

Multienzym-Komplexe

VON PRIV.-DOZ. DR. U. HENNING [1]

INSTITUT FÜR GENETIK DER UNIVERSITÄT KÖLN

D. E. Green^[2] nannte 1948 die mitochondrialen Enzyme den Cyclophorase-Komplex, um – wie er später kommentierte^[3] – „... to signify that the complex was a unit of enzyme action and not a chance mixture of several hundred enzymes.this complex was visualized as an organized mosaic of enzymes in which each of the large number of component enzymes was uniquely located to permit efficient implementation of consecutive reaction sequences“.

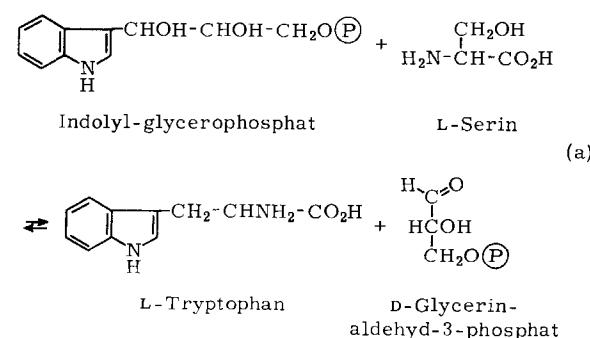
Diese Sätze enthalten das Konzept des Multienzym-Komplexes: Geordnete Assoziation (ohne Beteiligung von Peptidbindungen) verschiedener Enzyme, die aufeinanderfolgende Schritte einer Reaktionskette katalysieren. Es soll hier an einigen Beispielen über neuere Kenntnisse von Eigenschaften solcher Komplexe berichtet werden und es soll der Frage nachgegangen werden, wieweit das Konzept einem biologischen Prinzip entspricht.

Über vorwiegend proteinchemische Aspekte der Assoziation bei Enzymen wurde kürzlich von Sund und Weber^[4] berichtet, über die „makromolekulare Organisation von Enzym-Systemen“ von Reed und Cox^[5].

I. Multienzym-Komplexe im engeren Sinn

1. Tryptophan-Synthetase

Ein sehr klares und relativ einfaches Beispiel gibt die Tryptophan-Synthetase aus *Escherichia coli*. Das Enzym katalysiert in Gegenwart von Pyridoxalphosphat den letzten Schritt (Gl. (a)) in der Reaktionskette der Tryptophan-Biosynthese:



[1] Gegenwärtige Anschrift: Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen.

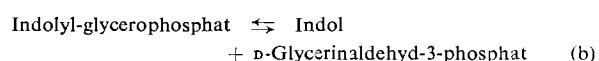
[2] D. E. Green, W. F. Loomis u. V. H. Auerbach, J. biol. Chemistry 172, 389 (1948).

[3] D. E. Green, Harvey Lectures 52, 177 (1958).

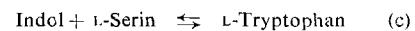
[4] H. Sund u. K. Weber, Angew. Chem. 78, 217 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 231 (1966).

[5] L. J. Reed u. D. J. Cox, Annu. Rev. Biochem. 35, im Druck.

Es kann außerdem die Spaltung



und die Kondensation

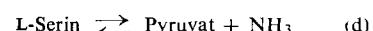


bewirken [6, 7].

Die ausgedehnten Untersuchungen von Yanofsky und Mitarbeitern, wodurch das Enzym zum Bestandteil eines der bestbekannten Gen-Enzym-Systeme wurde, demonstrierten, daß die Synthetase aus zwei Untereinheiten besteht: den Proteinen A und B. Das isolierte kristallisierbare A-Protein vom Molekulargewicht etwa 30000^[8] besteht aus nur einer Polypeptidkette α ^[9], das B-Protein ($M = 117000$) wahrscheinlich aus zwei Ketten (β_1)[10].

Die physiologische Reaktion (a) kann nur ablaufen, wenn die Proteine A und B in Kontakt stehen; Indol tritt als freies Zwischenprodukt nicht auf^[6, 11].

Isoliertes A-Protein ist inaktiv in den Reaktionen (a) und (c), kann aber die Reaktion (b) (erwartungsgemäß unabhängig von Pyridoxalphosphat) mit etwa 1 % der Aktivität bewirken, die in Gegenwart von B vorhanden ist^[12]. Umgekehrt kann isoliertes, pyridoxalphosphat-haltiges B (2 Mol Coenzym pro 1 Mol Protein) nicht die Reaktionen (a) und (b), aber die Kondensation (c) mit 3 bis 10 % der Aktivität katalysieren, die es in Gegenwart von A zeigt^[12]. Später fand sich^[13], daß Protein B auch als L-Serin-Desaminase



wirken kann. Ein Zusatz von A hemmt B in Reaktion (d) nahezu vollständig.

Mehrere Evidenzen machen es äußerst wahrscheinlich, daß an der Aktivierung von A in Reaktion (b) und der von B in Reaktion (c) die katalytischen Wirkungszentren der jeweiligen komplementären Proteine nicht beteiligt sind. Protein B, das infolge Mutation seine enzymatische Wirkung eingebüßt hat, kann wie B des Wildtyps A in Reaktion (b) aktivieren, das Umgekehrte

[6] I. P. Crawford u. C. Yanofsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 1161 (1958).

[7] I. P. Crawford, Biochim. biophysica Acta 45, 405 (1960).

[8] U. Henning, D. R. Helinski, F. C. Chao u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 237, 1523 (1962).

[9] B. C. Carlton u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 237, 1531 (1962).

[10] D. A. Wilson u. I. P. Crawford, Bacteriol. Proc. USA 1964, 92.

[11] C. Yanofsky u. M. Rachmeler, Biochim. biophysica Acta 28, 640 (1958).

[12] C. Yanofsky, Bacteriol. Rev. 24, 221 (1960).

