F. D. Carlson, *J. molecular Biol.* 7, 78 (1963); S. Lowey, J. Kucera u. A. Holtzer, *J. molecular Biol.* 7, 234 (1963); R. L. Metzenberg, *Biochim. biophysica Acta* 89, 291 (1964); R. F. Chen, D. M. Brown u. G. W. E. Plaut, *Biochemistry* 3, 552 (1964); P. Datta, H. Gest u. H. L. Segal, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 51, 125 (1964); K. Kakiuchi, S. Kato, A. Imanishi u. T. Isemura, *J. Biochemistry (Tokyo)* 55, 102 (1964); L. W. Nichol u. A. B. Roy, *J. Biochemistry (Tokyo)* 55, 643 (1964).

[31] C. R. Harmison, R. H. Laudaburu u. W. H. Seegers, *J. biol. Chemistry* 236, 1693 (1961); E. E. Schrier, C. A. Broomfield u. H. A. Scheraga, *Arch. Biochem. Biophysics Suppl.* 1, 309 (1962); D. J. Winzor u. H. A. Scheraga, *J. physic. Chem.* 68, 338 (1964).

[32] A. Garen u. C. Levinthal, *Biochim. biophysica Acta* 38, 470 (1960); C. Levinthal, E. R. Signer u. K. Fetherolf, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 1230 (1962); F. Rothman u. R. Byrne, *J. molecular Biol.* 6, 330 (1963); M. J. Schlesinger u. C. Levinthal, *J. molecular Biol.* 7, 1 (1963); M. J. Schlesinger, *Brookhaven Symposia in Biology* 17, 66 (1964).

[33] J. A. Winstead u. F. Wold, *Biochemistry* 3, 791 (1964); 4, 2145 (1965).

[34] M. Yamasaki, J. R. Brown, D. J. Cox, R. N. Greenshields, R. D. Wade u. H. Neurath, *Biochemistry* 2, 859 (1963); J. R. Brown, R. N. Greenshields, M. Yamasaki u. H. Neurath, *Biochemistry* 2, 867 (1963).

[35] A. Ramel, E. Stellwagen u. H. K. Schachman, *Federat. Proc.* 20, 387 (1961); A. Ramel, E. A. Barnard u. H. K. Schachman, *Angew. Chem.* 76, 55 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* 2, 745 (1963); U. Kenkare, I. T. Schulze, J. Gazith u. S. P. Colowick, *Abstracts, 6th int. Congress of Biochemistry, New York 1964*, S. 477.

#### 1. Respiratorische Proteine (Erythrocruorine, Hämocyanine, Hämoglobine) [54–63a]

Die respiratorischen Proteine (Erythrocruorine und Hämocyanine) von Invertebraten bilden in Lösung ein pH-abhängiges Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht [25, 54, 54a, 56]. Im assoziierten Zustand kann das Molekulargewicht bis zu mehreren Millionen betragen; für die bei der Dissoziation entstehenden Teilchen wurden Molekulargewichte zwischen 40000 und 400000 gefunden. Wahrscheinlich sind die größeren Dissoziationsprodukte noch nicht die Polypeptidketten. Die geometrische Anordnung der Untereinheiten ergibt sich aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen [55, 56] (Abb. 3).

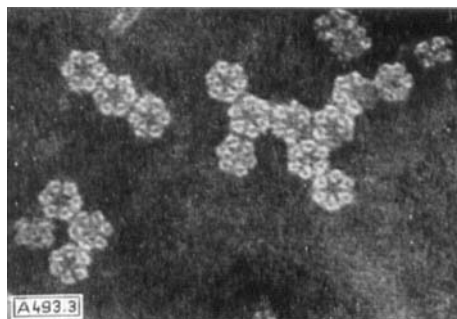


Abb. 3. Erythrocruorin von *Eumienia crassa* (nach Levin [56]).

Die Strukturen der respiratorischen Proteine der Säuger, des Hämoglobins und Myoglobins, sind am besten bekannt. Nicht nur wurde die Aminosäuresequenz vollständig aufgeklärt [57–59], sondern auch die Raumstruktur wurde röntgenographisch analysiert [10, 11, 60] (vgl. Abb. 1).

[36] I. M. Klotz u. S. Keresztes-Nagy, *Biochemistry* 2, 445 (1963); S. Keresztes-Nagy u. I. M. Klotz, *Biochemistry* 2, 923 (1963).

[37] U. Henning, D. R. Helinski, F. C. Chao u. C. Yanofsky, *J. biol. Chemistry* 237, 1523 (1962); B. C. Carlton u. C. Yanofsky, *J. biol. Chemistry* 237, 1531 (1962); D. A. Wilson u. I. P. Crawford, *Bacteriol. Proc.* 1964, 92.

[38] J. Durell u. G. L. Cantoni, *Biochim. biophysica Acta* 35, 515 (1959); J. Durell u. R. F. Steiner, *Biochim. biophysica Acta* 39, 248 (1960); W. A. Klee u. G. L. Cantoni, *Biochim. biophysica Acta* 45, 545 (1960); W. A. Klee, *Biochim. biophysica Acta* 59, 562 (1962).

[39] L. Kanarek, E. Marler, R. A. Bradshaw, R. E. Fellows u. R. L. Hill, *J. biol. Chemistry* 239, 4207 (1964); R. L. Hill u. L. Kanarek, *Brookhaven Symposia Biol.* 17, 80 (1964).

[40] J. B. Sumner u. N. Gralén, *J. biol. Chemistry* 125, 33 (1938); T. Samejima u. J. T. Yang, *J. biol. Chemistry* 238, 3256 (1963); W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton u. B. M. Olson, *Biochim. biophysica Acta* 89, 47 (1964); K. Weber u. H. Sund, *Angew. Chem.* 77, 621 (1965); *Angew. Chem. internat. Edit.* 4, 597 (1965); H. Sund, K. Weber u. E. Mölbert, *Biochim. biophysica Acta*, im Druck.

[41] J. C. Gerhart u. A. B. Pardee, *Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol.* 28, 491 (1963); J. C. Gerhart, *Brookhaven Symposia Biol.* 17, 222 (1964); J. C. Gerhart u. H. K. Schachman, *Biochemistry* 4, 1054 (1965).

[42] J. Drenth u. E. H. Wiebenga, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 74, 813 (1955); D. A. I. Goring u. P. Johnson, *Arch. Biochem. Biophysics* 56, 448 (1955); V. Dlouhá, B. Keil u. F. Šorm, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* 28, 2969 (1963).

[43] O. O. Blumenfeld, M. A. Paz u. P. M. Gallop, *Abstracts, 6th int. Congress of Biochemistry, New York 1964*, S. 141; P. M. Gallop, *Biophys. J.* 4, Suppl. 79 (1964); J. Engel u. G. Beier, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 334, 201 (1963); K. Kühn, J. Engel, B. Zimmermann u. W. Grassmann, *Arch. Biochem. Biophysics* 105, 387 (1964).

Tabelle 1. Quartärstrukturen einiger Proteine (zu den Dehydrogenasen siehe Tabelle 2).

Protein	Molgewicht	Polypeptidkette			Bemerkungen	Lit.
		Größe	Zahl	Methode [a]		
Rinder-Thrombin	33 700–40 000	≈ 8000	4–5	D/M	Reversible Bildung höherer Assoziante	[31]
Hämoglobine verschiedener Species	65 000	15 000–16 000	4	C, D/M, EA, F, R, S	Siehe Abschn. IV, 1	
Alkalische Phosphatase aus <i>E. coli</i>	80 000	40 000	2	D/M, F	Dissoziation in die wahrscheinlich gleichartigen Polypeptidketten ist unter Reaktivierung reversibel.	[32]
Enolase aus Kaninchenskelettmuskel	82 000	41 000	2	D/M, EA	Dissoziation in die Polypeptidketten ist unter Reaktivierung reversibel	[33]
Procarboxypeptidase A-S6 aus Rinderpankreas	87 000	34 500 und 2 x ≈ 25 000	3	D/M, EA	Die Polypeptidkette vom Molgewicht 34 500 und eine der beiden vom Molgew. ca. 25 000 sind die inaktiven Formen der Carboxypeptidase A und einer Endopeptidase. Die Funktion der dritten Polypeptidkette ist unbekannt.	[34]
Hexokinase aus Hefe	96 000	24 000	4	D/M, EA, F	Dissoziation in die wahrscheinlich gleichartigen Polypeptidketten ist unter Reaktivierung reversibel. Das Molekül kann in zwei enzymatisch aktive Untereinheiten dissoziieren.	[35]
Hemerythrin aus <i>Golfingia gouldii</i>	107 000	13 500	8	C, D/M	Dissoziation in die Polypeptidketten ist reversibel, wobei auch das O <sub>2</sub> -Bindungsvermögen zurückkehrt.	[36]
Tryptophan-Synthetase aus <i>E. coli</i> , B-Protein	117 000	60 000	2	C, EA	Der Sedimentationskoeffizient von 1,2 S spricht für mehr als zwei Polypeptidketten. Das A-Protein besteht aus nur einer Polypeptidkette (Molgew. 29 500). A- und B-Protein bilden eine funktionelle Einheit.	[37]
Aldolase aus Kaninchenskelettmuskel	142 000	23 500	6	D/M	Siehe Abschn. IV, 4.	
γ-Globuline verschiedener Species	150 000	25 000 und 50 000	jeweils 2	D/M	Siehe Abschn. IV, 3.	
Thetin-homocystein-methyltransferase aus Pferdeleber	180 000	50 000	3–4	D/M	Enzym aggregiert, wahrscheinlich unter Bildung von Disulfidbrücken. Disulfidspaltende Verbindungen depolymerisieren. Spezifische Aktivität unabhängig von der Teilchengröße.	[38]
Fumarase aus Schweineherzmuskel	194 000	48 500	4	D/M, EA, F	Dissoziation in die wahrscheinlich gleichartigen Polypeptidketten ist unter Reaktivierung reversibel.	[39]
Katalase aus Rinderleber	240 000–248 000	65 000	4	C, D/M, EM, F	Die Fingerprint-Analyse spricht für vier gleichartige Polypeptidketten. Möglicherweise besteht das Dissoziationsprodukt vom Molgew. 65 000 aus mehreren, ungleichartigen Polypeptidketten. Bei pH 3 dissoziiert Katalase in zwei Untereinheiten vom Molgewicht 120 000.	[40]
Edestin aus Hanfsamen	300 000–360 000	23 000 und 27 000	jeweils 6–7	D/M, EA, F	Die beiden verschiedenen Polypeptidketten (in einer Untereinheit) sind möglicherweise durch Disulfidbrücken verbunden.	[42]
Fibrinogen aus Rinderserum	340 000–390 000	51 000–65 000	6	D/M, EA	Jeweils 2 der 6 Polypeptidketten sind wahrscheinlich gleichartig.	[44]
Lipovitellin aus Eigelb	400 000	200 000	2	D/M	Lipid-Gehalt 20 %. Die Dissoziation ist reversibel. Das Molgew. der Polypeptidkette sollte kleiner als 100 000 sein (Endgruppenanalyse).	[45]
Apo ferritin aus Pferd milz	480 000	24 000	20	D/M, EA, EM, F, R	Siehe Abschn. IV, 2 Dimerisierung wurde beobachtet [45a].	
Glykogen-Phosphorylase aus Kaninchenskelettmuskel	495 000	135 000	4	C, D/M	Siehe Abschn. IV, 6	
Urease aus Schwertbohnenmehl	483 000	83 000	6	D/M	Höhere Assoziante wurden beobachtet.	[46]
β-Galaktosidase aus <i>E. coli</i>	518 000	35 000–40 000	12–16	D/M	Siehe Abschn. IV, 7	
DNS-abhängige RNS-Polymerase aus <i>E. coli</i>	600 000–900 000	100 000–150 000	6	EM		[47]

Protein	Molgewicht	Polypeptidkette			Bemerkungen	Lit.
		Größe	Zahl	Methode [a]		
Trespenmosaik-Virus (Brome-grass mosaic virus)	4600000	20000	≈ 180	F	RNS-Gehalt 21,4 %. Einwirkung von 1 M CaCl <sub>2</sub> führt zu Untereinheiten vom Molgew. 40000	[48]
Kohlrüben-gelbmosaik-Virus (Turnip yellow mosaic virus)	5000000	21300	≈ 150	D/M, EA, EM, F, R	RNS-Gehalt 37 %. Polypeptidketten sind wahrscheinlich gleichartig.	[49]
Poliomyelitis-Virus Typ II	5500000	27000	≈ 130	D/M	RNS-Gehalt 36 %.	[50]
Luzernmosaik-Virus (Alfalfa mosaic virus)	7400000	≈ 36000	≈ 160	D/M	RNS-Gehalt 21 %.	[51]
Kartoffel X-Virus	35000000	52000	≈ 650	D/M	RNS-Gehalt 5 %. Endgruppenanalyse spricht für die Gleichartigkeit der Polypeptidketten.	[52]
Tabakmosaik-Virus	39400000	17530	2130	D/M, EA, F, R, S	RNS-Gehalt 5 %. Dissoziation in die gleichartigen Polypeptidketten und die RNS ist reversibel. Untereinheiten verschiedener Größe treten als Dissoziationsprodukte auf.	[53]

[a] C = Bestimmung der „Cofaktor-Bindungsstellen“; D/M = Molekulargewichtsbestimmung nach Denaturierung; EA = Endgruppenanalyse; EM = Elektronenmikroskopie; F = Fingerprint-Analyse; R = Röntgenstrukturanalyse; S = vollständige oder partielle Sequenzanalyse.

