

Evolution der Proteinstruktur

VON PROF. R. ACHER, LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE,
FACULTÉ DES SCIENCES, PARIS (FRANKREICH)

An drei Beispielen (*Cytochrom c*, *Hämoglobin*, *Hypophysen-Hormone*) wird die Evolution der Proteinstruktur besprochen. Für alle drei Substanzen gelten trotz ihrer unterschiedlichen biologischen Aktivität die gleichen Regeln: sie können sich in ihrer Primärstruktur von Species zu Species unterscheiden, aber diese Unterschiede haben ihre Grenze dort, wo Änderungen in der Aminosäuresequenz die biologische Funktion der Proteine beeinträchtigen würden. Änderungen (Ersatz, Auslassung oder Zufügen von Aminosäuren) sind also nur in bestimmten Positionen einer Proteinkette möglich, können dort aber mit einer von Stellung zu Stellung verschiedenen Frequenz auftreten. Die Gesamtzahl der veränderten Reste kann daher nur eine ziemlich grobe Information über die phylogenetische Distanz zweier Arten geben, denn diese Zahl berücksichtigt nicht aufeinanderfolgende Substitutionen an der gleichen Stelle. Die Art der substituierten Reste hingegen kann für die Aufstellung von Abstammungsbeziehungen von Nutzen sein, denn sie läßt Übergangsmoleküle erkennen, die sowohl Aminosäuren enthalten, die im Molekül einer weniger entwickelten Art auftreten, als auch Aminosäuren, die sich auch im Molekül einer weiter entwickelten Art finden.

Unter der Evolution versteht man im allgemeinen die anatomische Entwicklung der Organismen. Morphologische Unterschiede entstehen durch physiologische Veränderungen, die wiederum die Folge von Änderungen auf der molekularen Ebene sind. Vererbar wird eine Änderung, wenn ein Gen, d.h. eine Desoxyribonucleinsäure, modifiziert wird und mit ihm alle biochemischen Zwischenstufen bis hinauf zum phänotypischen Charakter.

Wenn Zusammenhänge zwischen der Evolution der Organismen und der Evolution der Moleküle bestehen, weil beide das gleiche Phänomen auf verschiedenen Ebenen widerspiegeln, so folgt daraus nicht ohne weiteres, daß sie den gleichen Gesetzen gehorchen. Die Evolution ist eine Folge von Veränderungen, deren Richtung von der natürlichen Auslese bestimmt wird. Diese Auslese wählt zufällige Mutationen so aus, daß sich vorteilhafte Eigenschaften allmählich verstärken und addieren. Wie weit aber hängt die morphologische von der molekularen Orthogenese ab, und entwickelt sich eine molekulare Urstruktur zur am weitesten fortgeschrittenen Form nach irgendeinem Gesetz? Vielleicht lassen sich diese Fragen beantworten, wenn man homologe Moleküle untersucht, die aus Arten stammen, die nach unserer Kenntnis der Evolution auseinander hervorgegangen sind. Falls man Entwicklungsstufen im Bau eines Moleküls erkennen kann, und falls diese Stufen den großen anatomischen Entwicklungsschritten entsprechen, dann sollte sich der molekulare Mechanismus der Evolution mit Hilfe biochemischer Methoden untersuchen lassen.

Jede Evolutionstheorie muß die chemischen Eigenschaften der Gene berücksichtigen, die die Weitergabe der Arteigenschaften sicherstellen und deren Mutation vererbare Änderungen und damit die Bildung neuer Arten ermöglicht. Die Gene sind Desoxyribonucleinsäuren, und ihre Eigenschaften hängen von der Nucleotidse-

quenz ab. Es ist bisher noch nicht gelungen, diese Nucleotidsequenzen aufzuklären, aber die Genprodukte, die Proteine, können isoliert und charakterisiert werden. Besonders seit den Untersuchungen von Yanofsky und seinen Mitarbeitern [1] weiß man, daß die Aminosäuresequenz in den Proteinen eine direkte Übersetzung der Nucleotidsequenz in den Desoxyribonucleinsäuren ist (Prinzip der Colinearität), und daher läßt sich eine Strukturveränderung in der Nucleinsäure an der Struktur des von ihr determinierten Proteins ablesen.

Proteine unterscheiden sich in der Zahl und in der Sequenz der in ihnen enthaltenen Aminosäurereste. Der Organismus kann Proteine durch Hinzufügen, Weglassen oder Substitution von Aminosäuren abändern. Wir definieren als einen Variationsschritt eine Änderung, durch die ein Säurerest betroffen wird, und als Variationskoeffizienten das Verhältnis der Zahl der veränderten Reste zur Zahl der nicht modifizierten Reste. Vergleicht man homologe Proteine von Fischen, Amphibien, Reptilien und Säugetieren, so stellt man fest, daß Teile der Struktur bei der Entwicklung einer Art zur anderen erhalten geblieben sind, beispielsweise die Länge der Peptidkette, die prosthetische Gruppe, Aminosäuren in bestimmten Stellungen der Kette, usw. Diese beibehaltenen Strukturteile dürften mit der biologischen Funktion des Proteins verknüpft sein. Interessanterweise ist die stabilste Eigenschaft verwandter Proteine die Kettenlänge. Alle bisher untersuchten Cytochrom-c-Moleküle der Wirbeltiere bestehen aus 104 Aminosäureresten, alle Hypophysen-Hormone der Fische, Amphibien, Vögel und Säugetiere haben 9 Aminosäureresten. Während der Evolution werden die Proteine also nicht oder nur selten durch Kettenverlängerung oder -verkürzung verändert, sondern fast ausschließlich durch Substitution. Derartige Substitutionen traten sicher zeitlich nacheinander auf,

[1] C. Yanofsky, B. C. Carlton, J. R. Guest, O. R. Helinski u. U. Henning, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 266 (1954).

und man darf annehmen, daß jede einen Schritt bei der evolutionären Umwandlung des Proteins darstellt. Untersuchungen über Mutationen der Tryptophan-Synthetase^[1], der Hämoglobine^[2] und des Tabakmosaikvirus^[3] zeigten, daß eine genetische Veränderung meist nur einen Aminosäurerest betrifft. Da die Evolution auf Mutationen angewiesen ist, darf man von einer Aminosäuresubstitution als der Evolutionseinheit sprechen. Das Maß der Übereinstimmung zwischen zwei Proteinen wäre dann ein erstes Kriterium für die Verwandtschaft der Arten, und aus der Zahl der Substitutionen, die von den einfacheren Arten bis zu den höchst entwickelten zunehmen müßte, ließe sich ein Evolutionsschema ableiten (Abb. 1, links), wenn jede Stelle in der Kette