[13] I. P. Crawford u. J. Ito, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 390 (1964).

trifft für A zu, das infolge Mutation inaktiv wurde. Ferner beobachtet man eine etwa 20-fache Zunahme der Aktivität von B in Reaktion (c) in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen in hoher Konzentration^[14]. Schließlich wurde eine Mutante von *E. coli* isoliert^[15], die ein defektes Protein B produziert, das allein in Reaktion (c) inaktiv ist; in Gegenwart von A dagegen beobachtet man die Aktivitäten aller drei Tryptophan-Synthetase-Reaktionen.

Die beiden Proteine sind nur sehr lose assoziiert^[16]. Zur Komplexbildung zwischen A und B ist L-Serin und Pyridoxalphosphat erforderlich. Zentrifugieren einer Mischung von A und B in einen Rohrzucker-Dichtegradienten trennt die Komponenten A (2,7 S) und B (5,1 S) praktisch vollständig, der A-B-Komplex (6,4 S) erscheint nach Inkubation der Mischung mit L-Serin und Coenzym^[16]. Der vollständig assoziierte A-B-Komplex, die Tryptophan-Synthetase, enthält je zwei Mol A und ein Mol B und hat damit wahrscheinlich die Polypeptidketten-Formel $\alpha_2\beta_2$ ^[16,17].

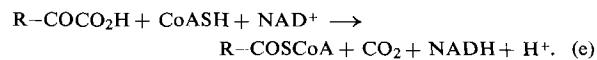
Die den Komponenten zugehörigen enzymatischen Aktivitäten ändern sich bei der Komplexbildung z.T. um Größenordnungen. Die Aktivierung durch NH_4^+ sowie das Verhalten der verschiedenen, infolge Mutation enzymatisch inaktiven Proteine sind sehr starke Hinweise dafür, daß Komplexbildung *per se* für die Änderung der enzymatischen Aktivität verantwortlich ist. Vermutlich ereignen sich bei der Assoziation Konformationsänderungen der Proteine, für die das enzymatische Wirkungszentrum der jeweils komplementären Komponente nicht direkt verantwortlich ist.

Interessant ist ein Vergleich der Tryptophan-Synthetase von *E. coli* (oder anderer Enterobakterien) mit der von *Neurospora*. Das Neurospora-Enzym^[18,19] ($M \approx 135000$) konnte bisher nicht in enzymatisch aktive Untereinheiten dissoziiert werden. Nur nach Reduktion mit Mercapto-äthanol in 5 M Guanidiniumchlorid zerfällt das Protein in 4 Untereinheiten, von denen je 2 identisch sein können^[19]. Dieser Befund veranlaßte Bonner^[20] zur Vermutung, daß die beiden Tryptophan-Synthetasen verschiedene Evolutionsstufen repräsentieren könnten. Es ist denkbar, daß zunächst die Tryptophan-Synthetase-Reaktion in getrennten Schritten mit Indol als freiem Zwischenprodukt erfolgte. Mit der Entwicklung der Assoziation der beiden Proteine wird Indol nicht mehr freigesetzt, während der weiteren Evolution mag die Bindung der beiden Proteine „fester“ geworden sein.

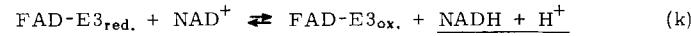
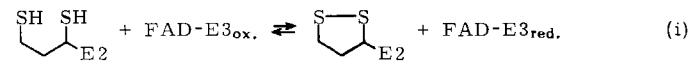
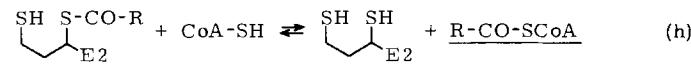
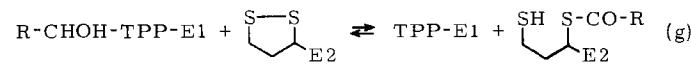
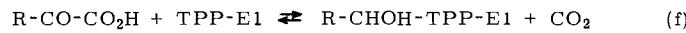
- [14] M. Hatanaka, E. A. White, K. Horibata u. I. P. Crawford, Arch. Biochem. Biophysics 97, 596 (1962).
- [15] M. Hatanaka u. I. P. Crawford, Bacteriol. Proc. USA 1965, 88.
- [16] T. Creighton u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 241, 980 (1966).
- [17] D. Wilson u. I. P. Crawford, J. biol. Chemistry 240, 4081 (1965).
- [18] W. C. Mohler u. S. R. Suskind, Biochim. biophysica Acta 43, 288 (1960).
- [19] M. Carsiotis, E. Apella, P. Provost, J. Germershausen u. S. R. Suskind, Biochem. biophysic. Res. Commun. 18, 877 (1965).
- [20] D. M. Bonner, J. A. DeMoss u. S. E. Mills in: V. Bryson u. H. J. Vogel: Evolving Genes and Proteins. Academic Press, New York 1965, S. 305.

2. Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenasen

In tierischen Geweben, auch weit verbreitet bei Pilzen und Bakterien, ist der Hauptweg des Abbaus der beiden α -Ketosäuren die oxidative Decarboxylierung:



Diese Gesamtreaktion (e) läuft nach gegenwärtiger Kenntnis^[5,21] über die Teilschritte (f) bis (k) ab.



Am bekanntesten ist die Pyruvat-Dehydrogenase von *E. coli*, die als einheitliches Protein ($M = 4,8 \times 10^6$) isoliert wurde^[22]. Elektronenmikroskopische Bilder^[23] des Komplexes (Abb. 1) zeigen eine polyedrische Struktur mit einem Durchmesser von 300–350 Å.