Tabelle 2. Molekulargewicht, Quartärstruktur und Coenzymbindung von pyridinnucleotid-abhängigen Dehydrogenasen.

Dehydrogenase (= DH)	Molgew.	Polypeptidkette		Äquivalentgewicht pro Bindungsstelle	n [b]	Lit.
		Molgew.	Nachweis [a]			
Vitamin K-Reduktase aus Rinderleber	52000	?		56000	?; 1	[163]
Isocitronensäure-DH aus Schweineherz	61000–64000	?		≈ 30000	?; 2	[164]
α-Glycerin-1-phosphat-DH aus Kaninchenskelettmuskel	78000	40000	D/M	39000	2; 2	[165–167]
Äpfelsäure-DH aus Schweineherz	70000–85000	51000	EA	35000–42000 [c]	≈ 2; 2	[166, 168, 169]
Alkohol-DH aus Pferdeleber	84000	42000	S [d]	42000	2; 2	[172–174]
Dihydroliponsäure-DH aus Schweineherz	102000	50000 [e]	D/M, EA, F	50000	2; 2	[175]
Dihydroliponsäure-DH aus <i>E. coli</i> bzw. <i>Spinacia oleracea</i>	102000–112000	?		56500	?; 2	[176]
Glutathion-Reduktase aus Hefe	118000	?		56500	?; 2	[177]
3-Phosphoglycerinaldehyd-DH aus Kaninchen- u. Schweineskelettmuskel	137000–145000	36000–38000 [d, f]	D/M, EA, F, S	35000–46000	4; 4	[27, 166, 167, 178–181a]
3-Phosphoglycerinaldehyd-DH aus Hefe	122000–140000	36000–38000 [d, f]	D/M, EA, F, S	37000–40000	4; 4	[167, 180–185]
Milchsäure-DH aus Hühner-, Rinder- oder Schweineherz [g]	118000–140000	34000–37000	D/M, F, S	32000–39000	4; 4	[27, 95–98, 102, 109, 110d, 166, 186–189a]
Milchsäure-DH aus Rattenleber	126000	?		64000	?; 2	[111, 188]
Alkohol-DH aus Hefe	150000	36000–37000 [d, h]	D/M, F, S	30000–42000	4; 4	[29, 166, 173, 174, 188, 190]
Glutaminsäure-DH aus <i>Neurospora crassa</i>	267000	28000 [h]	F	?	8–10; ?	[191, 192]
Glutaminsäure-DH aus Rinderleber [i]	2000000	ca. 50000	D/M, EA, EM	31000–49000	ca. 40; 40–60	[29, 145, 149, 153, 155–157, 166, 193]

[a] Abkürzungen siehe Tabelle 1.

[b] n = Molgew. der DH/Molgew. der Polypeptidkette oder Molgew. der DH/Äquivalentgewicht.

[c] Für die Enzyme aus Pferdeherz [169], Rattenleber [170] und Rinderherz [171] liegt das Äquivalentgewicht bei 34000 bis 50000.

[d] Die partielle Aufklärung der Aminosäuresequenz spricht für die Gleichartigkeit der Polypeptidketten.

[e] Auf Grund der Endgruppen- und Fingerprint-Analyse sind die beiden Polypeptidketten, die möglicherweise durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, gleichartig.

[f] Die Endgruppenanalyse spricht für die Gleichartigkeit der Polypeptidketten.

[g] Vgl. Abschnitt IV, 5.

[h] Auf Grund der Fingerprint-Analyse sind die Polypeptidketten gleichartig.

[i] Vgl. Abschnitt IV, 8.

Das adulte Human-Hämoglobin (HB-A, Molekulargewicht 64458) besteht aus vier Polypeptidketten, von denen jeweils zwei gleich sind<sup>[57-60]</sup>. Man bezeichnet sie mit  $\alpha$  und  $\beta$ , so daß dem HB-A die Formel  $\alpha_2\beta_2$  zukommt. Neben dem HB-A findet sich in geringer Konzentration noch ein zweites Hämoglobin (HB-A<sub>2</sub>:  $\alpha_2\delta_2$ ) sowie im foetalen Blut das HB-F ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Ihnen allen sind die  $\alpha$ -Ketten gemeinsam;  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette sind von der  $\beta$ -Kette verschieden, doch weisen alle vier Polypeptidketten zahlreiche Koinzidenzen auf und besitzen gleiche oder ähnliche Kettenlänge<sup>[61]</sup>.

Jede Polypeptidkette ist Träger einer Hämgruppe, der Bindungsstelle des Sauerstoffs. Die Sauerstoffbindung beeinflusst die Wechselwirkung zwischen den Polypeptidketten<sup>[11,63]</sup>. So erleichtert z. B. die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls die Aufnahme der weiteren drei (siehe Abschnitt V, 4)<sup>[63a]</sup>.

## 2. Apoferritin aus Pferdemilz [64-68]

Ferritin ist ein eisenspeicherndes Protein und besteht aus zwei Komponenten: ein Eisen(III)-hydroxidphosphat-Komplex bildet den Kern, der von einer Proteinhülle, dem Apoferritin, umgeben ist. Das Apoferritin

läßt sich isolieren und kristallisieren. Zur Quartärstruktur des Proteins aus Pferdemilz liegen ausführliche Untersuchungen von *Harrison*<sup>[64-67]</sup> vor.

Nach der Röntgenstrukturanalyse beträgt das Molekulargewicht des kompakten Moleküls 480000<sup>[64]</sup>. Das native Apoferritin-Molekül besitzt eine sehr stabile Struktur, obwohl die Polypeptidketten nur durch Nebenvalenzbindungen verknüpft sind. In Gegenwart von Dodecylsulfat (DS) bildet das Protein ( $s_{20,w}^0 = 17,6$  S) verschiedene Spaltprodukte. Bei einem Gewichtsverhältnis von Protein:DS = 2:1 dissoziiert das Protein vollständig, wobei eine Komponente mit einem Sedimentationskoeffizienten von 2,5 S auftritt. Diese Komponente, ein Protein-DS-Komplex (33 % DS), besitzt ein Teilchengewicht von 38000 bis 41000 mit einem Proteinanteil vom Molekulargewicht 25000 bis 27000, d. h. das Apoferritin-Molekül dissoziiert durch Bindung des DS in etwa 20 Polypeptidketten<sup>[65]</sup>. Die Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid führt zur gleichen Komponente (Molekulargewicht 25000)<sup>[66]</sup>.

[44] H. A. Ende u. G. V. Schulz, Z. physik. Chem., N.F. 33, 143 (1962); R. H. Haschemeyer u. R. E. Nadeau, Biochem. biophys. Res. Commun. 11, 217 (1963); A. Henschen, Ark. Kemi 22, 1, 375 (1963/1964).

[45] G. Bernardi u. W. H. Cook, Biochim. biophysica Acta 44, 96, 105 (1960); J. M. Neelin u. W. H. Cook, Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1075 (1961); R. W. Burley u. W. H. Cook, Canad. J. Biochem. Physiol. 40, 363 (1962).

[45a] H. Sund, unveröffentlicht.

[46] J. M. Creeth u. L. W. Nichol, Biochem. J. 77, 230 (1960); F. J. Reithel, J. E. Robbins u. G. Gorin, Arch. Biochem. Biophysics 108, 409 (1964).

[47] E. Fuchs, W. Zillig, P. H. Hofschneider u. A. Preuss, J. molecular Biol. 10, 546 (1964).

[48] L. E. Bockstahler u. P. Kaesberg, Biophys. J. 2, 1 (1962); J. D. Stubbs u. P. Kaesberg, J. molecular Biol. 8, 314 (1964).

[49] R. Markham, Discuss. Faraday Soc. 11, 221 (1951); H. E. Huxley u. G. Zubay, J. molecular Biol. 2, 189 (1960); A. Klug u. J. T. Finch, J. molecular Biol. 2, 201 (1960); J. I. Harris u. J. Hindley, J. molecular Biol. 3, 117 (1961).

[50] F. A. Anderer u. H. Restle, Z. Naturforsch. 19b, 1026 (1964).

[51] J. J. Kelley u. P. Kaesberg, Biochim. biophysica Acta 55, 236 (1962) u. 61, 865 (1962).

[52] M. E. Reichmann, Canad. J. Chem. 37, 384 (1959) u. J. biol. Chemistry 235, 2959 (1960); C. I. Niu, V. Shore u. C. A. Knight, Virology 6, 226 (1958).

[53] F. A. Anderer, Advances Protein Chem. 18, 1 (1963); D. L. D. Caspar, Advances Protein Chem. 18, 37 (1963).

[54] I. B. Eriksson-Quensel u. T. Svedberg, Biol. Bull. 71, 498 (1936); S. Brohult, Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV, 12, Nr. 4 (1940).

[54a] K. E. van Holde u. L. B. Cohen, Biochemistry 3, 1803 (1964); Brookhaven Symposia Biol. 17, 184 (1964).

[55] E. F. J. van Bruggen, E. H. Wiebenga u. M. Gruber, J. molecular Biol. 4, 1 u. 8 (1962); E. F. J. van Bruggen, V. Schuiten, E. H. Wiebenga u. M. Gruber, J. molecular Biol. 7, 249 (1963).

[56] Ö. Levin, J. molecular Biol. 6, 95 (1963); Ark. Kemi 21, 1 u. 15 (1963); Acta Universitatis Upsaliensis, Abstracts of Uppsala Dissertations in Science, Nr. 24. Uppsala 1963.

[57] G. Braunitzer u. V. Rudloff, Dtsch. med. Wschr. 87, 959 (1962); G. Braunitzer, K. Hille, V. Rudloff u. N. Hilschmann, Advances Protein Chem. 19, 1 (1964).

[58] V. M. Ingram: The Hemoglobins in Genetics and Evolution. Columbia University Press, New York, London 1963.

[59] W. A. Schroeder, Annu. Rev. Biochem. 32, 301 (1963); R. J. Hill u. W. Konigsberg, J. biol. Chemistry 237, 3151 (1962); W. Konigsberg, J. Goldstein u. R. J. Hill, ibid. 238, 2028 (1963).

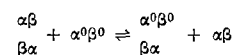
[60] M. F. Perutz: Proteins and Nucleic Acids. Elsevier, Amsterdam, London, New York 1962.

[61] Zu den zahlreichen Untersuchungen zur Aufklärung der Quartärstruktur und der Hämoglobinopathien siehe [11,57-60,62].

[62] S. Wilson u. D. B. Smith, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 405 (1959).

[63] R. E. Benesch u. R. Benesch, Biochemistry 1, 735 (1962); R. E. Benesch, R. Benesch u. M. E. Williamson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 2071 (1962); H. Muirhead u. M. F. Perutz, Nature (London) 199, 633 (1963); M. F. Perutz u. L. Mazzarella, Nature (London) 199, 639 (1963); R. Benesch u. R. E. Benesch, Nature (London) 202, 773 (1964).

[63a] Neuere Ergebnisse [R. E. Benesch, R. Benesch u. G. Macduff, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 535 (1965)] deuten darauf hin, daß während der Sauerstoffaufnahme ein Austausch einer  $\alpha\beta$ -Untereinheit des sauerstoff-freien Hämoglobin-Moleküls gegen eine sauerstoff-haltige Untereinheit ( $\alpha^0\beta^0$ ) auftritt:



[64] P. M. Harrison, J. molecular Biol. 6, 404 (1963).

[65] T. Hofmann u. P. M. Harrison, J. molecular Biol. 6, 256 (1963).

[66] P. M. Harrison in F. Gross: Iron Metabolism. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964, S. 40.

[67] P. M. Harrison u. T. Hofmann, J. molecular Biol. 4, 239 (1962).

[67a] Vgl. H. J. Bielig, O. Kratky, G. Rohns u. H. Wawra, Tetrahedron Letters 1964, 2701.