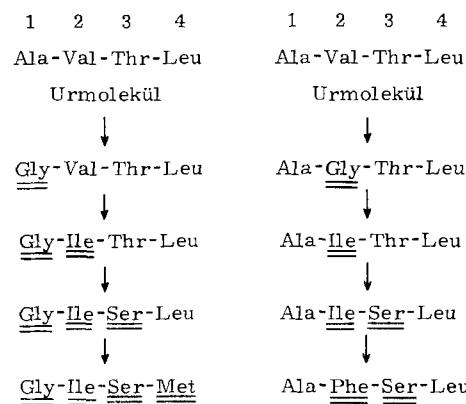


Abb. 1. Evolution eines Proteins bei gleicher (links) und ungleicher (rechts) Substitutionsfrequenz in verschiedenen Positionen der Kette (schematisch).

die gleiche Substitutionswahrscheinlichkeit hätte. Der Vergleich homologer Proteine von Wirbeltieren zeigt aber, daß manche Stellungen niemals von Mutationen betroffen werden, andere dagegen mehr oder weniger häufig. Der Grund dafür ist wohl, daß die biologische Aufgabe des Moleküls nicht jede Substitution gestattet, sondern in bestimmten Stellungen der Kette die Anwesenheit bestimmter Aminosäurereste verlangt. Die Zahl der unveränderlichen Reste ist oft sogar größer als die Zahl der veränderlichen. Nicht die Gesamtzahl der Substitutionen in einer Kette, sondern die Art der Reste, die an Stellen mit hoher Variationsfrequenz stehen, kennzeichnet demnach die evolutionären Beziehungen zwischen den Proteinen. Es müßte also möglich sein, in begrenzten zoologischen Gruppen Übergangsmoleküle zu charakterisieren, die strukturell zwischen den Proteinen aus weniger entwickelten und jenen aus weiter entwickelten Arten stehen (Abb. 1, rechts).

Die Evolution der Wirbeltiere ist besonders eingehend erforscht worden, und außerdem ist es hier ziemlich einfach, das nötige Ausgangsmaterial zu beschaffen. Aus diesen Gründen sind die Untersuchungen an Proteinen der Wirbeltiere am weitesten fortgeschritten, und wir werden uns im folgenden nur mit der Evolution der

Wirbeltierproteine befassen. Die Wahl des zu untersuchenden Proteins wird von folgenden Überlegungen beeinflußt: Das Protein muß relativ klein sein, damit die Zeit für die vollständige Strukturaufklärung in vernünftigen Grenzen bleibt. Methoden für die Reindarstellung des Proteins müssen vorhanden sein, und schließlich muß das Protein von den Organismen in genügender Menge synthetisiert werden. Vor allem das Hämoglobin, das Cytochrom c und die Hypophysen-Hormone genügen diesen Bedingungen. Die Hämoglobine sind leicht zugänglich und einfach zu reinigen, und die Hypophysen-Hormone haben eine einfache Struktur. Alle drei Molekülarten variieren von einer Art oder Klasse von Wirbeltieren zur anderen, aber sie behalten ihre Funktion, an der man sie erkennen kann.

I. Cytochrom c

Von den Proteinen der Atmungskette aerober Organismen läßt sich das Cytochrom c am leichtesten reinigen, denn es ist gut löslich und kann an Kationenaustauschern chromatographiert werden. Es wurde aus zahlreichen Wirbeltieren, Weichtieren, Mikroorganismen und aus einigen Pflanzen isoliert und in vielen Fällen kristallisiert. Das Cytochrom c aus Wirbeltieren wurde besonders eingehend untersucht, denn das Wirbeltierherz enthält einige μmol Cytochrom c pro 100 g Gewebe, was verhältnismäßig viel ist. Die Cytochrom-c-Moleküle aus verschiedenen Wirbeltierklassen haben alle 104 Aminosäurereste, ein Molekül Häm als prosthetische Gruppe, einen isoelektrischen Punkt bei pH = 10 und ein Oxidations-Reduktionspotential von etwa +250 mV. Außerdem reagiert jedes Molekül unabhängig von seiner Herkunft mit der Cytochromoxidase der Säugetiere. Offenbar hat sich also während der Evolution die Funktion nicht geändert, obwohl die Struktur modifiziert worden ist. Bisher hat man aber die Schritte der chemischen Modifikation noch nicht mit morphologischen Entwicklungsstufen in Beziehung setzen können. Man konnte nur feststellen, daß die Zahl der Substitutionen zunimmt, je weiter der Organismus entwickelt ist, aus dem das Cytochrom stammt.

1. Die unveränderlichen Struktureigenschaften

Cytochrom c wurde aus den Herzen von zwölf Wirbeltierarten, die zu drei Klassen gehören, isoliert und charakterisiert^[4, 5]. Von den jeweils 104 Aminosäureresten ist etwa die Hälfte bei allen untersuchten Proteinen gleich (Abb. 2). Die zweite konstante Eigenschaft ist die Lage der Hämgruppe, die immer an den Aminosäureresten 14 und 17 verankert ist, d.h., die beiden Thioätherbrücken sind immer durch zwei Aminosäurereste getrennt (Abb. 2). Die Kettenlänge ist gleichfalls konstant (was für das Cytochrom c der Wirbellosen und der

[2] C. Baglioni in J. H. Taylor: Molecular Genetics. Academic Press, New York, London 1963, Teil I, S. 405.

[3] A. Tsugita u. H. Fraenkel-Conrat in J. H. Taylor: Molecular Genetics. Academic Press, New York, London 1963, Teil I, S. 477.

[4] E. Margoliash u. E. L. Smith in V. Bryson u. H. J. Vogel: Evolving genes and proteins. Academic Press, New York, London 1965, S. 221.

[5] E. L. Smith u. E. Margoliash, Fed. Proc. 23, 1243 (1964).