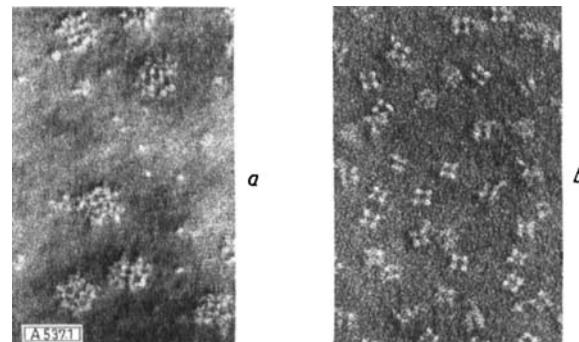


Abb. 1. a) Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus *E. coli*, Vergrößerung 260000-fach. b) Lipoat-Reduktase-Transacetylase-Komponente des Enzym-Komplexes, gleiche Vergrößerung. Die Tetraden-Struktur der Komponente ist im Zentrum des Komplexes (1a) sichtbar. In diesen Projektionen ist der Durchmesser des Komplexes etwa 300 Å und der der Komponente etwa 120 Å. Beide Präparate wurden nach dem Negative-Staining-Verfahren mit Phosphorwolframsäure erhalten.

Der Komplex läßt sich unter milden Bedingungen in drei Proteine zerlegen^[24], denen mit Hilfe von Modellreaktionen die Aktivitäten der Reaktionen (f) bis (k) zugeordnet werden konnten: die thiaminpyrophosphat- (TPP)-abhängige Pyruvat-Decarboxylase (E1), die li-

[21] I. C. Gunsalus in W. D. McElroy u. B. Glass: The Mechanism of Enzyme Action. Johns Hopkins Press, Baltimore 1964, S. 545.

[22] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, J. biol. Chemistry 235, 1924 (1960).

[23] H. Fernandez-Moran, L. J. Reed, M. Koike u. C. R. Willms, Science (Washington) 145, 930 (1964).

[24] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, J. biol. Chemistry 238, 30 (1963).

ponsäurehaltige Lipoat-Reduktase-Transacetylase (E2) und das Flavoprotein Dihydrolipoat-Dehydrogenase (E3). Die Proteine assoziieren *in vitro* spontan zum Komplex^[24], E1 assoziiert nicht mit E3, aber E2 bindet E1 wie E3. Eine Molekül des Komplexes enthält etwa zwölf Moleküle der Decarboxylase ($M = 1,83 \times 10^5$), eine Molekül des E2 ($M = 1,6 \times 10^6$) und etwa sechs Moleküle des Flavoproteins ($M = 1,12 \times 10^5$)^[5]. Sehr wahrscheinlich liegt die Lipoat-Reduktase-Transacetylase zentral (vgl. Abb. 1) und ist von den beiden anderen Enzymen umgeben.

Die reversible Dissoziation der Lipoat-Reduktase-Transacetylase gelang ebenfalls; sie zerfällt bei $pH = 2,6$ in Untereinheiten vom $M \approx 7 \times 10^4$ ^[5]. Das Enzym enthält ein Mol Liponsäure pro $3,5 \times 10^4$ g des Proteins, es ist daher möglicherweise nicht aus etwa 24, sondern etwa 48 Polypeptidketten vom Molekulargewicht $3,5 \times 10^4$ aufgebaut. Die Zusammensetzung der Decarboxylase ist noch unbekannt; auf die des Flavoproteins wird unten näher eingegangen. Die Liponsäure ist covalent an die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes gebunden^[25]. Der Dithiolanring des Coenzymes muß in Reaktion treten mit a) dem Hydroxyäthyl-TPP der Decarboxylase, b) dem Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) der Dihydrolipoat-Dehydrogenase und c) dem Coenzym A. Da die Zwischenprodukte der Gesamtreaktion enzymgebunden bleiben, scheinen räumliche Schwierigkeiten dafür zu bestehen, daß ein- und derselbe Liponsäurerest mit allen genannten prosthetischen Gruppen in Wechselwirkung tritt. Das Verhältnis Liponsäure:FAD im Komplex ist etwa 4:1. Die Bindung der Liponsäure schafft einen „flexiblen Arm“ (etwa 14 Å lang), das Coenzym mag im Enzymkomplex um das α-C-Atom des Lysin-Restes rotierbar sein^[24, 26]. Es ließ sich zeigen,

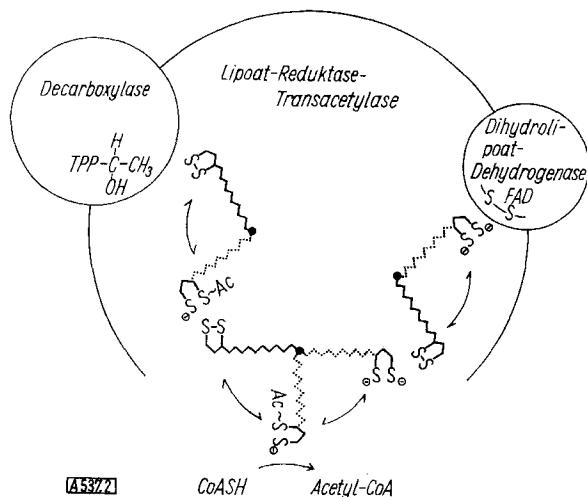
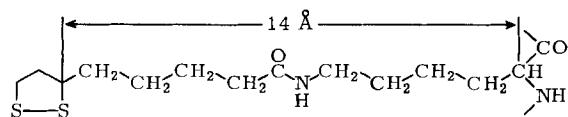


Abb. 2. Schema der hypothetischen Wechselwirkung zwischen den Coenzymen der Pyruvat-Dehydrogenase^[24].

Der Dreipunkt der Liponsäure-Reste ist das α-C-Atom eines Lysin-Restes:



[25] H. Nawa, W.T. Brady, M. Koike u. L.J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 82, 896 (1960).

[26] R.M. Bock u. R.S. Criddle, zit. in D.E. Green, Comparat. Biochem. Physiol. 4, 81 (1962).

dass alle Liponsäurereste an der Pyruvat-Oxidation beteiligt sein können. Angesichts dieser Situation wurde vorgeschlagen^[24], daß verschiedene Liponsäurereste an den verschiedenen Teilschritten beteiligt sein könnten (Abb. 2), was in der Tat eine sehr bemerkenswerte Art des Elektronen-Transportes an einer Protein-Molekül wäre.