[68] E. F. J. van Bruggen u. G. W. Richter, zitiert in [64].

[69] R. H. Pain, Biochem. J. 88, 234 (1963).

[70] E. Marler, C. A. Nelson u. C. Tanford, Biochemistry 3, 279 (1964).

[71] O. Kratky, G. Porod, A. Sekora u. B. Paletta, J. Polymer Sci. 16, 163 (1955); siehe auch O. Kratky, I. Pilz, P. J. Schmitz u. R. Oberdorfer, Z. Naturforsch. 18b, 180 (1963).

[72] G. M. Edelman u. J. A. Gally, J. exp. Medicine 116, 207 (1962); R. R. Porter in A. Gellhorn u. E. Hirschberg: Basic Problems in Neoplastic Disease. Columbia University Press, New York, London 1962, S. 177; P. A. Small, J. E. Kehn u. M. E. Lamm, Science (Washington) 142, 393 (1963).

[73] J. B. Fleischman, R. R. Porter u. E. M. Press, Biochem. J. 88, 220 (1963).

[74] G. M. Edelman u. J. A. Gally, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 846 (1964).

[75] J. L. Palmer, A. Nisonoff u. K. E. van Holde, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 314 (1963).

[76] J. L. Palmer u. A. Nisonoff, Biochemistry 3, 863 (1964).

[77] M. J. Crumpton u. J. M. Wilkinson, Biochem. J. 88, 228 (1963).

[78] J. A. Gally u. G. M. Edelman, zitiert in [74].

[79] F. Karush, J. Amer. chem. Soc. 78, 5519 (1956).

[80] J. Almeida, B. Cinader u. A. Howatson, J. exp. Medicine 118, 327 (1963).

[81] A. Nisonoff u. J. L. Palmer, Science (Washington) 143, 376 (1964).

Die Fingerprint-Analyse ergibt neben einigen Spurenpeptiden etwa 20 Peptide, von denen nur eines Tryptophan enthält. Dies entspricht 20 gleichartigen Polypeptidketten vom Molekulargewicht 24000<sup>[67]</sup>. Freie N-terminale Aminogruppen fehlen, doch können 20

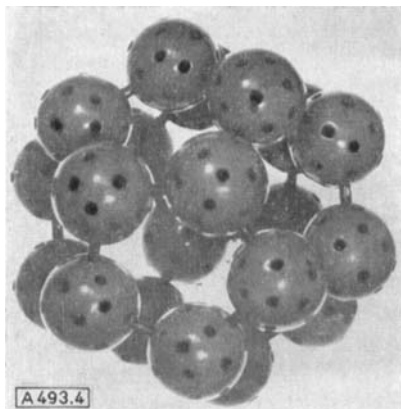


Abb. 4. Modell der von Harrison [64] vorgeschlagenen Quartärstruktur des Apoferritins: 20 Polypeptidketten in den Ecken eines Pentagondodekaeders. (Jede Kugel stellt eine Polypeptidkette dar; im wirklichen Molekül befinden sich die Ketten in gegenseitigem Kontakt und sind nicht exakt kugelförmig.)

- [82] O. Roholt, K. Onoue u. D. Pressman, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 51, 173 (1964).
- [83] D. E. Olins u. G. M. Edelman, zitiert in [74]; G. M. Edelman, D. E. Olins, J. A. Gally u. N. D. Zinder, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 50, 753 (1963).
- [84] Zur Identität der Polypeptidketten und zum Problem, die Spezifität der einzelnen Antikörper aus der Kombination verschiedener Typen an Polypeptidketten H und L zu erklären, siehe [74].
- [85] Der Aufbau der Aldolase aus Untereinheiten wurde schon in den 30er Jahren beobachtet [86, 87]. Gralén [87] fand in Harnstoff-Lösung ein Molekulargewicht von 72000 und nahm eine Dissoziation in zwei Untereinheiten an (statt drei, vgl. Text). Auch der starke Abfall des Sedimentationskoeffizienten bei alkalischem pH wurde schon von Gralén beobachtet. Aldolase – früher Myogen genannt – ist unseres Wissens das erste Enzymprotein, bei dem Quartärstruktur festgestellt wurde.
- [86] R. Stöver, *Biochem. Z.* 259, 269 (1933).
- [87] N. Gralén, *Biochem. J.* 33, 1342 (1939).
- [88] E. Stellwagen u. H. K. Schachman, *Biochemistry* 1, 1056 (1962).
- [89] W. C. Deal, W. J. Rutter u. K. E. van Holde, *Biochemistry* 2, 246 (1963).
- [90] L. F. Hass, *Biochemistry* 3, 535 (1964).
- [91] E. W. Westhead, L. Butler u. P. D. Boyer, *Biochemistry* 2, 927 (1963).
- [92] L. F. Hass u. M. S. Lewis, *Biochemistry* 2, 1368 (1963).
- [92a] Nach einer neuen Untersuchung der C- und N-terminalen Gruppen [J. A. Winstead u. F. Wold, *J. biol. Chemistry* 239, 4212 (1964)] besteht das Aldolase-Molekül aus nur drei Polypeptidketten vom Molekulargewicht 47000, von denen möglicherweise zwei gleichartig sind. Die Ursache für die Bildung der Komponente vom Molekulargewicht 23500 [92] könnte die Spaltung einer alkali-labilen Bindung innerhalb der Polypeptidkette sein.
- [93] A. Kowalsky u. P. D. Boyer, *J. biol. Chemistry* 235, 604 (1960).
- [94] E. Grazi, T. Cheng u. B. L. Horecker, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 7, 250 (1962).
- [95] J. B. Neilands, *J. biol. Chemistry* 199, 373 (1952).
- [96] E. Appella u. C. L. Markert, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 6, 171 (1961).
- [97] R. Jaenicke, *Biochem. Z.* 338, 614 (1963); *Biochim. biophysica Acta* 85, 186 (1964).
- [98] G. Di Sabato u. N. O. Kaplan, *J. biol. Chemistry* 239, 438 (1964).
- [99] T. Wieland u. G. Pfeleiderer, *Biochem. Z.* 329, 112 (1957); *Angew. Chem.* 74, 261 (1962); *Angew. Chem. internat. Edit.* 1, 169 (1962); G. Pfeleiderer u. D. Jeckel, *Biochem. Z.* 329, 370 (1957).

Acetylgruppen pro Apoferritin-Molekül nachgewiesen werden. Mit Carboxypeptidase B werden etwa 20 C-terminale Arginylreste pro Apoferritin-Molekül abgespalten<sup>[66]</sup>.

Nach der Röntgenstrukturanalyse ist das Molekül als kugelförmige Schale mit einem äußeren Radius von 61 Å und einem Verhältnis von innerem zu äußerem Radius von 0,6 zu beschreiben<sup>[67a, 69]</sup>. Die Schale ist aus Untereinheiten aufgebaut und hat die Gestalt eines Pentagondodekaeders, in dessen zwanzig Ecken sich die 20, nach elektronenmikroskopischen Befunden<sup>[68]</sup> nahezu kugelförmigen Polypeptidketten befinden<sup>[64]</sup>. Abbildung 4 zeigt ein Modell.

### 3. $\gamma$ -Globuline<sup>[69-84]</sup>

Die  $\gamma$ -Globuline, Träger der Antikörperwirkung, sind durch einen Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 7 S charakterisiert und besitzen ein Molekulargewicht von etwa 150000<sup>[69, 70]</sup>. Das Molekül läßt sich als langgestreckter Zylinder mit elliptischem Querschnitt be-

- [100] T. Wieland, G. Pfeleiderer u. F. Ortanderl, *Biochem. Z.* 331, 103 (1959).
- [101] P. G. W. Plagemann, K. F. Gregory u. F. Wróblewski, *J. biol. Chemistry* 235, 2282, 2288 (1960); *Biochem. Z.* 334, 37 (1961).
- [102] C. L. Markert u. H. Ursprung, *Development. Biol.* 5, 363 (1962); C. L. Markert in *M. Locke: Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*. Academic Press, New York, London 1963, S. 65.
- [103] R. D. Cahn, N. O. Kaplan, L. Levine u. E. Zwillig, *Science (Washington)* 136, 962 (1962).
- [104] J. S. Nisselbaum u. O. Bodansky, *J. biol. Chemistry* 238, 969 (1963); *Ann. New York Acad. Sci.* 103, 930 (1963).
- [105] C. L. Markert, *Science (Washington)* 140, 1329 (1963); *Abstracts, 6th int. Congress of Biochemistry*, New York 1964, S. 320.
- [106] C. R. Shaw u. E. Barto, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 50, 211 (1963).
- [107] A. C. Wilson, R. D. Cahn u. N. O. Kaplan, *Nature (London)* 197, 331 (1963).
- [108] E. D. Wachsmuth, G. Pfeleiderer u. T. Wieland, *Biochem. Z.* 340, 80 (1964).
- [109] T. P. Fondy, A. Pesce, I. Freedberg, F. Stolzenbach u. N. O. Kaplan, *Biochemistry* 3, 522 (1964).
- [110] Ob dies auch für die Rattenleber-LDH gilt, muß vorerst offen bleiben. Dieses Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 126000 und nur zwei Coenzymbindungsstellen [111]. Auf Grund der an anderen Dehydrogenasen erhaltenen Ergebnisse (Abschnitt IV, 10) sollte man erwarten, daß diese LDH aus nur zwei Polypeptidketten vom Molekulargewicht 63000 besteht.
- [110a] Die Untersuchung der hydrodynamischen Eigenschaften nach Denaturierung [27, 97] und der N-terminalen Gruppen sowie die Fingerprint-Analyse [110b] geben Hinweise darauf, daß LDH aus insgesamt 8 Polypeptidketten (jede Untereinheit aus 2) besteht.
- [110b] E. Appella in [110d], und zwar S. 151.
- [110c] C. J. Epstein, M. M. Carter u. R. F. Goldberger, *Biochim. biophysica Acta* 92, 391 (1964).
- [110d] N. O. Kaplan, *Brookhaven Symposia in Biology* 17, 131 (1964).
- [111] E. O. Davison, D. M. Gibson, B. R. Ray u. C. S. Vestling, *J. physic. Chem.* 57, 609 (1953); H. Terayama u. C. S. Vestling, *Biochim. biophysica Acta* 20, 586 (1956); C. S. Vestling in *D. Glick: Methods of Biochemical Analysis*. Interscience, New York, London 1962, Bd. 10, S. 137.
- [112] G. Pfeleiderer u. E. D. Wachsmuth, *Biochem. Z.* 334, 185 (1961).
- [113] D. T. Lindsay, *J. exp. Zoology* 152, 75 (1963).
- [114] I. H. Fine, N. O. Kaplan u. D. Kufitinec, *Biochemistry* 2, 116 (1963).



schreiben<sup>[71]</sup> (Dimensionen siehe Abb. 5). Nach Untersuchungen an  $\gamma$ -Globulinen verschiedener Herkunft<sup>[69, 70, 72–75]</sup> hat das Molekül die Formel  $H_2L_2$ , d. h. es besteht aus zwei schwereren (H, Molekulargewicht etwa 50000) und zwei leichteren (L, Molekulargewicht etwa 25000) Ketten. Die beiden H-Ketten sind untereinander<sup>[76]</sup> und mit den L-Ketten durch je eine Disulfidbrücke verbunden<sup>[73, 77, 78]</sup>, nach deren Reduktion die chromatographische Trennung der H- und L-Ketten gelingt. Weitere Disulfidbrücken befinden sich innerhalb der Ketten. Bei  $pH < 7$  tritt nach Reduktion der besonders reaktionsfähigen Disulfidbrücke zwischen den beiden H-Ketten die Untereinheit HL auf<sup>[75]</sup>.

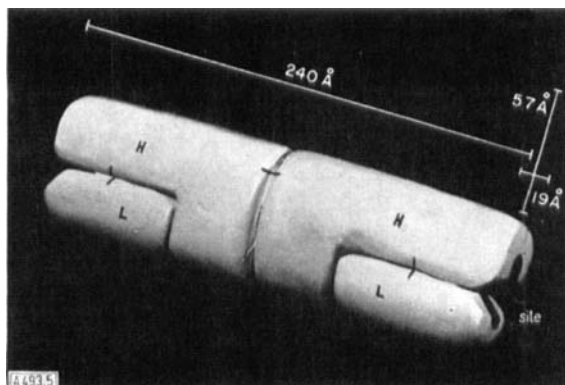


Abb. 5. Modell des 7S-Antikörper-Moleküls nach Edelman u. Gally<sup>[74]</sup>. H: schwere Polypeptidkette; L: leichte Polypeptidkette; Site: eine der beiden Antigenbindungsstellen. Die Striche auf dem Modell stellen die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten dar. Die molekularen Dimensionen entsprechen den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkelstreuung<sup>[71]</sup>.