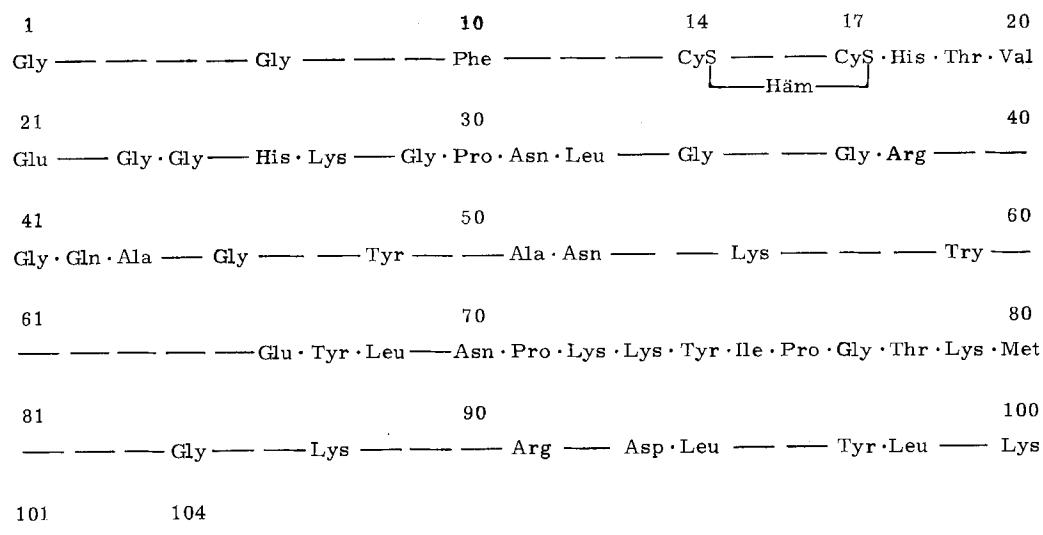


Abb. 2. Konstante Sequenzen der Cytochrom-c-Moleküle der Wirbeltiere. Variable Positionen sind durch Striche gekennzeichnet (nach [4]).

Mikroorganismen nicht gilt), d.h. die Evolution manifestiert sich bei den untersuchten Wirbeltieren nur durch die Substitution von Aminosäuren.

2. Die Substitutionen

a) Gesamtzahl der Substitutionen

Abbildung 2 zeigt, daß die Peptidkette zwischen den Resten 70 und 80 nicht durch Substitutionen verändert wird. Entweder ist diese Sequenz also für die enzymatische Aktivität notwendig, d.h. Substitutionen in dieser Region würden die Moleküle inaktivieren, oder Mutationen können sich in dieser Sequenz nicht auswirken. Außerhalb dieser Region sind die substituierbaren Positionen ziemlich gleichmäßig über die ganze Peptidkette verteilt. Wahrscheinlich werden die Aminosäuren daher nicht in Gruppen ausgetauscht, sondern die Substitutionen sind voneinander unabhängig.

Unterschiede in der Zahl der Substitutionen sind bei Cytochrom-c-Molekülen aus Säugetierarten der gleichen Ordnung gering, während sie ansteigen, wenn man Arten verschiedener Ordnungen vergleicht (Tabelle 1).

Tabelle 1. Zahl der Substitutionen in Cytochrom-c-Molekülen verschiedener Säugetiere.

Arten	Ordnungen	Zahl der Substitutionen
Mensch-Affe	Primate-Primate	1
Rind-Schwein-Schaf	Paarhufer-Paarhufer	0
Rind-Pferd	Paarhufer-Unpaarhufer	3
Mensch-Rind	Primate-Huftiere	10
Mensch-Pferd	Primate-Huftiere	12
Mensch-Hund	Primate-Raubtiere	10
Mensch-Kaninchen	Primate-Nagetiere	11

Die Gesamtzahl der Substitutionen allein genügt allerdings nicht, um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Wirbeltierarten aufzuzeigen. Beispielsweise unterscheidet sich das Cytochrom c des Thunfisches, eines Knochenfisches, von seinen Homologen in den Säugetieren nur durch 17 bis 21 Substitu-

tionen, während die Cytochrome des Menschen und des Pferdes bereits in 12 Aminosäureresten differieren. Die wirkliche Zahl der Substitutionen, die sich bei den Evolutionen eines Fisches in eine Säugetierart ereigneten, ist zweifellos bedeutend größer als es der einfache Vergleich der Sequenzen erkennen läßt. Manche Positionen der Kette können nämlich eine besonders große Mutabilität besitzen, so daß an einer solchen Stelle mehrere Substitutionen während der Evolution aufeinanderfolgen, wogegen der Vergleich des Cytochroms c aus zwei Arten, die am Anfang und am Ende einer Entwicklung stehen, nur eine Substitution zeigt. Die beobachtete Zahl der Substitutionen ist daher nur ein Minimum und nur ein ziemlich grobes Indiz für die Verwandtschaft zwischen verschiedenen Arten, aber doch ein Indiz, das innerhalb einer begrenzten zoologischen Gruppe von Bedeutung ist.

b) Art der Substitutionen

Der Ersatz einer Aminosäure durch eine andere, die der gleichen chemischen Gruppe angehört, ist relativ häufig. Manche Aminosäuren scheinen überhaupt äquivalent zu sein, z.B. Isoleucin und Valin, Serin und Threonin oder Lysin und Arginin. Ein derartiger Ersatz ändert die chemischen Eigenschaften des Proteins im allgemeinen nicht und die biologischen Eigenschaften nur in seltenen Fällen. Solche Substitutionen kann man daher konervative Substitutionen nennen^[4]. Dagegen bringt die Substitution eines polaren Restes durch einen hydrophoben, z. B. der Ersatz von Lysin durch Isoleucin, eine tiefgreifende chemische Veränderung mit sich und kann zu neuen Eigenschaften des Moleküls führen. Solche Substitutionen kann man daher alternierende Substitutionen nennen. Bei den untersuchten Cytochromen kommen beide Substitutionstypen vor.

Da die Hämgruppe eine wichtige Rolle beim Elektronentransport spielt, sind Variationen der Peptidkette in der Nachbarschaft dieser Gruppe besonders bedeutsam^[6]. Abbildung 3 zeigt die konservativen und alternierenden Peptidketten.

[6] S. Paleus u. H. Tuppy, Acta chem. scand. 13, 641 (1959).

renden Substitutionen der 12 Wirbeltier-Cytochrome und der Cytochrom-c-Moleküle, die man in der Hefe und in einem Schmetterling, *Samia cynthia*, gefunden hat [4].

Lys

Thr	Thr	Glu		Ala
Ile	Met	Arg	Ser	Leu
Val	Gln	Lys	CyS	Ala
11	12	13	15	16
			18	19
			20	21
			22	
				Häm

Abb. 3. Substitutionen in der Nachbarschaft der Hämgruppe bei 14 Cytochrom-c-Molekülen. Die Sequenz in der unteren Zeile wurde bei sieben Arten gefunden (nach [6] und [4]).

II. Die Hämoglobine

Das Hämoglobin ist ein weitverbreitetes Protein, das sich sehr leicht reinigen läßt. Fast das gesamte lösliche Protein der roten Blutkörperchen ist Hämoglobin. Um es zu isolieren, werden die Erythrocyten vom Plasma abzentrifugiert, mit einer isotonischen Salzlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser lysiert. Die roten Blutkörperchen der Säugetiere haben im Gegensatz zu denen der niederen Wirbeltiere keinen Zellkern. Ist ein Zellkern vorhanden, so müssen bei der Reinigung des Hämoglobins noch die Nucleinsäuren entfernt werden. Das mit der Ultrazentrifuge bestimmte Molekulargewicht der Hämoglobine aus vielen Arten verschiedener Wirbeltierklassen liegt zwischen 64 000 und 68 000. Eine Ausnahme macht das Hämoglobin der Cyclostomen, der primitivsten Wirbeltiere, mit einem Molekulargewicht von nur etwa 17 000 [7]. Schon ganz am Anfang der Evolution der Wirbeltiere scheint also eine Molekülvergrößerung stattgefunden zu haben.