Die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase von *E. coli* ($M = 2,4 \times 10^6$)^[22, 24] bietet ganz ähnliche Verhältnisse. Auch hier gelang die reversible Dissoziation in α-Ketoglutarat-Decarboxylase, Lipoat-Reduktase-Transsuccinylase und Dihydrolipoat-Dehydrogenase. Die Flavoproteine der beiden α-Ketosäure-Dehydrogenasen sind funktionell austauschbar, das der Pyruvat-Dehydrogenase wird von der Lipoat-Reduktase-Transsuccinylase gebunden, und umgekehrt; „hybride“ Bindung der Decarboxylasen erfolgt nicht^[27].

Es wäre möglich, daß die beiden Flavoproteine identisch sind^[5, 28]. Träfe dies zu, würde ein interessantes Problem für die Regulation der Synthese der Dihydrolipoat-Dehydrogenase bestehen, da die Synthese der Pyruvat- und α-Ketoglutarat-Dehydrogenasen nicht der gleichen Regulation unterliegen^[29].

Die Frage, ob der Enzym-Komplex in gleicher Form in der Zelle vorliegt, in der er nach der Reinigung erhalten wird, ist ungelöst. Da jedenfalls die Zwischenprodukte der Gesamtreaktion (e) enzymgebunden bleiben, ist irgendeine Form der Assoziation der einzelnen Enzyme notwendig. Denkbar wäre allerdings, daß der große isolierte Komplex ein Kunstprodukt ist, das aus kleineren Komplexen aggregiert ist, die in der Zelle an andere Strukturen gebunden waren. Verschiedene Argumente lassen sich gegen diese Vorstellung vorbringen; z.B. findet man in Mutanten, bei denen die Decarboxylase-Komponente ihre enzymatische Aktivität verloren hat, einen „partiellen“ Komplex, der nur aus Lipoat-Reduktase-Transacetylase und dem Flavoprotein besteht^[30]. Dieser Teilkomplex scheint der gleiche zu sein, der nach Entfernen der Decarboxylase vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex *in vitro* erhalten wird.

Hinsichtlich der α-Ketosäure-Dehydrogenasen aus tierischen Zellen, in denen die Enzyme Bestandteile von Mitochondrien sind, sei auf das Referat von Reed und Cox^[5] verwiesen.

3. Fettsäure-Synthetase

Eine ganz ähnliche Organisation von Struktur und Funktion findet sich bei der Synthese der unverzweigten gesättigten Fettsäuren. Die Arbeiten von Lynen und Mitarbeitern^[31] haben gezeigt, daß die Gesamtreaktion (I) in Hefe von einem einheitlichen Protein ($M = 2,3 \times 10^6$) katalysiert wird, die Hauptprodukte sind Pal-

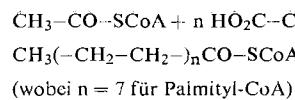
[27] B.B. Mukherjee, J. Matthews, D.L. Horney u. L.J. Reed, J. biol. Chemistry 240, PC 2268 (1965).

[28] U. Henning, G. Dennert, R. Hertel u. S.W. Shipp, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, im Druck.

[29] U. Henning u. G. Deppe, unveröffentlicht.

[30] U. Henning, C. Herz u. K. Szolyvay, Z. Vererbungslehre 95, 236 (1964).

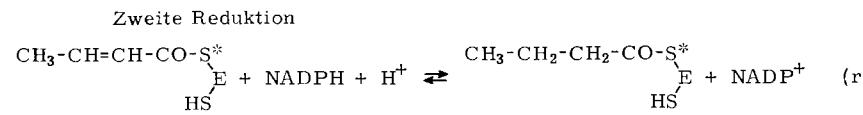
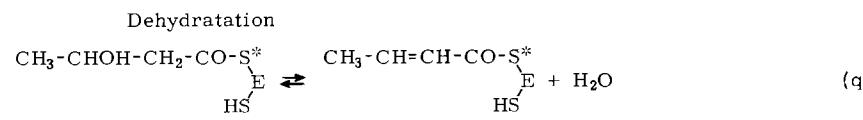
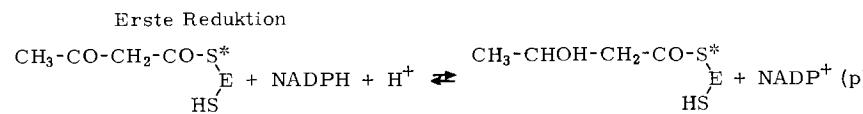
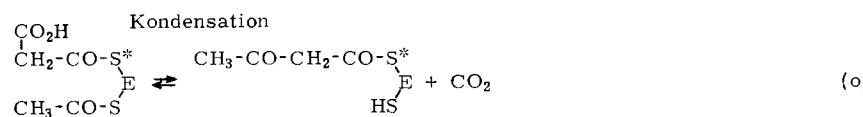
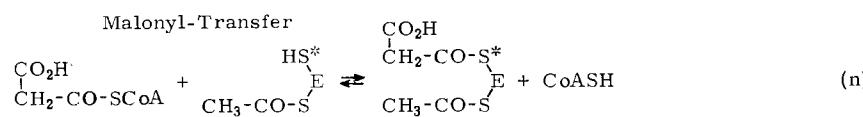
[31] F. Lynen, Angew. Chem. 77, 929 (1965).