- [115] D. H. Brown u. C. F. Cori in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1961, Bd. 5, S. 207; E. G. Krebs u. E. H. Fischer, Advances Enzymology 24, 263 (1962).
- [116] P. J. Keller u. G. T. Cori, Biochim. biophysica Acta 12, 235 (1953).
- [117] N. B. Madsen u. C. F. Cori, J. biol. Chemistry 223, 1055 (1956).
- [118] N. B. Madsen, J. biol. Chemistry 223, 1067 (1956).
- [119] N. B. Madsen u. C. F. Cori, J. biol. Chemistry 224, 899 (1957).
- [120] T. Baranowski, B. Illingworth, D. H. Brown u. C. F. Cori, Biochim. biophysica Acta 25, 16 (1957).
- [121] A. B. Kent, E. G. Krebs u. E. H. Fischer, J. biol. Chemistry 232, 549 (1958).
- [122] E. H. Fischer, A. W. Forrey, J. L. Hedrick, R. C. Hughes, A. B. Kent u. E. G. Krebs in E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunschtein u. A. Rossi Fanelli: Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, S. 543.
- [123] J. H. Wang u. D. J. Graves, J. biol. Chemistry 238, 2386 (1963).
- [123a] Anmerkung bei der Korrektur: Unter bestimmten Bedingungen führt Glucose zu einer partiellen Dissoziation des Phosphorylase-a-Moleküls in Untereinheiten (Molekulargewicht 240000). Dabei steigt die enzymatische Aktivität [J. H. Wang, M. L. Shonka u. D. J. Graves, Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 131 (1965); vgl. auch Biochemistry 4, 2296 (1965)]. Das Protein-Molekül dissoziiert auch bei hohen Ionen-Stärken oder kleinen Protein-Konzentrationen [J. H. Wang u. D. J. Graves, Biochemistry 3, 1437 (1964)].
- [124] C. H. Davis, R. B. Olsgaard, E. H. Fischer u. E. G. Krebs, Federat. Proc. 23, 488 (1964).
- [125] H. Sund u. K. Weber, Biochem. Z. 337, 24 (1963).
- [126] A. S. L. Hu, R. G. Wolfe u. F. J. Reithel, Arch. Biochem. Biophysics 81, 500 (1959).
- [127] K. Weber, Dissertation, Universität Freiburg 1964.
- [128] D. Zipser, J. molecular Biol. 7, 113 (1963).
- [129] B. Rotman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1981 (1961). Neuere Ergebnisse ergaben ein Molekulargewicht von etwa 500000 (persönliche Mitteilung).
- [130] E. Pollard in J. L. Oncley et al.: Biophysical Science. Wiley, New York 1959, S. 273.
- [131] D. Zipser, J. molecular Biol. 7, 739 (1963).
- [132] K. Weber, H. Sund u. K. Wallenfels, Angew. Chem. 75, 642 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 481 (1963); K. Wallenfels, H. Sund u. K. Weber, Biochem. Z. 338, 714 (1963).

gewicht etwa 25000) Ketten. Die beiden H-Ketten sind untereinander<sup>[76]</sup> und mit den L-Ketten durch je eine Disulfidbrücke verbunden<sup>[73, 77, 78]</sup>, nach deren Reduktion die chromatographische Trennung der H- und L-Ketten gelingt. Weitere Disulfidbrücken befinden sich innerhalb der Ketten. Bei  $pH < 7$  tritt nach Reduktion der besonders reaktionsfähigen Disulfidbrücke zwischen den beiden H-Ketten die Untereinheit HL auf<sup>[75]</sup>.

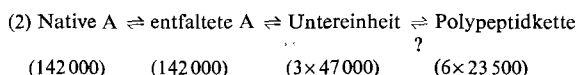
Das Antikörpermolekül besitzt zwei Antigenbindungsstellen<sup>[79]</sup>, die sich nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen<sup>[80]</sup> an den beiden Enden des zylindrischen Moleküls befinden („site“ in Abb. 5). Die Dissoziation in die Untereinheiten HL ist unter Rückgewinnung der immunologischen Aktivität reversibel<sup>[81]</sup>, doch sollen sich bei der Assoziation zum Molekül  $H_2L_2$  die Disulfidbrücken nicht wieder zurückbilden. Auch die nach schonender Reduktion chromatographisch getrennten H- und L-Ketten assoziieren wieder zum Molekül  $H_2L_2$ , wobei ebenfalls nur Nebenvaleanzbindungen wirksam werden<sup>[82]</sup> und die biologische Aktivität wiederkehrt. Falls die Polypeptidketten im renaturierten Molekül tatsächlich nur durch Nebenvaleanzbindungen zusammengehalten werden<sup>[81, 82]</sup>, wäre die Antikörperwirksamkeit nicht an das Vorhandensein von Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten gebunden. In vitro ließen sich durch Dissoziation und Assoziation<sup>[81–83]</sup> „hybride“  $\gamma$ -Globulin-Moleküle gewinnen<sup>[84]</sup>.

- [133] U. Karlsson, S. Koorajian, I. Zabin, F. S. Sjöstrand u. A. Miller, J. Ultrastructure Res. 10, 457 (1964).
- [134] E. Mölbert, K. Weber u. K. Wallenfels, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [135] K. Weber, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [136] K. Weber, H. Sund u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 339, 498 (1964).
- [137] I. Zabin, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 28, 431 (1963).
- [138] G. R. Craven, E. Steers u. C. B. Anfinsen, Federat. Proc. 23, 263 (1964).
- [138a] Vgl. auch E. Steers, G. R. Craven, C. B. Anfinsen u. J. L. Bethune, J. biol. Chemistry 240, 2478 (1965).
- [139] M. Cohn, Bacteriol. Rev. 21, 140 (1957).
- [140] Die Größe des für die  $\beta$ -Galaktosidase verantwortlichen Strukturgens (= z-Gen) des Coli-Chromosoms entspricht einem „Polypeptidketten-Äquivalent“ von 135000 [141]. Da die Polypeptidketten des  $\beta$ -Galaktosidase-Moleküls aber mindestens dreimal kleiner sind, kann das z-Gen, sofern seine Größe richtig bestimmt wurde, nicht der Polypeptidkette äquivalent sein. Es ist daher anzunehmen, daß das z-Gen eine „genetisch funktionelle Einheit“ darstellt, der auch im Proteinmolekül eine bestimmte Einheit zuzuordnen ist. Dies könnten die gleichartigen Untereinheiten vom Molekulargewicht etwa 130000 sein. Das z-Gen müßte dann aus mehreren Genabschnitten bestehen, die den einzelnen Polypeptidketten, die dann nicht gleichartig sein dürften, entsprechen [127, 138a].
- [141] F. Jacob u. E. L. Wollman: Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press, New York, London 1961, S. 253 ff.
- [142] D. Perrin, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 28, 529 (1963).
- [143] D. Zipser u. D. Perrin, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 28, 533 (1963).
- [144] J. A. Olson u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 197, 67 (1952).
- [145] H. Sund, Acta chem. scand. 17, 5102 (1963).
- [146] H. Kubo, T. Yamano, M. Iwatsubo, H. Watari, T. Soyama, J. Shiraishi, S. Sawada, N. Kawashima, S. Mitani u. K. Ito, Bull. Soc. Chim. biol. 40, 431 (1958); C. Frieden, J. biol. Chemistry 237, 2396 (1962); J. E. Churchich u. F. Wold, Biochemistry 2, 781 (1963).
- [147] C. Frieden, J. biol. Chemistry 234, 809 u. 815 (1959).
- [148] H. Sund in M. Demole: Verh. 4e Congrès de la Fédération intern. du Diabète. Éditions Médecine et Hygiène, Genf 1961, Bd. 1, S. 726.
- [149] J. Wolff, J. biol. Chemistry 237, 230 (1962).
- [150] G. M. Tomkins, K. L. Yielding u. J. Curran, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 270 (1961); G. M. Tomkins u. E. S. Maxwell, Annu. Rev. Biochem. 32, 677 (1963).

#### 4. Aldolase aus Kaninchenskelettmuskel [85–95]

Aldolase katalysiert die Umwandlung von Fructose-1,6-diphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glyceraldehyd-3-phosphat. Das Enzymmolekül ist nahezu kugelförmig und besitzt einen relativ hohen Helixgehalt, sein Molekulargewicht beträgt 142000 [88]. Bei pH-Werten unter 3 beobachtet man einen Abfall des Sedimentationskoeffizienten von 7,9 S (nativ) auf 2,0 S; das Aldolase-Molekül zerfällt unter weitgehender Entfaltung und Verlust der Helixstruktur in drei gleichgroße Untereinheiten [88,89]. Diese Dissoziation erfolgt auch in Gegenwart von Dodecylsulfat [88], Harnstoff [88] oder Guanidin-hydrochlorid [90] sowie nach Substitution mit Bernsteinsäureanhydrid [90].

Nach Säure- oder Harnstoffeinwirkung kann Aldolase durch Dialyse oder rasches Verdünnen mit Pufferlösung bis zu 100 % reaktiviert werden [88,89,91]. Das renaturierte Molekül stimmt in seinen hydrodynamischen, optischen, immunologischen und chemischen Eigenschaften mit dem nativen Molekül überein. Die Assoziation verläuft wahrscheinlich in zwei Stufen: relativ rasch wird eine Komponente gebildet, die schon aus drei Untereinheiten besteht, aber noch weitgehend entfaltet ist. Diese wandelt sich dann in das native kompakte Molekül um, wobei die Enzymaktivität wiederkehrt [89]. Die kinetische Analyse der Reaktivierung weist darauf hin, daß der erste Schritt nicht geschwindigkeitsbestimmend ist [88,89]. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf 12,6 zerfällt das Aldolase-Molekül in sechs gleichgroße Teilchen, die wahrscheinlich den Polypeptidketten entsprechen. Eine Reaktivierung nach dieser Dissoziation konnte bisher nicht beobachtet werden [92]. Gleichung (2) gibt das Dissoziationsschema der Aldolase (=A) an [92].



Neuere Untersuchungen ergaben als N-terminale Gruppen 4 Mol Prolin pro Mol Aldolase. Dieser Wert wird als Minimum betrachtet und stützt die Annahme, daß mehr als drei Polypeptidketten vorliegen [90,92a]. Mit Carboxypeptidase lassen sich drei C-terminale Tyrosylreste abspalten [93]. Die Frage nach der Gleichartigkeit der Polypeptidketten ist besonders deshalb interessant, weil das Aldolase-Molekül aus sechs Polypeptidketten besteht, aber nur ein aktives Zentrum besitzt [91,94].

#### 5. Milchsäure-Dehydrogenase und das Isozym-Problem [95–114]

Milchsäure-Dehydrogenasen (LDH) kommen in allen tierischen Geweben vor und katalysieren die reversible pyridinnucleotid-abhängige Umwandlung von Milchsäure in Brenztraubensäure. Die Enzyme besitzen ein Molekulargewicht von etwa 130000 [95–98]. 1952 wurde beobachtet, daß Rinderherz-LDH aus zwei enzymatisch aktiven Komponenten besteht [95]. *Wieland und Pfele-*

*rer* zeigten dann später [99], daß in verschiedenen Geweben bis zu fünf LDH-Komponenten auftreten können, nur in seltenen Fällen ist es eine einzige. Diese LDHs lassen sich elektrophoretisch trennen und unterscheiden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung, Temperaturempfindlichkeit sowie in den enzymatischen und immunologischen Eigenschaften [99–108,110d].

*Appella und Markert* zeigten, daß LDH in Gegenwart von 5 M Guanidin-hydrochlorid in vier Untereinheiten vom Molekulargewicht 34000 dissoziiert [96]. Durch diese Erkenntnis wurde das Phänomen der Isozyme verständlich. Jede Species besitzt zwei LDHs, die aus jeweils vier gleichartigen Untereinheiten bestehen [96,100,103,105,106,109]. Der eine LDH-Typ kommt vorwiegend im Muskel (M-Typ), der andere dagegen vorwiegend im Herzen (H-Typ) vor; die Untereinheiten bezeichnet man entsprechend mit M und H, so daß die LDH-Formeln M<sub>4</sub> bzw. H<sub>4</sub> lauten. Durch Kombination von M- und H-Untereinheiten ergeben sich – in vivo und in vitro – maximal fünf LDH-Isozyme: H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, HM<sub>3</sub> und M<sub>4</sub>. Die Fingerprint-Analyse bestätigte diese Vorstellungen [102,109,110,110a].