Die Untersuchung der Primärstruktur des Hämoglobins wurde dadurch erleichtert, daß das Molekül ein Komplex aus vier Peptidketten mit einem Molekulargewicht von je etwa 17 000 ist und durch Erniedrigung des pH-Wertes dissoziiert werden kann. Das Hämoglobin des Pferdes ließ sich durch Elektrophorese oder Chromatographie bei pH = 2 in zwei α -Ketten und zwei β -Ketten trennen, die zu zwei unabhängigen Gen-Protein-Systemen gehören müssen.

1. Die Multiplizität der Ketten

Auch die Hämoglobinketten anderer Säugetiere kann man durch Chromatographie an Kationenaustauschern bei pH = 2,1 mit einem Harnstoffgradienten trennen. Bei den Hämoglobinen der niederen Wirbeltiere hat sich die Gegenstromverteilung zwischen sekundärem Butanol und Dichloressigsäure bewährt [8]. Zwei Kettenarten

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

[8] G. Braunitzer, K. Hilse, V. Rudloff u. H. Hilschmann, Advances Protein Chem. 19, 1 (1964).

wurden nicht nur beim Pferd, sondern auch beim Kaninchen, Schwein, Lama und Rind [8], bei zahlreichen Primaten [10] und beim Karpfen [9] nachgewiesen.

Hämoglobin des Erwachsenen besteht aus zwei Arten. Hämoglobin A₁ setzt sich aus je zwei α - und β -Ketten zusammen, während Hämoglobin A₂ je zwei α - und δ -Ketten enthält. Der menschliche Fötus besitzt ein besonderes Hämoglobin, das Hämoglobin F, das aus den beiden Ketten α und γ besteht. Man muß beim normalen Menschen daher vier strukturell ähnliche Proteine α , β , γ und δ berücksichtigen, die vom Organismus entweder dauernd oder nur zu bestimmten Zeiten seiner Entwicklung produziert werden. Die Aminosäuresequenzen in den Ketten α , β und γ sind vollständig bekannt [7–11]. Die α -Kette hat 141 Reste, während die Ketten β , γ und δ aus je 146 Aminosäureresten zusammengesetzt sind.

Alle menschlichen Hämoglobine enthalten die gleiche α -Kette. Auffallend ist der geringe Unterschied zwischen den Ketten β und γ . Nur 39 von 146 Positionen sind von verschiedenen Resten besetzt, der Homologiegrad beträgt demnach 73 %. Die 39 Substitutionen scheinen regellos über die ganze Kette verteilt zu sein und betreffen keine zusammenhängenden Sequenzen. Die Ketten β und δ sind ebenfalls sehr ähnlich. Beim Vergleich der α -Kette mit den Ketten β , γ , δ fällt als erstes die verschiedene Kettenlänge auf. Die Homologie zwischen den Ketten α und β beträgt nur 44 % (64 identische Positionen), aber sie ist ausgeprägt genug, um auf ein gemeinsames Ausgangsmolekül schließen zu lassen. In diesem Falle sind die Variationen nicht auf Substitutionen beschränkt, sondern es liegen auch Deletionen und Insertionen vor.

In den Hämoglobinen von zehn Affenarten wurden je zwei α - und β -Ketten gefunden [10]. Die α -Ketten unterscheiden sich kaum von der menschlichen α -Kette (0 bis 6 Substitutionen), während die Unterschiede zwischen der β -Kette und der menschlichen β -Kette größer (3–23 Substitutionen) und gegenüber der fötalen menschlichen γ -Kette noch zahlreicher (9–36 Substitutionen) sind.

Beim Pferd wurden zwei Hämoglobine gefunden, die den menschlichen Hämoglobinen A₁ und A₂ homolog sind. Die α -Ketten dieser beiden Hämoglobine haben, wie die menschliche α -Kette, 141 Aminosäurereste und sind identisch. Die β -Ketten haben 146 Reste und sind verschieden. Auch beim Rind, beim Schaf und bei der Maus scheint die Pluralität der Ketten die Regel zu sein [9].

Die Hämoglobine aller bisher untersuchten ausgewachsenen Säugetiere (Rind, Pferd, Schaf, Kaninchen, Schwein, Lama) bestehen aus zwei Kettenarten, α und β , und lassen sich durch die Formel $\alpha_2\beta_2$ beschreiben. Wie beim Menschen hat man auch bei Rind, Schaf,

[9] G. Braunitzer, V. Braun, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff u. G. v. Wettstein in V. Bryson u. H. J. Vogel: Evolving genes and proteins. Academic Press, New York, London 1965, S. 183.

[10] J. Buettner-Janusch u. R. L. Hill in V. Bryson u. H. J. Vogel: Evolving Genes and Proteins. Academic Press, New York, London 1965, S. 167.

[11] W. A. Schroeder, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 17, 322 (1959).

Ziege u.a. ein fötales Hämoglobin gefunden, welches eine α -Kette besitzt, die mit der α -Kette des ausgewachsenen Tieres identisch ist, und eine γ -Kette, die sich von der β -Kette des ausgewachsenen Tieres unterscheidet. Die allgemeine Formel des fötalen Hämoglobins der Säugetiere ist also $\alpha_2\gamma_2$. In jeder Gruppe scheint die Länge der Kette die stabilste Eigenschaft zu sein (Tabelle 2). Andererseits scheinen die Substitutionen in den α -Ketten weniger zahlreich zu sein als in den β - und γ -Ketten, wie es Abbildung 4 zeigt, in der nur das Aminoende der Ketten wiedergegeben ist.

Tabelle 2. Zahl der Aminosäurereste in den α -, β - und γ -Ketten des Hämoglobins einiger Säugetierarten.