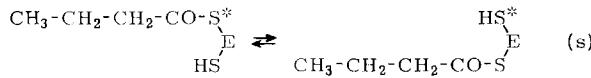
metyl- und Stearyl-CoA. Die Nettoreaktion läuft an der Fettsäure-Synthetase in folgenden Teilschritten ab: Der



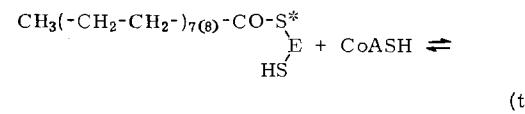
Acetyl-Transfer [Gl. (m)] ist Startreaktion. Die fünf folgenden Reaktionen dienen der Kettenverlängerung; sie beginnen mit dem Malonyl-Transfer [Gl. (n)],



worauf die den Malonyl-Rest akzeptierende SH-Gruppe durch den Butyryl-Transfer [Gl. (s)] wieder freigesetzt wird.



Bei Erreichen der Kettenlänge von C_{16} bis C_{18} wird schließlich das Stearyl- oder Palmityl-CoA gebildet:



Die Existenz der funktionell verschiedenen SH-Gruppen (HS^* -, $\text{HS}-$) ließ sich nachweisen^[32]. Wie bei den anderen Enzymkomplexen bleiben alle Intermediärprodukte enzym gebunden.

[32] F. Lynen in M. Sela: New Perspectives in Biology. B. B. A. Library Vol. 4, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam-London-New York 1964, S. 132.

Offenbar entsprechen den sieben Reaktionsschritten (m)–(s) sieben verschiedene Untereinheiten in der Synthetase; die Dissoziation des Enzyms unter Erhaltung der Einzelaktivitäten gelang bisher nicht. Ein elektronenmikroskopisches Bild^[33] der Synthetase (Abb. 3) zeigt deren geordnete Struktur, Partikel von einem Durchmesser von 200 bis 250 Å. Es erinnert an die Tryptophan-Synthetase, daß das Enzymsystem aus *E. coli*, das die Fettsäure-Synthese ausführt, ohne Schwierigkeit in Enzymfraktionen verschiedener Funktion getrennt werden kann^[34].

Auf Einzelheiten bakterieller und tierischer Systeme kann hier nicht eingegangen werden. Die elektronenmikroskopischen Bilder und die Tatsache, daß sich die Synthetase aus

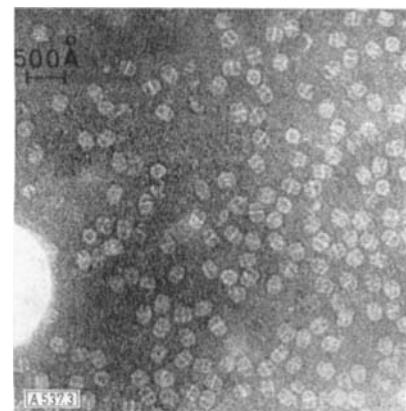


Abb. 3. Fettsäure-Synthetase aus Hefe [33]. (Präparation wie bei Abb. 1, Vergrößerung 250000-fach).

[33] A. Hagen u. P. H. Hofschneider in M. Titlbach: Electron Microscopy 1964 (Proc. 3rd European Regional Conference). Publishing House Czechoslovak Acad. Sci., Prag 1964, Vol. 13, S. 69.

[34] P. R. Vagelos, Annu. Rev. Biochem. 33, 139 (1964).

4. Andere Multienzym-Komplexe

Sicherlich sind die beschriebenen Beispiele nicht Spezialfälle von geringer genereller Bedeutung.

Auch für eine Reihe anderer Reaktionsfolgen liegen Hinweise vor, daß sie von einem funktionellen Komplex katalysiert werden. Dies gilt für die vier Enzyme, die in *Neurospora* Valin aus Pyruvat, bzw. Isoleucin aus Pyruvat und α -Ketobutyrat synthetisieren^[35, 36], das Gleiche gilt für die Isoleucin-Synthese in *Salmonella*^[37]. Drei Enzyme des Biosyntheseweges des Tryptophans scheinen in *Neurospora* als funktionelle Einheit zu wirken^[38], ebenso drei Enzyme der Histidin-Biosynthese in *Neurospora*^[39]. Da im letzten Fall die drei fraglichen Enzyme nicht drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten, sondern dem 2., 3. und 10. Schritt entsprechen, liegt der Verdacht nahe, daß alle relevanten Enzyme in vivo in einer Einheit zusammengefaßt sind.

Die allen Beispielen gemeinsamen Charakteristika sind leicht kenntlich und in wohl kürzester Form von *Lynen*^[32] als „strikte Kompartmentalisierung auf dem kleinstmöglichen Raum“ charakterisiert worden. Wenn in Sequenz operierende Enzyme auch räumlich zusammenhängen, ist leicht vorstellbar, daß der Wirkungsgrad der gesamten Reaktionsfolge größer sein kann als wenn solche Enzyme getrennt und erst beim Erreichen bestimmter Konzentrationen der diffundierenden Zwischenprodukte optimal arbeiten würden. Auch wird in Reaktionsketten mit enzym-gebundenen Zwischenprodukten verhindert, daß u. U. verschiedene Enzyme um ein Zwischenprodukt konkurrieren.

Die spezifischen Aktivitäten der Fettsäure-Synthetase aus Hefe und der Pyruvatdehydrogenase sind hoch: ein Komplex der Synthetase kann pro Minute die Umwandlung von $2,4 \times 10^3$ Molekülen Malonyl-CoA zur Fettsäure katalysieren; ein Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex kann bei 30 °C pro Minute wenigstens $1,25 \times 10^4$ Molekülen Acetyl-CoA aus Pyruvat produzieren.