Die Dissoziation in die Untereinheiten ist unter Reaktivierung weitgehend reversibel [110c]. In vitro gelingt die Hybridisierung zwischen Milchsäure-Dehydrogenasen verschiedener Herkunft [110d], z. B. zwischen der H<sub>4</sub>-LDH vom Rind mit der H<sub>4</sub>-LDH vom Huhn oder der M<sub>4</sub>-LDH vom Frosch. Eine Hybridisierung zwischen H<sub>4</sub>- und M<sub>4</sub>-LDH vom Frosch ist dagegen nicht möglich. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, daß die Untereinheiten für sich enzymatisch aktiv sind. Die Wechselwirkung zwischen den vier Untereinheiten ist wahrscheinlich essentiell für die Bildung derjenigen Konformation, die für die Enzymkatalyse erforderlich ist.

Die enzymatischen und immunologischen Eigenschaften der hybriden LDH-Moleküle H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub> und HM<sub>3</sub> setzen sich etwa additiv aus den Anteilen an H- und M-Untereinheiten zusammen [102–104,109,110d]. So ist z. B. die Substrathemmung bei der H<sub>4</sub>-LDH stark, bei der M<sub>4</sub>-LDH dagegen schwach; für die hybriden Enzymmoleküle liegt sie zwischen den Extremen [101–103,107]. Entsprechend dieser Eigenschaft begünstigt die Gegenwart des H-Typs in der Zelle die aerobe Brenztraubensäureoxidation und findet sich vornehmlich im „aeroben“ Gewebe (Herzmuskel). Der M-Typ dagegen begünstigt die anaerobe, pyridinnucleotid-abhängige Milchsäurebildung und kommt vornehmlich im „anaeroben“ Gewebe (Skelettmuskel) vor [102,103,107,112].

Das LDH-Isozymmuster ändert sich während der Ontogenese [102,103,112–114]. Im embryonalen Stadium läßt sich je nach Species ausschließlich oder vorwiegend entweder H- oder M-LDH nachweisen („embryonale LDH“). Mit zu-

[151] H. Sund, Acta chem. scand. 15, 940 (1961).

[152] C. Frieden, J. biol. Chemistry 238, 3286 (1963).

[153] H. Sund: Struktur und Wirkungsweise der Glutaminsäuredehydrogenase aus Rinderleber. Ein Beitrag zur Beziehung zwischen Quartärstruktur und Enzymeigenschaften bei Proteinen. Habilitationsschrift, Universität Freiburg 1964.

[154] G. M. Tomkins, K. L. Yielding, J. F. Curran, M. R. Summers u. M. W. Bitensky, J. biol. Chemistry 240, 3793 (1965).

[155] Vgl. auch G. M. Tomkins, K. L. Yielding u. J. F. Curran, J. biol. Chemistry 237, 1704 (1962); P. M. Bayley u. G. K. Radda, Biochem. J. 94, 31 P (1965).

[156] B. Jirgensons, J. Amer. chem. Soc. 83, 3161 (1961); H. F. Fisher, L. L. McGregor u. D. G. Cross, Biochim. biophysica Acta 65, 175 (1962); E. Marler u. C. Tanford, J. biol. Chemistry 239, 4217 (1964); H. Sund, Biochim. biophysica Acta, im Druck.

[157] H. Sund, Angew. Chem. 76, 954 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 802 (1964).

[158] F. Lynen, Federat. Proc. 20, 941 (1961); F. Lynen in T. Bücher: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen. Eigenverlag der Wiener medizinischen Akademie für ärztliche Fortbildung, Wien 1962, S. 12; Angew. Chem. 77, 929 (1965).

[159] A. Hagen, Dissertation, Universität München 1963.

[160] A. Hagen u. P. H. Hofschneider in M. Tittbach: Electron Microscopy 1964 (Proc. 3rd European Regional Conference). Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prag 1964, Bd. B, S. 69.

[161] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, J. biol. Chemistry 238, 30 (1963); L. J. Reed, Abstracts, 6th int. Congress of Biochemistry, New York 1964, S. 523; H. Fernandez-Moran, L. J. Reed, M. Koike u. C. R. Willms, Science (Washington) 145, 930 (1964).

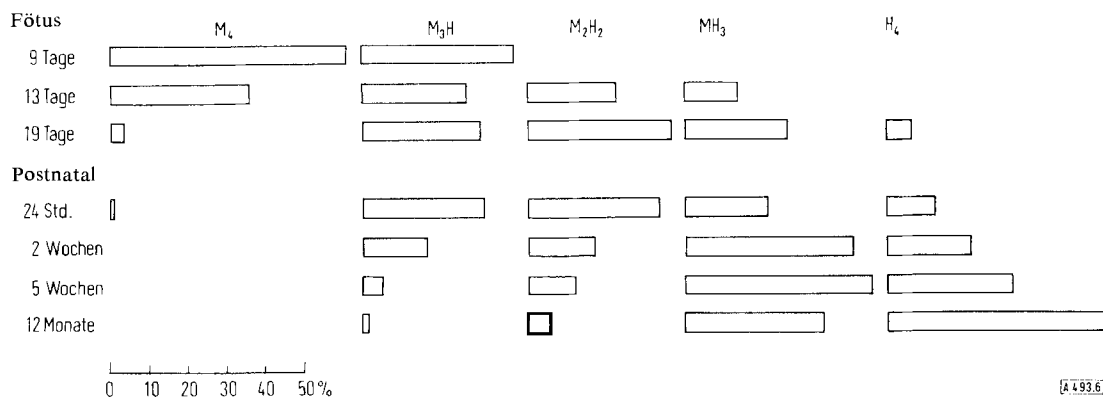


Abb. 6. LDH-Isozymmuster des Rattenherzens während der Ontogenese (Werte nach Fine et al. [114]).

nehmender Zelldifferenzierung wird dann ein Isozymmuster gebildet, das der Stoffwechsellaage der differenzierten Zelle Rechnung trägt (Abb. 6). Man nimmt an, daß die Synthese der H- und M-Untereinheiten unter getrennter genetischer Kontrolle steht [102].

#### 6. Glykogen-Phosphorylase aus Kaninchenskelettmuskel [115–124]

Glykogen-Phosphorylase tritt in zwei Formen a und b auf, die enzymatisch ineinander umzuwandeln sind: eine Phosphorylase-b-Kinase überführt das b-Enzym mit ATP unter Einbau von vier Mol Phosphat in das a-Enzym, das durch eine Phosphorylase-a-Phosphatase wieder in das b-Enzym umgewandelt werden kann [115]. Aus Sedimentations- und Diffusionsmessungen wurde das Molekulargewicht des a-Enzyms zu 495000, das des b-Enzyms zu 242000 bestimmt. Bei der Bildung des a-Enzyms aus dem b-Enzym tritt also neben der Phosphorylierung eine Dimerisierung ein [116].

Bei der Einwirkung von p-Chlorquecksilberbenzoat dissoziieren beide Enzyme in Untereinheiten vom Molekulargewicht etwa 135000. Das a-Enzym enthält vier, das b-Enzym zwei dieser Untereinheiten [117, 118]. Entsprechend diesem Bauprinzip bindet ein Molekül a-Enzym vier Moleküle AMP und enthält vier Moleküle Pyridoxal-5'-phosphat, während es beim b-Enzym jeweils nur zwei Moleküle sind [115, 119–121]. Bei der Bildung von a-Enzym aus b-Enzym werden die vier neu in das Molekül eintretenden Phosphatgruppen, d. h. je eine pro Untereinheit, durch Veresterung von Serylresten gebunden [115]. Wahrscheinlich ist das kovalent an Lysylreste gebundene Pyridoxalphosphat nur für die Konformation der Proteinmoleküle verantwortlich und an der eigentlichen Enzymreaktion nicht beteiligt [122]. Seine Entfernung aus dem Molekül führt zur reversiblen Inaktivierung, und gleichzeitig ändert sich die Proteinkonformation: das a-Enzym zerfällt zu einem hohen Anteil in die Untereinheiten. Auch die Spaltung mit p-Chlorquecksilberbenzoat erfolgt reversibel: Cystein stellt sowohl die Enzymaktivität als auch den ursprünglichen Assoziationszustand wieder her [117].

[162] Zu anderen  $\alpha$ -Ketonsäure-Dehydrogenase-Komplexen siehe D. R. Sanadi in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1963, Bd. 7, S. 307.

[163] F. Märki u. C. Martius, Biochem. Z. 333, 111 (1960).

[164] J. Moyle u. M. Dixon, Biochem. J. 63, 548 (1956); G. Siebert, J. Dubuc, R. C. Warner u. G. W. E. Plaut, J. biol. Chemistry 226, 965 (1957); T. A. Langan, Acta chem. scand. 14, 936 (1960).

[165] J. van Eys, B. J. Nuenke u. M. K. Patterson, J. biol. Chemistry 234, 2308 (1959).

[166] G. Pfeleiderer u. F. Auricchio, Biochem. biophys. Res. Commun. 16, 53 (1964).

Bei hohen Salzkonzentrationen zerfällt Phosphorylase a reversibel in das „halbe Molekül“, dessen Molekulargewicht dem des b-Enzyms entspricht [123, 123a]. Mit dem Aufbau aus zwei Untereinheiten [124] konnte das Auftreten von drei Isozymen für Phosphorylase b erklärt werden. Das relativ hohe Molekulargewicht der Untereinheit (135000) läßt die Möglichkeit offen, daß sie mehrere Polypeptidketten enthält.

#### 7. $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* [125–143]

$\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* katalysiert die Hydrolyse von Laktose zu Galaktose und Glucose. Das Molekulargewicht des Proteins liegt bei 520000, der Sedimentationskoeffizient beträgt etwa 16 S [125–128]. Nach den hydrodynamischen Parametern läßt sich das Molekül als abgeplattetes Rotationsellipsoid beschreiben [125], dessen Achsenverhältnis bei etwa drei liegt, wenn man eine 30-proz. Hydratation annimmt. Länge und Höhe des Moleküls errechnen sich dann zu etwa 150 Å und 50 Å [127]. Auch bei extremen Verdünnungen bleibt das Molekulargewicht erhalten [129] und ist mit großer Wahrscheinlichkeit auch in vivo für das enzymatisch aktive Protein charakteristisch [130, 131].

In Gegenwart von Harnstoff oder Guanidin-hydrochlorid dissoziiert  $\beta$ -Galaktosidase reversibel [128] in vier, nach Sedimentations- und Diffusionsmessungen gleichgroße Untereinheiten [132] (Molekulargewicht etwa 130000); so daß die Bildung von Hybriden aus „leichtem“ Enzym ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) und „schwerem“ Enzym ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) möglich war. Durch Vergleich der Dichten von hybriden, leichten und schweren Molekülen konnte ebenfalls gezeigt werden, daß das  $\beta$ -Galaktosidase-Molekül aus vier gleichgroßen Untereinheiten besteht [128]. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen [133, 134] sind die vier Untereinheiten im Quadrat angeordnet (Abb. 7). Die Moleküldimensionen betragen etwa 120 Å und 70 Å [133]. Diese und das aus

[167] W. C. Deal u. W. H. Holleman, Federat. Proc. 23, 264 (1964).

[168] C. J. R. Thorne, Biochim. biophysica Acta 59, 624 (1962).

[169] C. J. R. Thorne u. N. O. Kaplan, J. biol. Chemistry 238, 1861 (1963).

[170] C. S. Vestling, E. D. Ihnen u. A. C. Boyer in N. M. Sissakian: Proc., 5th int. Congress of Biochemistry, Moskau 1961. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, Bd. 9, S. 163.

[171] S. Englard u. H. H. Breiger, Biochim. biophysica Acta 56, 571 (1962); M. Cassman u. S. Englard, Federat. Proc. 23, 427 (1964).

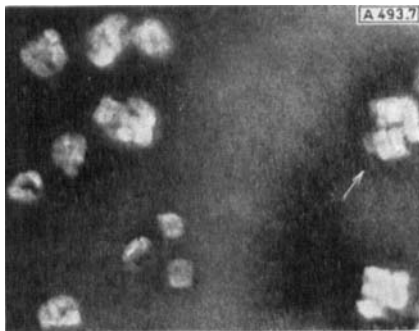


Abb. 7.  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* (nach Mölbert, Weber u. Wallenfels [134]). Vergrößerung 200000-fach. Der Pfeil markiert ein aus vier Untereinheiten bestehendes  $\beta$ -Galaktosidase-Molekül.

ihnen abgeschätzte Molekulargewicht von 500 000 [133, 134] stimmen sehr gut überein mit den aus hydrodynamischen Daten errechneten Werten.