Art	α	β	γ
Mensch	141	146	146
Pferd	141	146	
Rind	141	145	145
Lemur		146	
Kamel		146	

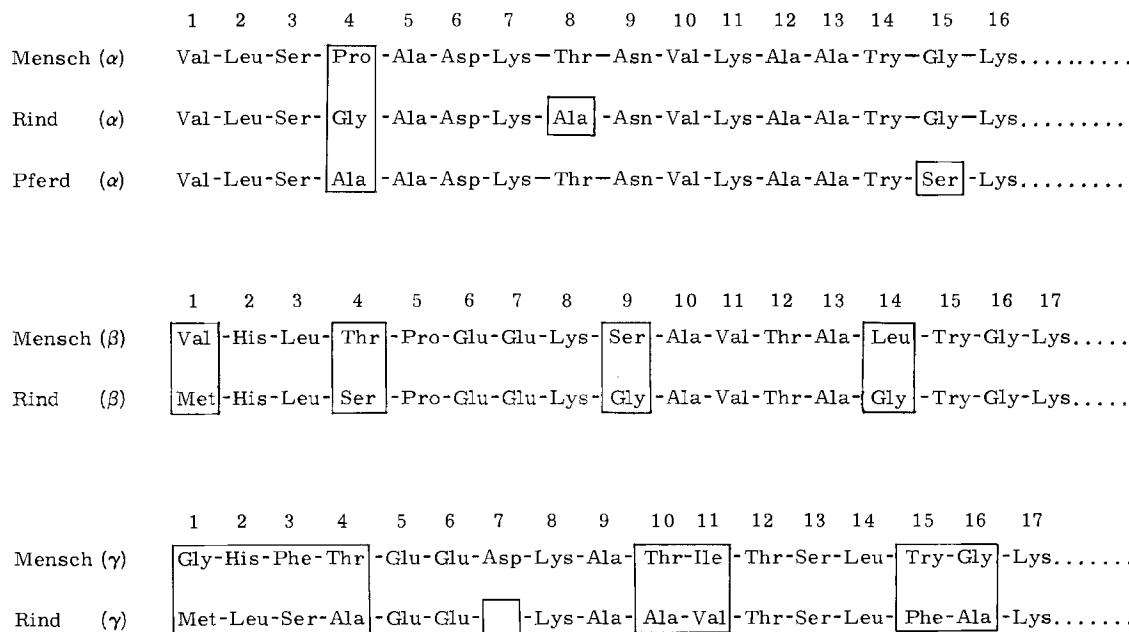


Abb. 4. Vergleich der α -, β - und γ -Ketten im Hämoglobin des Menschen, des Rindes und des Pferdes. Der Vergleich wurde absichtlich auf das N-terminale Ende der Ketten beschränkt. In Rechtecken geschriebene Aminosäuren stellen Substitutionen dar. Deletionen sind durch ein leeres Rechteck angedeutet.

Die Beobachtungen an den Hämoglobinen der Säugetiere scheinen auch für die Hämoglobine anderer Wirbeltierklassen zu gelten, d.h. beim ausgewachsenen Tier kommen zwei oder mehrere Hämoglobine vor, und die Hämoglobine bestehen aus zwei verschiedenen Ketten, so daß die allgemeine Formel $\alpha_2\beta_2$ anwendbar bleibt. Als Repräsentant der Vögel wurde das Huhn untersucht [12] und von den Knochenfischen der Karpfen [13]. In beiden Fällen hat man zwei oder drei Hämoglobine durch Elektrophorese oder Chromatographie abtrennen können. Isoliert wurden die α - und β -Ketten der Haupt hämoglobine des Karpfens. Die α -Ketten haben ein

[12] Cl. Paul, A. G. Schnek u. J. Léonis: Chromatographie – Symposium II – 1962, S. 133.

[13] K. Hilse, V. Sorger u. G. Braunitzer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 344, 166 (1966).

acetyliertes Aminoende, die β -Ketten nicht [13]. Im Gegensatz zu den α -Ketten der Säugetiere, die aus 141 Aminosäureresten bestehen, besitzt die α -Kette des Karpfens 142 Kettenglieder [9]. Dieser geringfügige Unterschied erinnert an die konstante Kettenlänge der Cytochrom-c-Moleküle der Wirbeltiere.

Die Cyclostomen bilden die niedere Klasse der Wirbeltiere. Proteine aus Tieren dieser Klasse sollten daher den Urmolekülen am ähnlichsten sein. Das Neunauge ist ein weitverbreiteter Vertreter dieser Klasse. Das Molekulargewicht seines Hämoglobins beträgt nur etwa ein Viertel vom Molekulargewicht des Hämoglobins anderer Wirbeltiere [14]. Das Hämoglobin des Neunauges besteht anscheinend aus nur einer Kettenart. Diese Kette ist isoliert worden, und ihre Aminosäuresequenz wird zur Zeit untersucht. Diese (einzig oder am häufigsten vorkommende) Kette besitzt etwa 160 Aminosäurereste, und ihre Struktur ähnelt der des Myoglobins aus Säugertiermuskeln mehr als der einer α - oder β -Kette des Säugetier-Hämoglobins.

2. Die Theorie der Duplikation

Kommen in einer Spezies zwei oder mehrere verwandte Proteine vor, so ist zu vermuten, daß sie sich von einem gemeinsamen Urmolekül ableiten. Der einfachste Weg zur Bildung neuer Gene wäre eine Duplikation. Ingram [7] interpretierte damit die Existenz der vier verwandten Proteinketten α , β , γ und δ in den normalen menschlichen Hämoglobinen und die in manchen Eigenschaften (Molekulargewicht, Sequenz) bestehende Ähnlichkeit mit dem Myoglobin des Muskels. Das Gen, das die Biosynthese des Myoglobins determiniert, wäre danach das älteste und der Vorfahre derjenigen Gene, die jetzt die

[14] T. Svedberg u. I. B. Eriksson-Quensel, J. Amer. chem. Soc. 56, 1700 (1934).

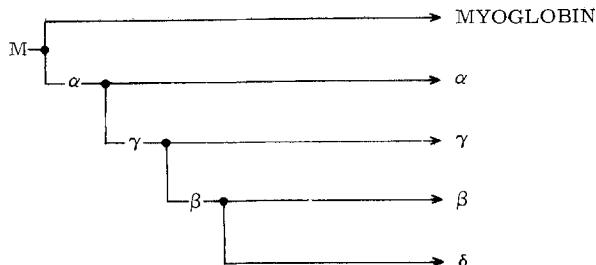


Abb. 5. Entwicklung der Hämoglobinketten. Jeder Punkt entspricht einer Genverdoppelung (nach [8]).

Bildung der Ketten α , β , γ und δ bewerkstelligen. Eine Folge von Duplikationen wäre die Ursache für die Multiplikation der genetischen Elemente, wie sie in Abbildung 5 dargestellt ist. Die Verdoppelung des Myoglobin-Gens M hätte danach zu zwei Genen geführt, d.h. zu einem, das weiterhin ein Protein vom Myoglobintyp bildet, und zu einem anderen, das in weiteren Mutationsschritten verändert wurde und die Bildung einer Kette vom α -Typ veranlaßt. Eine Duplikation des α -Gens würde zu zwei Tochtergenen führen, von denen eines weiterhin die

α -Kette produziert, während das andere für die γ -Kette verantwortlich ist. Auf gleiche Weise wären die Gene für die β - und δ -Ketten entstanden. Dieses Schema berücksichtigt einige genetische und chemische Tatsachen, z.B. daß die Gene γ , β und δ auseinander hervorgegangen sind, wie es die Verwandtschaft der Proteine andeutet, und daß das stabilste Gen (α) als das älteste anzusehen ist. Das Gen γ steht vor den β - und δ -Genen, weil es sich schon im Fötus auswirkt, während die beiden anderen erst im erwachsenen Organismus wirksam werden.