Man könnte folgern, daß das Konzept des Multienzym-Komplexes das biologische Prinzip „Steigerung des Wirkungsgrades“ treffend wiedergibt. Vermutlich aber ist diese Ansicht noch zu wenig umfassend. Wenigstens in höheren Organismen sind die besprochenen großen Enzym-Komplexe in den Mitochondrien lokalisiert. Das Gleiche gilt für die erwähnten Enzyme der Valin- und Isoleucin-Biosynthese in *Neurospora*^[35, 36]; in *Salmonella*^[37] findet sich das Isoleucin-System in der Membran-Fraktion der Zellen. Es erscheint sehr sinnvoll, Enzym-Systeme räumlich zu vereinen, wenn sie an größere Zellstrukturen gebunden sind, auch dann, wenn sie nicht ihrerseits wieder Bestandteile oder „Zulieferungs“-Enzyme weiterer Prozesse (z. B. Atmungs-Kette) sind. Ein weiterer interessanter spekulativer Aspekt (der

[35] K. Kiritani, S. Narise, A. Bergquist u. R. P. Wagner, Biochim. biophysica Acta 100, 432 (1965).

[36] R. P. Wagner, A. Bergquist u. T. Barbee, Biochim. biophysica Acta 100, 444 (1965).

[37] C. S. Cronenweitz u. R. P. Wagner, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 1643 (1965).

[38] J. A. DeMoss u. J. Wegman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 241 (1965).

[39] A. Ahmed, M. E. Case u. N. H. Giles, Brookhaven Symp. Biol. 17, 53 (1964).

in anderem Zusammenhang von *Delbrück* geäußert wurde^[39a]) ist, daß struktur-gebundene Enzyme dann ihre Oberfläche enorm vergrößern könnten, wenn das Substrat von der Struktur (z. B. Membran) festgehalten werden und auf ihr zum Enzym wandern kann.

II. Erweiterung des Konzeptes: Homo- und heterofunktionelle Enzym-Komplexe

Hinsichtlich des Enzym-Proteins ist die Definition des Multienzym-Komplexes im eingangs erwähnten Sinn eigentlich eine teleologische und damit zu speziell. Besonders eindringlich ist das an den Beispielen des Hämoglobins und Myoglobins^[41–43] zu sehen, die *Frieden*^[40] sehr treffend als „perfekte“ Enzyme bezeichnet hat, weil sie ohne störende Produkt-Bildung das Studium der Enzym-Substrat-Wechselwirkung erlauben. Die den vier Polypeptidketten des Hämoglobins entsprechenden vier Hämgruppen, und damit die Wirkungszentren, liegen in taschenförmigen Einstülpungen in jeder der zwei α - und β -Ketten an der Oberfläche der Molekel, ohne in Kontakt miteinander zu stehen. Die tertiäre Struktur (und auch die Lage des Häms) des aus nur einer Polypeptidkette bestehenden Myoglobins ist der tertiären Struktur jeder Hämoglobin-Kette äußerst ähnlich; und das Myoglobin kann in diesem Sinn als natürlich vorkommende Untereinheit des Hämoglobins angesehen werden. Die Aktivität ist für alle Polypeptidketten die gleiche. Im Gegensatz zum Myoglobin führt aber die O₂-Bindung beim Hämoglobin zu einer Häm-Häm-Wechselwirkung, einer Cooperation der Bindungsstellen^[44–46]. Die Reaktionsgeschwindigkeit eines Häms mit O₂ hängt vom Zustand der Beladung der übrigen Hämme mit O₂ ab, sie nimmt zu, je mehr O₂ schon gebunden ist. Assoziation von verschiedenen Untereinheiten gleicher Aktivität führt also auch hier – in weiterem Sinn – zur Steigerung des Wirkungsgrades.

Es erhebt sich die Frage, ob der Aufbau einer Proteinmolekel aus mehreren Untereinheiten, also das Vorhandensein von Quartärstruktur, allein schon einen Multienzym-Komplex ausmachen kann. Zu vermuten ist, daß dies nicht so ist, sondern daß die Zelle von der Assoziation auch Gebrauch macht, um ein Wirkungszentrum erst zu schaffen. Ein solcher Fall scheint bei der Dihydrolipoat-Dehydrogenase vorzuliegen (vgl. Reaktion (i) und (k)) wie dank der Studien *Masseys*^[47, 48] an diesem Enzym des Schweineherzens kenntlich ist.

[39a] M. Delbrück, persönliche Mitteilung.

[40] C. Frieden, Brookhaven Symp. Biol. 17, 98 (1964).

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

[42] M. F. Perutz, Angew. Chem. 75, 589 (1963).

[43] G. Braunitzer, K. Hilse, W. Rudloff u. U. Hilschmann, Advances Protein Chem. 19, 1 (1964).

[44] R. Benesch u. R. E. Benesch, J. molecular Biol. 6, 489 (1963).

[45] H. Muirhead u. M. F. Perutz, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 451 (1963).

[46] R. E. Benesch, R. Benesch u. G. McDuff, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 535 (1965).

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

[48] V. Massey in P. D. Boyer, H. L. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York 1963, Vol. 7, S. 275.

Das Enzym besteht aus zwei mit großer Wahrscheinlichkeit identischen Polypeptidketten mit jeweils $M = 50000$; pro mol Enzym sind 2 mol FAD und 4 mol Cystinreste (neben 12 Cysteinresten) vorhanden. Zwischenprodukt ist reduziertes Enzym (Reaktion (i)), in dem jedoch im Gegensatz zu mehreren anderen FAD-haltigen Dehydrogenasen das Flavin-Coenzym nur ein Elektron aufnimmt. Das so reduzierte Enzym zeigt ein Differenzspektrum, das dem der semichinoiden Form des FMN ähnlich ist, wie es in vitro als Charge-transfer-Komplex beim Einstellen des Gleichgewichts auftritt, wenn bestimmte Mengen FMN und FMMH_2 gemischt werden. Diese Form („rotes“ Enzym) konnte erhalten werden, wenn auf stöchiometrische Mengen der Dehydrogenase NADH oder Dihydroliponsäure einwirkten. Spektrophotometrische Titration der letztgenannten Reaktion mit dem einen oder dem anderen Substrat demonstriert aber, daß beim Erreichen der roten Form des Proteins pro FAD zwei Elektronen aufgenommen worden waren. Die Diskrepanz ließ sich auflösen, als ein Disulfid als zweite prosthetische Gruppe des Enzyms entdeckt wurde und durch amperometrische Titration nachgewiesen werden konnte, daß das zugegebene NADH zur Bildung eines Dithiols führt. Wird aus einem Ansatz mit NADH und Enzym entstehendes NAD mit einer NADase entfernt (die NADH nicht angreift), so wird das Enzym vollständig reduziert und farblos: vier Elektronen pro FAD werden aufgenommen. Das farblose Enzym kann mit NAD wieder zur roten Form zurückreagieren.