Bei der Oxidation mit Perameisensäure fällt das Molekulargewicht auf etwa 35 000 ab [132, 135]. In einem Gemisch von Ameisensäure und Essigsäure dissoziiert das  $\beta$ -Galaktosidase-Molekül ebenfalls bis zu den Polypeptidketten vom Molekulargewicht etwa 35 000 [136], d.h. jede Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase besteht aus drei oder vier Polypeptidketten, die nicht durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Auch diese Dissoziation ist wenigstens zum Teil reversibel.

Auf Grund der Fingerprint-Analyse liegt das „Molekulargewicht“ der Polypeptidkette bei etwa 40 000 [137] oder 60 000 [137, 138]. Sollte der höhere Wert zutreffen, so muß aus der Diskrepanz zwischen diesem und dem mit hydrodynamischen Methoden gefundenen wesentlich niedrigeren Wert geschlossen werden, daß die Polypeptidketten innerhalb der Untereinheit nicht gleichartig sind [136, 138a].

Das  $\beta$ -Galaktosidase-Molekül besitzt vier aktive Zentren [139], die man den vier Untereinheiten zuordnen kann. Die Zahl der Polypeptidketten übersteigt jedoch die Zahl der aktiven Zentren [140].

Aus einigen *E. coli*-Mutanten können enzymatisch inaktive  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine isoliert werden [142], deren Molekulargewichte in den meisten Fällen kleiner sind als das der enzymatisch aktiven  $\beta$ -Galaktosidase. Hier scheint durch Mutation die Möglichkeit zur „richtigen“ Assoziation verlorengegangen zu sein. In einigen Fällen war es möglich, durch Komplementation zwischen zwei verschiedenen, enzymatisch inaktiven Präparaten aktive  $\beta$ -Galaktosidase zu erhalten [142, 143]; das Komplementationsenzym ist wie das normale Enzym durch einen Sedimentationskoeffizienten von 16 S charakterisiert.

## 8. Glutaminsäure-Dehydrogenase aus Rinderleber

Glutaminsäure-Dehydrogenase katalysiert die reversible oxidative Desaminierung der Glutaminsäure zur  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure. Das Proteinmolekül dissoziiert beim Verdünnen spontan und reversibel, was sein anomales Sedimentationsverhalten [144] erklärt. Das im assoziierten Zustand langgestreckte Teilchen mit einem Molekulargewicht von  $2 \times 10^6$  [29, 145] steht im Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht mit seinen Untereinheiten vom Molekulargewicht  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$  und  $2,5 \times 10^5$ , die alle enzymatisch aktiv sind [29, 146]. Nucleotide, Phenanthro-

lin, anorganische Ionen, Steroide, Thyroxin, Sulfonharnstoff-Derivate oder auch das Coenzym können das Gleichgewicht in beiden Richtungen beeinflussen und sind als Inhibitoren oder Aktivatoren der Enzymreaktion wirksam [29, 147–150]. Durch die Dissoziation nimmt die Bindungskapazität für das Coenzym zu [151, 153, 155]. In der Leber ist Glutaminsäure-Dehydrogenase ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert. Die Konzentration des Enzyms liegt hier bei 2 bis 9 mg/ml, d.h. in einem Bereich, in dem das Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht und seine Beeinflussung durch die verschiedenen Verbindungen eine Rolle spielen [29, 153].

Glutaminsäure-Dehydrogenase besitzt keine absolute Substratspezifität für Glutaminsäure, sondern kann, wenn auch wesentlich langsamer, andere Aminosäuren umsetzen. Besonders eingehend wurde die Alanin-Oxidation im Zusammenhang mit der Quartärstruktur untersucht [150]; Alle Verbindungen oder Versuchsbedingungen, die die spontane Dissoziation in die Untereinheiten begünstigen, aktivieren die Alanin-Oxidation und hemmen die Glutaminsäure-Oxidation. Alle Verbindungen dagegen, die die spontane Assoziation begünstigen, aktivieren die Oxidation der Glutaminsäure und hemmen die des Alanins. Entgegen früheren Ansichten [147, 150] ist der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Einflüssen auf Quartärstruktur und Enzymaktivität darin zu sehen, daß die Verbindungen mit den funktionellen Gruppen des Enzymmoleküls reagieren und/oder dessen Konformation ändern. Hierdurch werden sowohl das Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht als auch die Enzymkatalyse beeinflusst, ohne daß ein direkter Zusammenhang zwischen Teilchengröße und Enzymaktivität besteht: beide Phänomene sind lediglich die Folgen der gleichen Ursache [29, 152–154].

Dissoziiert ein Protein spontan in Untereinheiten oder wird die Dissoziation durch Bedingungen hervorgerufen, unter denen die Konformation sich nur unwesentlich ändert, dann kann man durch Viscositätsmessungen Aufschlüsse über die geometrische Anordnung der Untereinheiten gewinnen: ein Abfall der Viscositätszahl bedeutet eine Abnahme, die Zunahme eine Erhöhung der geometrischen Anisotropie. Diese Methode führt nur bei nicht-globulären Proteinen zu einem Ergebnis, da sich bei der Dissoziation globulärer Proteine die Viscosität zu wenig ändert [153].

Die Untereinheiten der Glutaminsäure-Dehydrogenase besitzen eine kleinere Viscositätszahl und sind nur etwa halb so lang wie das ursprüngliche Molekül [29, 145, 153]. Betrachtet man die Glutaminsäure-Dehydrogenase als Rotationsellipsoid, dann besagt dieser Befund, daß die Dissoziation durch Querspaltung erfolgt. Demnach werden die Untereinheiten im assoziierten Zustand durch relativ kleine Bereiche und damit durch relativ wenige Bindungen zusammengehalten. Damit kann vielleicht die spontan erfolgende Dissoziation erklärt werden (vgl. Abb. 8).

In Gegenwart von Harnstoff oder langkettigen Alkylsulfaten sowie bei extremen pH-Werten dissoziiert die Untereinheit vom Molekulargewicht 250 000 unter

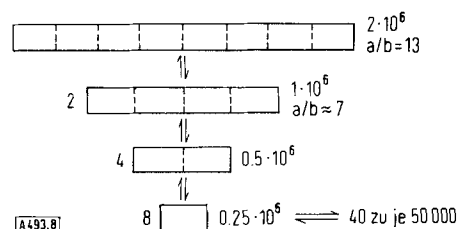


Abb. 8. Schematische Darstellung des Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichtes von Glutaminsäure-Dehydrogenase aus Rinderleber (nach Sund [29]).  $a/b$  = Achsenverhältnis.

Verlust der nativen Konformation und der Enzymaktivität in die Polypeptidketten. Diese besitzen ein Molekulargewicht von etwa 50000 und sind auf Grund der Endgruppenanalyse gleichartig [29, 149, 156]. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch diese Dissoziation unter Reaktivierung weitgehend reversibel ist [157] (vgl. Abb. 8).

## 9. Multienzym-Komplexe<sup>[158–162]</sup>

Multienzym-Komplexe, in denen die einzelnen Enzyme durch Nebenvalenzbindungen zusammengehalten werden, katalysieren mehrere aufeinanderfolgende Schritte einer Reaktionskette. Das Substrat und seine Folgeprodukte verlassen dabei den Enzym-Komplex nicht, sondern werden von einer Reaktionsstelle zur anderen „weitergereicht“. Wahrscheinlich kommen derartige Komplexe in vivo relativ häufig vor. Ob sie sich isolieren lassen, hängt von ihrer Stabilität und den Isolierungsbedingungen ab. Der Fettsäure-Synthetase-Komplex aus Hefe und der Brenztraubensäure-Dehydrogenase-Komplex aus *E. coli* wurden bisher am eingehendsten untersucht.

Nach Lynen und Mitarbeitern<sup>[158, 159]</sup> katalysiert die Fettsäure-Synthetase in sieben Teilreaktionen die Synthese von Fettsäuren aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Der Multienzym-Komplex besitzt ein Molekulargewicht von  $2,3 \times 10^6$  und besteht aus sieben verschiedenen Untereinheiten (Molekulargewicht 110000), deren jede dreimal vorkommt. Elektronenmikroskopisch stellt sich der Fettsäure-Synthetase-Komplex als hohles, ovales, von einem Äquatorialring umgebenes Teilchen dar (Abb. 9). Der Längsdurchmesser der Teilchen beträgt etwa 250 Å, der Querdurchmesser etwa 210 Å<sup>[160]</sup>.

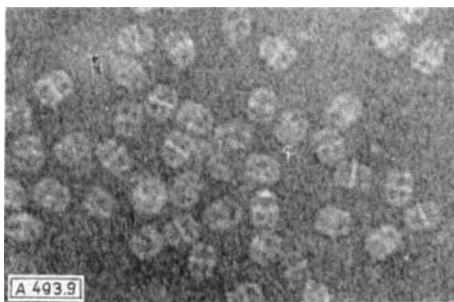


Abb. 9. Fettsäure-Synthetase aus Hefe (nach Hagen u. Hofschneider [160]). Vergrößerung 200000-fach.

Der Brenztraubensäure-Dehydrogenase-Komplex aus *E. coli* katalysiert die in wenigstens drei Schritten ablaufende Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetyl-CoA. Nach Reed und Mitarbeitern<sup>[161, 162]</sup> läßt sich dieser Multienzym-Komplex vom Molekulargewicht  $4,8 \cdot 10^6$  in drei enzymatisch aktive Komponenten zerlegen: Pyruvat-Decarboxylase (Molekulargewicht 183000), Liponsäure-Reduktase-Transacetylase (Molekulargewicht  $1,6 \times 10^6$ ) und Dihydroliponsäure-Dehydrogenase (Molekulargewicht 112000). Die Liponsäure-Reduktase-Transacetylase besteht aus 64 Polypeptidketten vom Molekulargewicht etwa 27000 und ist im Multienzymkomplex einmal vertreten, die Decarboxylase und die Dihydroliponsäure-Dehydrogenase dagegen sechzehn- bzw. achtmal. Letztere enthält zwei Polypeptidketten. Die Quartärstruktur der Decarboxylase wurde noch nicht untersucht.

Der Brenztraubensäure-Dehydrogenase-Komplex besitzt nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen wahrscheinlich die Gestalt eines Dekaeders mit einem Durchmesser von

300 bis 400 Å und einer Höhe von 200 bis 250 Å. Um die zentral gelegene Liponsäure-Reduktase-Transacetylase sind Decarboxylase und Dihydroliponsäure-Dehydrogenase in Form übereinanderliegender oktagonaler Ringe angeordnet<sup>[161]</sup>.

## 10. Weitere pyridinnucleotid-abhängige Dehydrogenasen

Tabelle 2 gibt eine Übersicht der Molekulargewichte, Coenzymbindung und Quartärstruktur der bisher untersuchten Dehydrogenasen. Aus ihr geht hervor, daß das Molekulargewicht der Polypeptidkette und das Äquivalentgewicht einer Coenzymbindungsstelle etwa gleich groß sind. Die meisten Dehydrogenasen bestehen aus Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 30000 bis 50000. Wahrscheinlich gilt dies auch für andere bisher noch nicht untersuchte Dehydrogenasen<sup>[153, 166, 193a]</sup>.

[172] A. Ehrenberg u. K. Dalziel, Acta chem. scand. 12, 465 (1958); H. Theorell u. A. D. Winer, Arch. Biochem. Biophysics 83, 291 (1959); T. K. Li u. B. L. Vallee, Biochemistry 3, 869 (1964); T. K. Li, D. D. Ulmer u. B. L. Vallee, Biochemistry 1, 114 (1962).

[173] H. Sund u. H. Theorell in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrback: The Enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1963, Bd. 7, S. 25.

[174] J. Harris, Nature (London) 203, 30 (1964).

[175] V. Massey, T. Hofmann u. G. Palmer, J. biol. Chemistry 237, 3820 (1962).

[176] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 16 (1962); J. Matthews u. L. J. Reed, J. biol. Chemistry 238, 1869 (1963).

[177] R. F. Colman u. S. Black, Federat. Proc. 23, 428 (1964); J. biol. Chemistry 240, 1796 (1965); V. Massey u. C. H. Williams, J. biol. Chemistry 240, 4470 (1965).

[178] W. F. Harrington u. G. M. Karr, J. molecular Biol. 13, 885 (1965).

[179] J. B. Fox u. W. B. Dandliker, J. biol. Chemistry 218, 53 (1956) u. 221, 1005 (1956); S. F. Velick, J. biol. Chemistry 233, 1455 (1958); H. G. Elias, A. Garbe u. W. Lamprecht, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 22 (1960); J. Harris, B. P. Meriwether u. J. H. Park, Nature 198, 154 (1963); A. H. Gold u. H. L. Segal, Biochemistry 3, 778 (1964); A. L. Murdock u. O. J. Koeppe, J. biol. Chemistry 239, 1983 (1964); W. Ferdinand, Biochem. J. 92, 578 (1964).