3. Die Mutationen

Die Duplikationshypothese erklärt die Bildung von identischen Tochtergenen, von denen jedes die Synthese eines Proteins kontrolliert. Die beiden Proteine selbst sind zu Beginn ebenfalls identisch gewesen. Mutationen traten dann aber in den einzelnen Genen unabhängig voneinander auf und veränderten die Aminosäuresequenzen der Proteine. Die Strukturen der beiden Proteine wurden also immer unähnlicher, d.h. ihre Differenzierung ist

	1	2	16	30	57	58	68	116	141	
	Val.	Leu...	$\overset{\oplus}{\text{Lys}}$...	$\overset{\ominus}{\text{Glu}}$...	Gly.	$\overset{\oplus}{\text{His}}$...	Asp.	$\overset{\ominus}{\text{NH}_2}$...	$\overset{\oplus}{\text{Glu}}$...	$\overset{\oplus}{\text{Arg}}$
Hb I							$\overset{\ominus}{\text{Asp}}$.			
Hb G _{Honolulu}							. Glu.	$\overset{\oplus}{\text{NH}_2}$.		
Hb Norfolk							$\overset{\ominus}{\text{Asp}}$.			
Hb M _{Boston}							. Tyr.			
Hb G _{Philadelphia}							. Lys.			
Hb O _{Indonesia}							. Lys.			
	1	2	3	6	7	26	63	67	121	146
	Val.	$\overset{\oplus}{\text{His}}$.	Leu...	$\overset{\ominus}{\text{Glu}}$.	$\overset{\ominus}{\text{Glu}}$...	$\overset{\ominus}{\text{Glu}}$...	$\overset{\oplus}{\text{His}}$...	Val...	$\overset{\ominus}{\text{Glu}}$...	$\overset{\oplus}{\text{His}}$
Hb S							. Val.			
Hb C							. Lys.			
Hb G _{San José}							. Gly.			
Hb E							. Lys.			
Hb M _{Saskatoon}							. Tyr.			
Hb M _{Milwaukee}							. Glu.			
Hb D _{Punjab} (=D γ)							. Glu.	$\overset{\oplus}{\text{NH}_2}$.		
Hb Zürich							. Arg.			
Hb O _{Arabia}							. Lys.			

Abb. 6. Substitutionen in anomalen menschlichen Hämoglobinen, die durch Mutationen in den Genen α (oben) und β (unten) verursacht werden (nach [8]).

eine Folge der Mutationen, die nach der Gen-Duplikation auftraten.

Das Interesse an menschlichen Hämoglobinen und ihren pathologischen Veränderungen hat zur Untersuchung zahlreicher anomaler Hämoglobine geführt, die ebenfalls durch Mutationen entstehen. Diese anomalen Hämoglobine wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit den Buchstaben B, C, D usw. bezeichnet, doch ihre Zahl ist inzwischen so groß geworden, daß man den Entdeckungsort dazugenommen hat. Man kennt jetzt etwa 40 anomale Hämoglobine. Wichtig ist, daß in diesen eine Mutation immer nur einen Aminosäurerest betrifft. Mutationen treten häufiger im β -Gen als im α -Gen auf, und sie scheinen gleichmäßig über die ganze Länge der Ketten verteilt zu sein, wie es Abbildung 6 zeigt. Eine Veränderung der Kettenlänge wurde nie gefunden, das heißt, zu Insertionen oder Deletionen führende Mutationen sind sehr selten.

III. Die Hypophysen-Hormone

Wegen ihrer relativ einfachen Struktur sind die Hypophysen-Hormone Ocytocin und Vasopressin die ersten biologisch aktiven Peptide gewesen, die charakterisiert wurden [15–17].

1. Die Dualität der Hormone

Die Ocytocin- und Vasopressin-Aktivität in den Hypophysenextrakten verschiedener Wirbeltierarten kann verschieden groß sein (Tabelle 3). Die aktiven Substanzen wurden isoliert aus sechs Säugetierarten (Rind,

Tabelle 3. Biologische Aktivität im Hypophysenhinterlappen verschiedener Wirbeltierarten.

Arten	Ocytocin-Aktivität [Einh./mg Trocken-substanz]	Vasopressin-Aktivität [Einh./mg Trocken-substanz]
Säugetiere:	Rind	1,0
	Schwein	1,4
	Pferd	0,9
	Schaf	0,8
	Wal	0,5
Vögel:	Huhn	0,4
Amphibien:	Frosch	1,2
Knochenfische[a]: Steinblock	0,6	
	Pollack	0,5
	Meerhecht	0,5
	Kabeljau	0,2
	Karpfen	0,05
Knorpelfische [a]: Dornroche	0,005	0,001
	Glattroche	0,007

[a] Ganze Hypophyse.

[15] V. DuVigneaud: A trail of research. Cornell University Press, Ithaca 1952.

[16] H. Tuppy u. H. Michl, Mh. Chem. 84, 1011 (1953).

[17] R. Acher u. C. Fromageot, Ergebn. Physiol., biol. Chem., exp. Pharmakol. 48, 286 (1955).

Schwein, Pferd, Schaf, Wal und Mensch), aus einer Vogelart, dem Huhn, einer Amphibienart, dem Frosch, vier Arten von Knochenfischen, dem Steinblock und Pollack (zwei Dorscharten), dem Kabeljau und dem Karpfen, und schließlich aus vier Arten von Knorpelfischen der Rochenfamilie. In allen Fällen wurden die Hormone durch Adsorption an das Protein Neurophysin, fraktionierte Fällung des Komplexes, Dialyse, Freisetzung durch Trichloressigsäure und Chromatographie an einem Kationenaustauscher gewonnen. Die Trichloressigsäure fällt das Trägerprotein aus, läßt das aktive Hormon aber in Lösung. Aus den Hypophysen der fünf untersuchten Wirbeltierklassen konnten jeweils zwei Hormone isoliert werden (Abb. 7). Die Reinheit der