Die Dihydroliponsäure-Dehydrogenase ist im oxidierten gelben Zustand ungewöhnlich stabil gegenüber Harnstoff (bei 0°C in 6,5 M Harnstoff gehen nach einem Monat erst etwa 30 % der Aktivität verloren!); ebenso wird die rote Form des Enzyms in Harnstoff nicht inaktiviert. In Gegenwart eines Substratüberschusses von NADH oder Dihydroliponsäure in 6,5 M Harnstoff erscheint zunächst das Spektrum des halb-reduzierten Enzyms, das aber bald dem des vollständig reduzierten Proteins Platz macht. In der Harnstofflösung ist das vollständig reduzierte Enzym instabil: das FADH_2 (bzw. FAD nach Luftzutritt) löst sich vom Protein und wird dialysierbar; das Protein wird unlöslich, sobald die Harnstoff-Konzentration unter 2 M gesenkt wird, und das Molekulargewicht der so behandelten Dehydrogenase sinkt auf die Hälfte dessen des nativen Proteines.

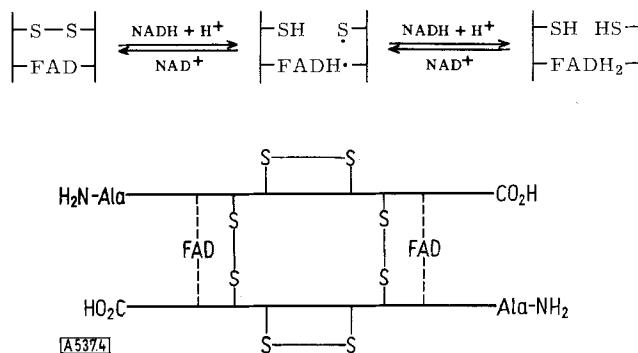


Abb. 4. Schema der Dihydrolipoat-Dehydrogenase [47]. Die im Text beschriebenen Stufen der Reduktion des Enzyms sind hier im Modell dargestellt [47].

In Abbildung 4 ist das aus diesen u.a. Daten abgeleitete Modell *Masseys* wiedergegeben. Offensichtlich sind mit den Disulfidbrücken beide Polypeptidketten am katalytischen Geschehen beteiligt. Das Wirkungszentrum liegt buchstäblich zwischen den Polypeptidketten, denn offenbar nehmen wenigstens Cystinreste beider Ketten als Bestandteile eines Wirkungszentrums teil. Man müßte jedoch wissen, ob auch weitere Aminosäure-Reste, die dem Wirkungszentrum zugehören, von beiden Ketten stammen.

Das geschilderte Beispiel soll nicht etwa implizit demonstrieren, daß Enzyme dieser Art notwendigerweise aus identischen Polypeptidketten bestehen müssen. Eine Assoziation verschiedenartiger Polypeptidketten kann zu fast gleicher katalytischer Wirksamkeit führen, wie von verschiedenen Formen der Milchsäure-Dehydrogenase gut bekannt ist [49, 50]. Sie können entweder aus vier jeweils identischen (die sogenannten Isozyme I und V aus den Ketten H und M) oder Mischungen integrier molarer Anteile der Ketten H und M bestehen (Isozyme II, III und IV: 1H2M, 2H2M, 1H3M). Holbrook [51] hat kürzlich Daten mitgeteilt, die ihn zur Hypothese führten, daß auch hier die Wirkungszentren aus Teilen benachbarter Untereinheiten zusammengesetzt seien. Auch bei der Aldolase, die nur ein Wirkungszentrum hat, aber aus wenigstens drei (oder sechs) Polypeptidketten besteht [52–55], sind ähnliche Verhältnisse zu erwägen.

Die direkte Beteiligung mehrerer Untereinheiten einer Enzym-Moleköl an einem Wirkungszentrum ist jedoch hypothetisch. Sollte diese Hypothese zutreffen, bleibt abzuwarten, ob es richtig ist, solche Enzyme besonders zu klassifizieren, da der Übergang zu Proteinen vom Typ der Tryptophan-Synthetase fließend sein mag. Es wäre im übrigen nicht einfach, eine sinnvolle Spekulation über die Entstehung von Enzymen mit „gemischten“ Wirkungszentren (Dihydrolipoat-Dehydrogenase) in der biochemischen Evolution anzustellen.

Aus allen bisher genannten Beispielen ist abzulesen, daß ein Protein sicherlich dann als Multienzym-Komplex anzusehen ist, wenn an verschiedenen Untereinheiten die Wirkungszentren für verschiedene Teilschritte einer Gesamtreaktion vorliegen. Es besteht jedoch hinsichtlich des Proteines kein prinzipieller Unterschied zwischen solchen Komplexen und Enzymen, in denen gleichartige aktive Zentren auch an ihren Untereinheiten vorhanden sind und nicht erst durch Vereinigung der Untereinheiten in der Weise entstehen, daß Anteile zweier oder mehrerer Untereinheiten das Wirkungszentrum bilden. Will man klassifizieren, erscheint es sinnvoller, je nach Identität oder Verschiedenheit der Untereinheiten wie Wirkungszentren zwischen homofunktionellen und heterofunktionellen Multienzym-Komplexen zu unterscheiden.