[180] J. F. Taylor u. C. Lowry, Biochim. biophysica Acta 20, 109 (1956).

[181] E. L. Taylor, B. P. Meriwether u. J. H. Park, J. biol. Chemistry 238, 734 (1963).

[181a] J. I. Harris in T. W. Goodwin, J. I. Harris u. B. S. Hartley: Structure and Activity of Enzymes. Academic Press, London, New York 1964, S. 97; J. I. Harris u. R. N. Perham, J. molecular Biol. 13, 876 (1965).

[182] S. F. Velick, J. biol. Chemistry 203, 563 (1953).

[183] Y. D. Halsey u. H. Neurath, J. biol. Chemistry 217, 247 (1955).

[184] A. Stockell, J. biol. Chemistry 234, 1286 (1959).

[185] R. N. Perham u. J. I. Harris, J. molecular Biol. 7, 316 (1963).

[186] G. Pfeleiderer, D. Jeckel u. T. Wieland, Biochem. Z. 328, 187 (1956).

[187] S. F. Velick, J. biol. Chemistry 233, 1455 (1958).

[188] J. van Eys, F. E. Stolzenbach, L. Sherwood u. N. O. Kaplan, Biochim. biophysica Acta 27, 63 (1958).

[189] R. H. McKay u. N. O. Kaplan, Biochim. biophysica Acta 79, 273 (1964).

[189a] J. J. Holbrook u. G. Pfeleiderer, Biochem. Z. 342, 111 (1965); A. H. Gold u. H. L. Segal, Biochemistry 4, 1506 (1965).

[190] J. E. Hayes u. S. F. Velick, J. biol. Chemistry 207, 225 (1954); K. Wallenfels u. H. Sund, Biochem. Z. 329, 59 (1957); H. Sund, Biochem. Z. 333, 205 (1960); P. J. Snodgrass, B. L. Vallee u. F. L. Hoch, J. biol. Chemistry 235, 504 (1960); J. H. R. Kägi u. B. L. Vallee, J. biol. Chemistry 235, 3188 (1960); R. T. Hersh, Biochim. biophysica Acta 58, 353 (1962); A. Arens, H. Sund u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 337, 1 (1963).

Im allgemeinen ordnet man jeder Coenzymbindungsstelle ein „aktives Zentrum“ zu. Damit stellt sich die Frage nach der kleinsten enzymatisch aktiven Einheit. Es liegt nahe anzunehmen, daß jede Polypeptidkette als Träger einer Coenzymbindungsstelle enzymatisch aktiv ist, vorausgesetzt, daß die einzelne Polypeptidkette in der gleichen räumlichen Anordnung vorliegt wie im assoziierten Molekül. Das trifft aber offenbar nicht zu. In den bisher untersuchten Fällen konnte man im nativen Zustand nur das assoziierte Molekül beobachten, es gelang nicht, Polypeptidketten in enzymatisch aktiver Form zu erhalten. Danach ist anzunehmen, daß sich erst durch das Zusammenwirken mehrerer Polypeptidketten eine hinreichend große Zahl von Nebenvalenzbindungen bilden kann, die jene für die Enzymkatalyse erforderliche Konformation der Polypeptidketten im assoziierten Molekül stabilisieren. Es könnte dann nur das assoziierte Molekül und nicht die Polypeptidkette enzymatisch aktiv sein. Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit, daß an einem aktiven Zentrum mehrere Polypeptidketten beteiligt sind. In diesem Fall könnte ohnehin nur das assoziierte Molekül Enzymaktivität besitzen. Es ist zu vermuten, daß sich – wenigstens in einigen Fällen – die aktiven Zentren im Sinne einer allosterischen Umwandlung gegenseitig beeinflussen (vgl. Abschnitt V, 4).

## V. Diskussion

### 1. Universalität

Die Molekulargewichte der Proteine können innerhalb weiter Grenzen – von wenigen Tausend bis zu mehreren Millionen – variieren. Bei Werten über  $10^5$  sind die Proteine definierte Komplexe aus mehreren Polypeptidketten. Das Molekulargewicht der Polypeptidketten liegt im allgemeinen nicht über 50000. In einigen Fällen (z. B. Hämocyanine, Lipovitellin) scheint das bisher erhaltene Dissoziationsprodukt noch nicht der Polypeptidkette zu entsprechen (vgl. Abschnitt IV und Tabelle 1). Bei anderen Proteinen wie der Phosphorylase, der RNS-Polymerase oder dem Myosin (vgl. Tabellen 1 und 2 sowie [194]) sind die Methoden zur Untersuchung der Quartärstruktur noch nicht ausgeschöpft. Hier ist

besonders an solche Methoden zu denken, durch die sehr stabile Nebenvalenzbindungen oder nicht-peptidische Kovalenzbindungen nachgewiesen werden können. So bestehen z. B. beim Collagen die Untereinheiten aus mehreren durch Kohlenhydrat-Komponenten zusammengehaltenen Polypeptidketten [194a]. Wie die Beispiele Serumalbumin [195] und Hefe-Enolase [196] zeigen, existieren – wenn auch selten – Polypeptidketten vom Molekulargewicht etwa 70000.

Die Quartärstruktur ist ein allgemeines Bauprinzip der Proteine, denn sie läßt sich bei verschiedenartigen Proteinen nachweisen: bei Enzymen und respiratorischen Proteinen mit relativ kleinem als auch relativ hohem Molekulargewicht, bei Pflanzensamenglobulinen, Serumproteinen und den Strukturproteinen wie dem Kollagen [43, 194a, 197] oder den Geißeln von Bakterien (z. B. Flagellin von *Salmonella typhimurium* und *Bacillus pumilus* [198]), bei Viren, Multienzym-Komplexen und den Ribosomen (vgl. Tabellen 1 und 2, Abschnitt IV, 9 und [199]).

In den meisten Fällen, besonders bei den globulären Proteinen, werden die Polypeptidketten ausschließlich durch Nebenvalenzbindungen zusammengehalten; die Verknüpfung von Polypeptidketten durch Disulfidbrücken tritt seltener auf [200]. Aus der Wirksamkeit der verschiedenen Denaturierungsmittel ist zu folgern, daß das Ausmaß der Stabilisierung der Quartärstruktur bei den einzelnen Proteinen sehr unterschiedlich sein kann. Mit demselben Denaturierungsmittel erreicht man in einigen Fällen bereits eine Dissoziation in die Polypeptidketten, in anderen Fällen dagegen nur die Bildung von Untereinheiten oder überhaupt keine Dissoziation.

[194a] Collagen (Molekulargewicht etwa 300000) besteht aus drei Untereinheiten, im allgemeinen aus zwei  $\alpha_1$ -Untereinheiten und einer  $\alpha_2$ -Untereinheit. Jede Untereinheit enthält mindestens vier Polypeptidketten, die durch Esterbindungen oder esterähnliche Bindungen zusammengehalten werden. Der die Polypeptidketten zusammenhaltende Polyhydroxyaldehyd wurde als Collagenalose bezeichnet [43, 194b].

[194b] J. A. Petruska u. A. J. Hodge, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 871 (1964); O. O. Blumenfeld, M. Rojkind u. P. M. Gallop, Biochemistry 4, 1780 (1965); K. Kühn, C. Tkocz, B. Zimmermann u. G. Beier, Nature (London) 208, 685 (1965); W. Grassmann, J. Engel, K. Hannig, H. Hörmann, K. Kühn u. A. Nordwig, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 23, 195 (1965).

[195] J. Stauff u. R. Jaenicke, Kolloid-Z. 175, 1 (1961).

[196] B. G. Malmström in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1961, Bd. 5, S. 471.

[197] W. F. Harrington u. P. H. von Hippel, Advances Protein Chem. 16, 1 (1961).

[198] D. Abram u. H. Koffler, J. molecular Biol. 9, 168 (1964); S. Asakura, G. Eguchi u. T. Ino, J. molecular Biol. 10, 42 (1964).

[199] J. P. Waller, J. molecular Biol. 10, 319 (1964).

[200] Durch spezifische hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen wird Chymotrypsinogen in Chymotrypsin übergeführt. Bei dieser „Aktivierung“ entsteht aus dem einkettigen Chymotrypsinogen das aus drei Polypeptidketten bestehende Chymotrypsin. Die drei Polypeptidketten sind durch Disulfidbrücken verbunden [201]. Eine analoge Bildung des aus zwei Polypeptidketten bestehenden Insulins aus einer einkettigen Vorstufe wurde diskutiert [202]. Kürzlich wurde jedoch gezeigt [R. E. Humbel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 853 (1965)], daß die Polypeptidketten des Insulins getrennt voneinander synthetisiert werden.

[201] H. Neurath, Sci. American 211, Nr. 6, S. 68 (1964).

[202] W. J. Dreyer zitiert in M. Vaughan u. D. Steinberg, Advances Protein Chem. 14, 115 (1959).

[191] R. W. Barratt, Genetics 46, 849 (1961); R. W. Barratt u. W. N. Strickland, Arch. Biochem. Biophysics 102, 66 (1963).

[192] J. R. S. Fincham u. A. Coddington, J. molecular Biol. 6, 361 (1963).

[193] R. W. Horne u. G. D. Greville, J. molecular Biol. 6, 506 (1963).

[193a] Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen wurde dieses Prinzip auch bei Äpfelsäure-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* [A. Yoshida, J. biol. Chemistry 240, 1113 (1965)] und *Neurospora crassa* [K. D. Munkres u. F. M. Richards, Arch. Biochem. Biophysics 109, 466 (1965); K. D. Munkres, Biochemistry 4, 2180, 2186 (1965)], bei Galaktose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas saccharophila* [G. Kurz u. K. Weber, unveröffentlichte Versuche] sowie bei Alanin-Dehydrogenase [A. Yoshida, Biochim. biophysica Acta 105, 70 (1965)] und Milchsäure-Dehydrogenase [A. Yoshida u. E. Freese, Biochim. biophysica Acta 99, 56 (1965)] aus *Bacillus subtilis* aufgefunden.

[194] D. R. Kominz, Biochim. biophysica Acta 51, 456 (1961); E. F. Woods, S. Himmelfarb u. W. F. Harrington, J. biol. Chemistry 238, 2374 (1963); S. Lowey, J. Kucera u. A. Holtzer, J. molecular Biol. 7, 234 (1963).

Entsprechend den Gleichungen (1a)–(1c) (vgl. Einleitung) dissoziieren Proteinmoleküle entweder direkt oder stufenweise in die Polypeptidketten. Das der Gleichung (1c) entsprechende Dissoziationsschema ist sehr viel seltener zu beobachten als das der beiden anderen Gleichungen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß beim heterogenen Typ der Quartärstruktur die Dissoziation in die Untereinheiten entsprechend Gleichung (1b) symmetrisch erfolgt, d. h. es entstehen gleichartige Untereinheiten.

Bei einigen Enzymen ist die Zahl der Polypeptidketten und die Zahl der aktiven Zentren gleich (vgl. Abschnitt IV, 10). In anderen Fällen, z. B. bei der Aldolase oder der  $\beta$ -Galaktosidase, übersteigt die Zahl der Polypeptidketten die der aktiven Zentren (vgl. Abschnitte IV, 4 und 7). Man könnte daran denken, daß die Polypeptidketten in diesen Fällen nicht gleichartig sind. Es gibt aber durchaus Proteine, wie das Hämoglobin oder die Isozyme der Milchsäure-Dehydrogenase (vgl. Abschnitte IV, 1 und 5), die aus ungleichartigen Polypeptidketten bestehen, aber doch ebenso viele Polypeptidketten wie aktive Zentren besitzen.

## 2. Spontane Bildung der nativen Konformation

Nach der Röntgenstrukturanalyse besitzt jedes Proteinmolekül im nativen Zustand eine definierte Struktur<sup>[203]</sup>. Diese Definiertheit der räumlichen Anordnung nahezu aller Atome<sup>[60]</sup> wirft die Frage auf, ob diese allein durch die Aminosäuresequenz bedingt ist oder ob spezielle Mechanismen die native Konformation bestimmen. Nach Dissoziation in die Polypeptidketten, die meistens von einer völligen Entfaltung begleitet ist, war es in vielen Fällen möglich, die native Konformation sowie die biologische Aktivität zurückzugewinnen (vgl. Abschnitt IV). Auch die Bildung der „richtigen“ Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Bereichen einer „reduzierten“ Polypeptidkette kann in Gegenwart von Sauerstoff erfolgen. Kürzlich wurden aber Enzymsysteme entdeckt<sup>[204]</sup>, die im Falle der Ribonuclease nach deren Reduktion die Bildung der „richtigen“ Disulfidbrücken katalysieren. Es ist also möglich, daß bei Beteiligung von Disulfidbrücken die Bildung der nativen Konformation in vivo durch die Mitwirkung eines Enzymsystems beschleunigt wird.