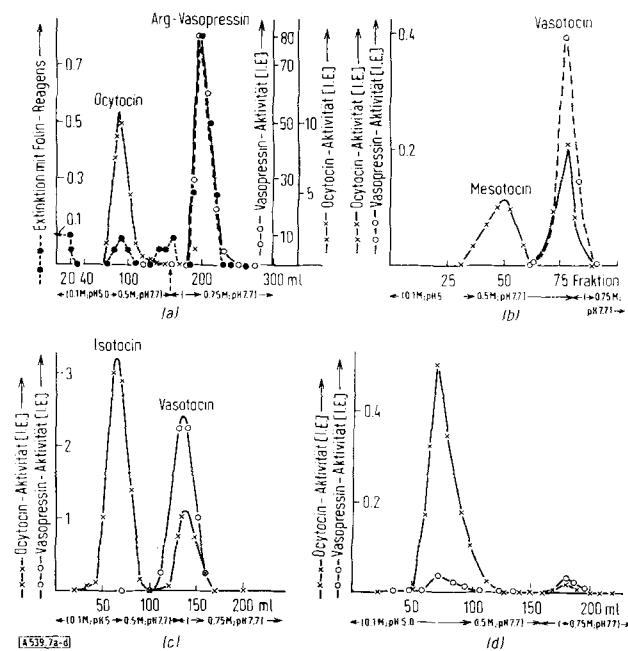


Abb. 7. Chromatographische Trennung der Hypophysen-Hormone an Amberlite CG-50 mit einem Ammoniumacetat-Gradienten (nach [18]). (a) Säugetiere: Wal; (b) Amphibien: Frosch; (c) Knochenfische: Meerhecht; (d) Knorpelfische: Rochen.

Substanzen wird durch die Aminosäureanalyse kontrolliert. Bei den niederen Wirbeltieren müssen wegen der Kleinheit der Hypophyse 5000 bis 10000 Drüsen aufgearbeitet werden, um 1 bis 5 mg Hormon zu erhalten. Jede Wirbeltierklasse hat ihre spezifischen Hormone: Ocytocin und Vasopressin bei den Säugetieren, Mesotocin und Vasotocin bei den Amphibien, Isotocin und Vasotocin bei den Knochenfischen und Glumitocin und wahrscheinlich Vasotocin bei den Knorpelfischen. Diese Hormone unterscheiden sich im chromatographischen Verhalten. Ocytocin, Mesotocin, Isotocin und Glumitocin werden zuerst eluiert, dann folgen Vasotocin und Argininvasopressin (Abb. 7).

2. Charakterisierung der Hormone

Alle genannten Hypophysen-Hormone bestehen aus neun Aminosäureresten (Tabelle 4).

Säugetiere: Die Hormone von Rind und Schwein sind seit 1953 bekannt, diejenigen des Pferdes, des Schafes, des Wa-

Tabelle 4. Hypophysen-Hormone der Wirbeltiere.

Knorpelfische	1 2 3 4 5 6 7 8 9 CyS.Tyr.Ile.Ser.Asn.CyS.Pro.Gln.Gly(NH ₂)	Glumitocin	Vasotocin (?)
Knochenfische	1 2 3 4 5 6 7 8 9 CyS.Tyr.Ile.Ser.Asn.CyS.Pro.Ile.Gly(NH ₂)	Isotocin	Vasotocin
Amphibien	1 2 3 4 5 6 7 8 9 CyS.Tyr.Ile.Gln.Asn.CyS.Pro.Ile.Gly(NH ₂)	Mesotocin	Vasotocin
Säugetiere (außer Schwein)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 CyS.Tyr.Ile.Gln.Asn.CyS.Pro.Leu.Gly(NH ₂)	Ocytocin	Arginin-vasopressin
Schwein	1 2 3 4 5 6 7 8 9 CyS.Tyr.Ile.Gln.Asn.CyS.Pro.Leu.Gly(NH ₂)	Ocytocin	Lysin-vasopressin

les^[18] und des Menschen^[19] wurden später isoliert. Bei allen sechs untersuchten Arten findet man das gleiche Ocytocin und bei fünf der sechs Arten das gleiche Vasopressin. Beim Vasopressin des Schweines ist ein Argininrest durch einen Lysinrest ersetzt.

Vögel und Amphibien: Aus dem Huhn, der einzigen untersuchten Vogelart, sind Ocytocin und Vasotocin^[18], aus dem Frosch (*Rana esculenta*), einem Vertreter der Amphibien, sind Mesotocin und Vasotocin^[18] isoliert worden.

Knochenfische: Untersucht wurden vier Arten von Salzwasserknochenfischen, zwei Dorscharten, *Gadus luscus* und *Pollachius virens*, und zwei Kabeljauarten, *Merluccius merluccius* und *Gadus morhua*, sowie eine Art von Süßwasserknochenfischen, der Karpfen, *Cyprinus carpio*. In allen Arten wurden zwei Hormone, Isotocin und Vasotocin, identifiziert^[18].

Knorpelfische: Vier Rochenarten wurden untersucht, *Raia clavata*, *Raia batis*, *Raia fullonica* und *Raia naevus*. Zwei Hormone konnten nachgewiesen werden, das chemisch charakterisierte Glumitocin und das nur pharmakologisch identifizierte Vasotocin^[18].

3. Phylogenie der Hormone

Obwohl die etwa 20 untersuchten Arten nur einen sehr kleinen Teil der etwa 50000 bekannten Wirbeltierarten bilden, sind wegen der Verteilung der untersuchten Arten auf fünf Klassen allgemeine Schlußfolgerungen möglich. Alle untersuchten Arten haben zwei Hormone, die aus neun Aminosäureresten bestehen und eine Disulfidbrücke zwischen den Resten 1 und 6 besitzen. Innerhalb einer Klasse bleiben die Strukturen praktisch gleich, und Variationen zwischen verschiedenen Klassen betreffen einen oder höchstens zwei Reste. Diese Veränderungen treten nur in einigen Positionen der Kette auf, vor allem in den Positionen 4 und 8.

[18] R. Acher, J. Chauvet, M.T. Chauvet u. D. Crepy, Bull. Soc. Chim. biol. 47, 2279 (1965).

[19] A. Light u. V. DuVigneaud, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 692 (1958).

a) Das Urhormon

Die Dualität der Hypophysen-Hormone erinnert an die Multiplizität der Hämoglobin-Ketten und deutet auf eine Gen-Duplikation hin. Diese Duplikation muß schon sehr früh in der Geschichte der Wirbeltiere aufgetreten sein, denn bereits die Knorpel- und Knochenfische besitzen zwei Hormone. Auch hier macht das Neunaug als Vertreter der niedersten Wirbeltierklasse eine Ausnahme. Säulenchromatographisch und papierelektrophoretisch ließ sich beim Neunaug nur ein Hypophysen-Hormon nachweisen^[20]. Es hat pharmakologisch die Eigenschaften des Vasotocins. Denkbar wäre allerdings auch, daß das Neunaug noch ein zweites Hormon hat, das bei den üblichen pharmakologischen Tests wirkungslos ist und daher übersehen wird. Ein solches Hormon müßte sich aber strukturell von den bisher identifizierten Verbindungen so sehr unterscheiden, daß es vom Neurophysin nicht mehr adsorbiert wird. Mit dieser Einschränkung kann man sich eine Genverdoppelung beim Übergang von den Cyclostomen zu den Fischen vorstellen. Diese Genverdoppelung hätte zu zwei Molekülfamilien geführt, die sich dann während der Evolution unabhängig weiterverändert haben. Die Familie „Isotocin-Mesotocin-Ocytocin“ hat sich auf die Reproduktionsfunktionen spezialisiert, während die Familie „Vasotocin-Vasopressin“ für die Regulation des Wasser- und Mineralstoffwechsels verantwortlich wurde (Abb. 8).

b) Die Hormonfamilien

Man darf annehmen, daß sich die Hormone so voneinander ableiten wie die Arten, aus denen sie extrahiert wurden, auseinander entstanden sind. Die Knorpel- und Knochenfische sind in der gleichen Epoche vor unge-

[20] R. Acher, J. Chauvet, M.T. Chauvet u. D. Crepy, unveröffentlicht.

fähr 300 Millionen Jahren aufgetreten, doch während sich die Knorpelfische nicht in eine andere Wirbeltierklasse weiterentwickelten, sind aus den Knochenfischen die Amphibien und dann die Reptilien entstanden, welche sich einerseits in die Vögel und andererseits in die Säugetiere verwandelten^[21]. Man darf daher die Reihenfolge Knochenfische-Amphibien-Säugetiere auch für die Entwicklung der Hormonmoleküle zugrundelegen.

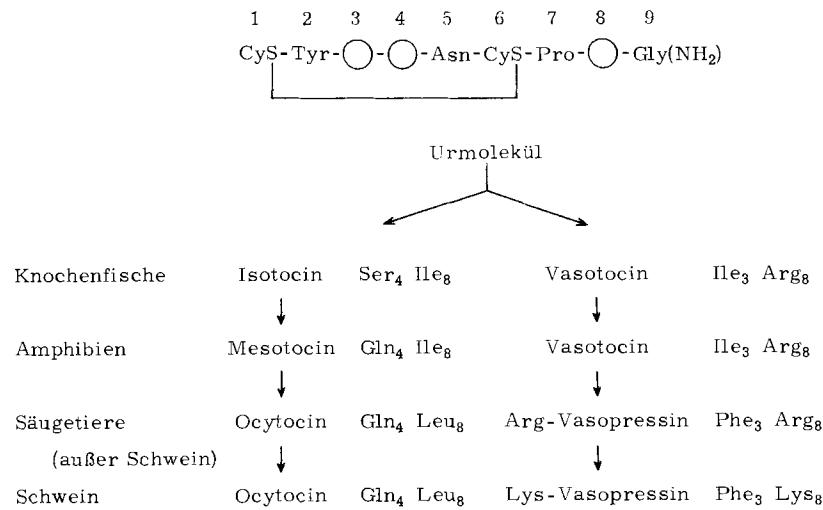


Abb. 8. Hypothetisches Schema der Evolution der Hypophysen-Hormone. Dargestellt sind eine Gen-Verdoppelung, die zu zwei Molekülfamilien führt, und Mutationen, die immer nur einen Aminosäurerest in den Stellungen 3, 4 oder 8 betreffen.

Von den Hormonen, die den Wasser- und Mineralstoffwechsel beeinflussen, kommt das Vasotocin bei allen Wirbeltieren außer den Säugetieren vor, bei denen es durch das Vasopressin ersetzt ist. Die Umwandlung von Vasotocin in Vasopressin erforderte nur den Ersatz eines Isoleucinrestes durch einen Phenylalaninrest in Position 3 (Abb. 8). Der Chemiker sieht nur den Austausch zweier hydrophober Reste, der Biologe stellt aber eine große Änderung fest. Das Vasotocin macht die Froschblase permeabel, kontrahiert den Rattenuterus und stimuliert die Rückresorption von Wasser in der Niere. Die Substitution von Isoleucin durch Phenylalanin lässt die beiden ersten Eigenschaften fast ganz verschwinden, während die dritte kräftig ansteigt, d.h. das Vasopressin der Säugetiere ist ein starkes Antidiureticum. Beim Schwein ist eine zweite Substitution in Position 8 eingetreten: das basische Arginin ist durch das basische Lysin ersetzt worden. Die chemischen Eigenschaften werden dadurch ebenso wie die biologischen kaum verändert, das Lysinvasopressin ist für das Schwein ein Antidiureticum wie das Argininvasopressin für alle anderen Säugetiere.

Die Transformationen in der Gruppe der Hormone, die in die Fortpflanzungsfunktionen eingreifen, sind zahl-

[21] G. G. Simpson: *The Meaning of Evolution*. Oxford University Press, London 1950.

reicher und aufschlußreicher. Den drei Klassen der Knochenfische, Amphibien und Säugetiere entsprechen die Hormone Isotocin, Mesotocin und Ocytocin. Sie unterscheiden sich nur in den Stellungen 4 und 8. Beim Übergang des Isotocins der Knochenfische in das Mesotocin der Amphibien wurde der Serinrest in Position 4 durch einen Glutaminrest ersetzt. Bei der Umwandlung des Mesotocins der Amphibien in das Ocytocin der Säugetiere wurde das Isoleucin in Position 8 durch

Leucin substituiert (Abb. 8). Das Mesotocin des Frosches liegt also strukturell zwischen dem Isotocin und dem Ocytocin wie in der Evolution die Amphibien zwischen den Knochenfischen und den Säugetieren. Der Rest in Position 8 ist bei den Amphibien noch der gleiche wie bei den Fischen (Isoleucin), während Position 4 schon wie bei den Säugetieren durch Glutamin besetzt ist.

Die Hypophysen-Hormone zeigen also, daß die Evolution der Proteine durch aufeinanderfolgende Substitutionen von Aminosäureresten vor sich gegangen ist. Das stimmt mit Beobachtungen am Hämoglobin, an der Tryptophan-Synthetase und am Protein des Tabakmosaikvirus überein, bei denen Mutationen meist nur einen Aminosäurerest auf einmal betreffen. Übergangsmoleküle, wie sie bei den Hypophysen-Hormonen gefunden wurden, sollten es auch bei anderen Proteinen ermöglichen, die Transformationsschritte zu erkennen. Die Modifikationswahrscheinlichkeit wird allerdings mit der Evolutionszeit und mit der Länge der Peptidkette wachsen, so daß man sich bei der Untersuchung von großen Proteinen auf einander nahestehende Arten beschränken muß, wenn das Problem nicht unlösbar werden soll.

Eingegangen am 6. Juni 1966 [A 539]

Übersetzt von Dr. G. Scheuerbrandt, München