Renaturierungen<sup>[205]</sup> sowie die Abschätzungen der energetischen Stabilisierung der Konformation durch Nebenvaleanzbindungen<sup>[21, 22]</sup> stützen die Hypothese<sup>[205–207]</sup>, daß sich die Konformation eines Proteinmoleküls zwangsweise aus der Aminosäuresequenz in

[203] R. E. Dickerson in H. Neurath: The Proteins. 2. Aufl., Academic Press, New York, London 1964, Bd. 2, S. 603.

[204] P. Venetianer, E. G. Krause u. F. B. Straub in T. W. Goodwin, J. I. Harris u. B. S. Hartley: Structure and Activity of Enzymes. Academic Press, London, New York 1964. S. 31; R. F. Goldberger, C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 239, 1406 (1964).

[205] R. Lumry u. H. Eyring, J. phys. Chem. 58, 110 (1954).

[206] L. Pauling in A. Neuberger: Symposium on Protein Structure. Methuen, London 1958, S. 17.

[207] F. H. C. Crick in: The Biological Replication of Macromolecules (Symposia of the Society for Experimental Biology, Nr. XII). The University Press, Cambridge 1958, S. 138.

den Polypeptidketten ergibt, d. h. die „Strukturinformation“ ist in der Primärstruktur enthalten. Es ist bis heute jedoch noch nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz die Gesamtstruktur eines Proteinmoleküls vorauszusagen.

## 3. Svedbergs Multiplengesetz

Jede Diskussion des Problems der Quartärstruktur muß auf die grundlegenden Arbeiten Svedbergs aus den zwanziger Jahren<sup>[25, 208]</sup> hinweisen. Ihm gelang erstmals der Nachweis, daß Proteine Makromoleküle definierter Größe sind. Außerdem konnte er feststellen, daß die Moleküle einiger Proteine aus kleineren Untereinheiten bestehen. Aus vergleichenden Untersuchungen folgte Svedberg weiterhin, daß die Molekulargewichte globulärer Proteine ganzzahlige Vielfache eines „Einheitsmolekulargewichtes“ von 17500 („Svedbergsche Untereinheit“) seien. Seine Annahme, daß Proteine mit großem Molekulargewicht nicht aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, erwies sich als richtig. Wir wissen aber heute, daß die Molekulargewichte der Polypeptidketten innerhalb eines größeren Bereiches liegen und ein Einheitsmolekulargewicht nicht existiert.

## 4. Rückkoppelung und Allosterie

Eine Regulation der Synthese eines Stoffwechselproduktes kann dadurch bewirkt werden, daß dieses bei entsprechender Konzentration das erste Enzym in der Reaktionskette, durch welche es synthetisiert wird, hemmt. In diesen Fällen ist das Substrat des ersten Enzyms mit dem Endprodukt strukturell nicht oder nur wenig verwandt. Dieses Prinzip der Regulation bezeichnet man als Endprodukt-Hemmung oder Hemmung durch Rückkoppelung (Feedback-Hemmung). Zur Erklärung des Phänomens führten Monod et al. die Vorstellung der „Allosterie“ ein<sup>[209]</sup>: Ein allosterischer Effektor (z. B. ein Stoffwechselendprodukt) wird nicht im aktiven Zentrum, sondern im allosterischen Zentrum des Enzyms gebunden. Die Folge dieser Bindung soll eine Konformationsänderung (allosterische Umwandlung) sein, die die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum und damit den Ablauf der Enzymreaktion verändert. Diese Konformationsänderung kann sogar zur Dissoziation oder Assoziation führen. Diese Vorstellungen sind nicht auf Enzyme beschränkt, sondern lassen sich auch auf andere Proteine (z. B. Hämoglobin) übertragen.

Die Hemmung der Aspartat-Transcarbamylase (Reaktion: Carbamyl-phosphat + Aspartat  $\rightarrow$  Carbamyl-aspartat) durch das Endprodukt der Synthesekette, Cytidin-triphosphat, ist nur beim assoziierten Enzymmolekül (Molekulargewicht  $3,1 \times 10^5$ ) zu beobachten<sup>[41]</sup>. Nach der Dissoziation lassen sich zwei verschiedene Untereinheiten nachweisen: Die „regulatorische“ Untereinheit (Molekulargewicht etwa 30000) bindet den Hemmstoff, d. h. das Cytidin-triphosphat, und ist enzymatisch inaktiv. Die „katalysierende“ Untereinheit (Molekulargewicht etwa 96000) ist enzymatisch aktiv, bindet den Hemmstoff nicht und wird daher auch nicht durch ihn gehemmt. Da nur im assoziierten Enzymmolekül eine Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten möglich ist, zeigt

[208] T. Svedberg, Nature (London) 123, 871 (1929); Kolloid-Z. 51, 10 (1930).

[209] J. Monod, J. P. Changeux u. F. Jacob, J. molecular Biol. 6, 306 (1963).



die katalysierende Untereinheit im Gegensatz zum assoziierten Molekül auch in Gegenwart des Hemmstoffs eine normale Michaelis-Kinetik. Ein Beispiel für die Änderung der Quartärstruktur bei der Endprodukt-Hemmung ist die Homoserin-Dehydrogenase<sup>[210]</sup>.

Besitzt ein Protein mehrere aktive Zentren und mehrere Polypeptidketten, so kann man bei regulatorischen Proteinen nach dem Prinzip der Allosterie erwarten, daß sich die aktiven Zentren durch Konformationsänderung gegenseitig beeinflussen: bei dem aus vier Polypeptidketten bestehenden Hämoglobin wird nach Bindung eines Sauerstoff-Moleküls die Anlagerung der weiteren drei erleichtert<sup>[11]</sup>. Auf Grund der Röntgenstrukturanalyse ist die Sauerstoffbindung von einer Konformationsänderung begleitet. Die Abstände zwischen den Eisen-Ionen der beiden  $\beta$ -Ketten im sauerstoff-freien und sauerstoff-haltigen Hämoglobin differieren um 7 Å<sup>[11]</sup>. Die Sauerstoff-Dissoziationskurve des „monomeren“ Myoglobins weicht daher prinzipiell von der des „tetrameren“ Hämoglobins ab<sup>[209]</sup>.

## 5. Quartärstruktur und Proteinbiosynthese

Nach den heutigen Vorstellungen<sup>[211–213]</sup> ist für die Biosynthese eines Proteins ein bestimmter Abschnitt der DNS, das Strukturgen, verantwortlich. Die in ihm niedergelegte Information wird über eine „bewegliche Matrize“, messenger-RNS oder Boten-RNS, zu den Ribosomen, den eigentlichen Orten der Proteinbiosynthese, gebracht. Dort werden – diktiert durch die Information der messenger-RNS – die an transfer-RNS gebundenen Aminosäurereste zur Polypeptidkette aneinandergereiht.

Eine Punktmutation im Strukturgen kann zum Austausch eines Aminosäurerestes in der Polypeptidkette führen. Hierfür gibt es bereits zahlreiche Beispiele. Besonders eindrucksvoll wurde dies an den verschiedenen Hämoglobinen belegt. Der Austausch von nur einem Aminosäurerest (Glutaminsäure durch Valin in der  $\beta$ -Kette) führt zum Sichelzellen-Hämoglobin mit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften, die eine Hämoglobinopathie zur Folge haben<sup>[58]</sup>. Die Mutation kann auch wie z. B. bei der  $\beta$ -Galaktosidase (vgl. Abschnitt IV,7) zu einer Veränderung der Quartärstruktur führen.

In einigen Fällen war es durch Hybridisierung verschiedener nach Punktmutation erhaltener inaktiver Enzymproteine möglich, sowohl in vivo als auch in vitro enzymatisch aktive Proteine mit nativer Quartärstruktur (Komplementationsenzyme) zu erhalten (Beispiel:  $\beta$ -Galaktosidase<sup>[142, 143]</sup> und Glutaminsäure-Dehydrogenase<sup>[192]</sup>). Es ist sehr wahrscheinlich, daß das genetische Phänomen der interallelen Komplementation auf Grund der Quartärstruktur zu erklären und bei einkettigen Enzymen nicht zu erwarten ist<sup>[214]</sup>. Die Quartärstruktur und ihre Veränderungen sind biologisch wichtig,

z. B. bei der Kontrolle von Enzym-Aktivitäten. Stoffwechselprodukte können durch allosterische Umwandlung eines Enzyms ihre eigene Biosynthese regulieren. Liegen Isozyme vor, dann wird durch Abwandlung ihrer Zusammensetzung eine Anpassung an den Stoffwechsel ermöglicht (vgl. Abschnitte IV,5 und 6). Durch Zusammenlagerung von Untereinheiten kann wie bei den Hämocyaninen eine hohe Konzentration an biologischer Wirksamkeit ohne Steigerung des osmotischen Druckes erreicht werden<sup>[214a]</sup>.

Im Einklang mit den Anschauungen über die Proteinbiosynthese<sup>[215]</sup> steht die Tatsache, daß sich die native Konformation der Proteinmoleküle spontan aus den Polypeptidketten bildet. Damit wird auch die universelle Bedeutung der Quartärstruktur verständlich: dieses Prinzip bietet die Möglichkeit, mit einem relativ geringen Aufwand an genetischer Information hochmolekulare Proteinmoleküle zu synthetisieren, wenn nur die nach Assoziation entstehenden Komplexe biologisch aktiv sind. Dieses *Ökonomieprinzip* wird besonders deutlich in jenen Fällen, in denen Moleküle hohen Molekulargewichtes aus gleichartigen Polypeptidketten bestehen: Virenhüllproteine (das Hüllprotein des Tabakmosaik-Virus vom Molekulargewicht  $37 \times 10^6$  besteht aus 2130 gleichartigen Polypeptidketten!) und Strukturproteine. Auch Apoferritin (vgl. Abschnitt IV,2) oder Glutaminsäure-Dehydrogenase aus *Neurospora crassa*<sup>[192]</sup> bestehen aus gleichartigen Polypeptidketten. Eine einfache Rechnung ergibt z. B. für das Apoferritin folgendes: bei Anwendung des Triplett-Codes speichern etwa 600 Basenpaare in der DNS die Information für die Biosynthese der aus etwa 200 Aminosäureresten bestehenden Polypeptidkette (Molekulargewicht 24000). Bestünde das Apoferritin-Molekül dagegen aus einer einzigen Polypeptidkette, dann wäre die zwanzigfache Zahl der Basenpaare erforderlich. Entsprechendes gilt für die messenger-RNS. Ähnliches gilt für Proteine, die nicht aus gleichartigen Polypeptidketten, wohl aber aus gleichartigen Untereinheiten bestehen.

*Für die Überlassung von Abbildungsvorlagen danken wir Prof. G. M. Edelman, Dr. Pauline M. Harrison, Dr. P. H. Hofschneider, Dr. J. C. Kendrew, Dr. Ö. Levin und Dr. M. F. Perutz. Die hier beschriebenen eigenen Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.*

Eingegangen am 8. Januar 1965 [A 493]

[210] P. Datta, H. Gest u. H. L. Segal, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 125 (1964).

[211] F. H. Crick, Angew. Chem. 75, 425 (1963).

[212] M. H. F. Wilkins, Angew. Chem. 75, 429 (1963).

[213] J. D. Watson, Angew. Chem. 75, 439 (1963).

[214] F. H. C. Crick u. L. E. Orgel, J. molecular Biol. 8, 161 (1964); D. G. Catcheside, Brookhaven Symposia in Biology 17, 1 (1964).

[214a] C. Baglioni, Brookhaven Symposia Biol. 17, 191 (1964).

[215] Die Größe des Gens als „funktionelle Einheit“ läßt sich durch verschiedene genetische Methoden abschätzen. Diese Abschätzung ergibt für das Polypeptidketten-Äquivalent Werte von etwa 10000 bis über 100000 Daltons<sup>[216]</sup>. Da ein Gen die funktionelle Einheit für mehrere Polypeptidketten auf dem DNS-Niveau sein kann, ist das Polypeptidketten-Äquivalent – besonders bei hohen Werten – häufig mehreren Polypeptidketten zuzuordnen (vgl. [140]). Dies steht im Einklang mit der Diskussion im Abschnitt V, 1.

[216] R. C. Clowes in I. C. Gunsalus u. R. Y. Stanier: The Bacteria. Academic Press, New York, London 1964, Bd. 5, S. 253.