Der „Heterofunktion“ bei Assoziation fügt sich zwangslässig der sogenannte allosterische Effekt [56, 57] ein, für den Assoziation offenbar eine notwendige Voraussetzung ist. Ein Beispiel war schon mit der Häm-Häm-

[49] N. O. Kaplan, Brookhaven Symp. Biol. 17, 131 (1964).

[50] T. Wieland u. G. Pfeiderer, Angew. Chem. 74, 261 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 169 (1962).

[51] J. J. Holbrook, Biochem. Z. 344, 141 (1966).

[52] L. F. Hass, Biochemistry 3, 535 (1964).

[53] J. A. Winstead u. F. Wold, J. biol. Chemistry 239, 4212 (1964).

[54] E. W. Westhead, L. Butler u. P. D. Boyer, Biochemistry 2, 927 (1963).

[55] E. Grazi, T. Cheng u. B. L. Horecker, Biochem. biophysic. Res. Commun. 7, 250 (1962).

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

[57] J. Monod, J. Wyman u. J. P. Changeux, J. molecular Biol. 12, 88 (1965).

Wechselwirkung beim Hämoglobin genannt. Ein anderer extremer Fall wurde an der Aspartat-Transcarbamylase (ATC) von *E. coli* aufgeklärt [58].

Das Enzym leitet mit der Reaktion: Carbamylphosphat + Aspartat → Carbamylaspartat die Biosynthese des Cytidintriphosphates (CTP) ein. Es unterliegt der Regulation durch Rückkopplung, CTP hemmt seine Aktivität. Die ATC ($M \approx 3 \times 10^5$) besteht aus enzymatisch inaktiven regulatorischen Untereinheiten ($M \approx 3 \times 10^4$) und enzymatisch aktiven Untereinheiten ($M \approx 9 \times 10^4$); nur die erstere Art bindet CTP. Die von der regulatorischen Untereinheit befreite enzymatisch aktive Untereinheit wird durch CTP nicht mehr gehemmt.

Man kann folgern, daß Multienzym-Komplexe im Prinzip gegenüber anderen Proteinen mit Quartärstruktur

[58] J. C. Gerhart, Brookhaven Symp. Quant. Biol. 17, 222 (1964).

keine Sonderstellung einnehmen. Ob die Vorstellung von homo- und heterofunktionellen Komplexen eine bessere Sicht verschafft, bleibt abzuwarten, da die Organisation der Enzyme weitläufiger ist als hier beschrieben werden konnte. Es blieben Systeme unberücksichtigt, die im Zusammenhang größerer Zellstrukturen wirken, z.B. die vektoriellen Enzyme der Transportsysteme an Membranen oder die mechano-chemischen Systeme kontraktiler oder sonst beweglicher Strukturen.

Für die Überlassung von Abbildungen danke ich den Herren Prof. L. J. Reed und Dr. R. M. Oliver (Abb. 1) sowie Prof. F. Lynen (Abb. 2). Erwähnte eigene Versuche wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 1. Juni 1966 [A 537]

Chemie und Biochemie des Insulins

VON DR. H. KLOSTERMEYER

DEUTSCHES WOLFFORSCHUNGSIINSTITUT AN DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN

UND PRIV.-DOZ. DR. R. E. HUMBEL

BIOCHEMISCHES INSTITUT, UNIVERSITÄT ZÜRICH (SCHWEIZ)

Das Eiweißhormon Insulin ist im Tierreich weit verbreitet, seine Aminosäurezusammensetzung ist bei gleicher biologischer Wirksamkeit sehr unterschiedlich. — Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch drei Cystinreste zu einem bicyclischen System aus 20 und 85 Ringgliedern verknüpft sind. — Das Protein kristallisiert mit Fremdionen in verschiedenen Formen. In Lösungen bildet Insulin gewöhnlich Aggregate aus 2^n Molekülen. — Das Hormon kann aus den getrennten Polypeptidketten regeneriert werden. Die Totalsynthese erfolgte analog aus synthetisierten Peptidketten. — Bei der Biosynthese wird Insulin anscheinend auch aus den beiden separat entstandenen Ketten zusammengefügt. — Im Organismus fördert Insulin den Aufbau von Glykogen, Fett und Protein; Insulinmangel äußert sich im Anstieg des Blutzuckers. Der eigentliche Wirkungsmechanismus des Hormons ist immer noch unbekannt. — Ein spezifisches Wirkzentrum konnte im Insulinmolekül noch nicht nachgewiesen werden, es enthält mehrere antigene Bereiche.

Einführung

1788 beobachtete der Arzt Cowley^[1] einen Zusammenhang zwischen gestörter Pankreasfunktion und Zuckerkrankheit; von Mering und Minkowski^[2] zeigten 1889, daß sich der Diabetes mellitus durch Pankreasextirpation experimentell erzeugen läßt. Als Entstehungsort des blutzuckersenkenden Prinzips der Bauchspeicheldrüse erkannten Schulze^[3] und Ssobolew^[4] 1900 die Langerhansschen Inselzellen; die unbekannte Substanz wurde darum 1909 „Insulin“^[5] genannt. Die Extraktion von

[1] Cowley, London med. journal 1788.

[2] J. v. Mering u. O. Minkowski, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 26, 371 (1890).

[3] Schulze, Arch. f. mikros. Anat. u. Entwicklungsmech. 56, (1900).

[4] Ssobolew, Zentralblatt Pathol. 11, 202 (1900).

[5] de Meyer, Archivio di fisiologia 7, 96 (1909).

Insulin aus dem Pankreas gelang wohl schon 1911^[6], wurde aber erst 1920 von Banting und Best^[7] unter Mitwirkung des Biochemikers Collip konsequent durchgeführt. Damit begann die Chemie des Insulins. Sie führte über die Reindarstellung durch Abel (1926)^[8] zur Ermittlung der Konstitutionsformel durch Sanger (1955)^[9] und zur Synthese (1963)^[10, 11]; die vor 30 Jahren be-

[6] E. L. Scott, Amer. J. Physiol. 29, 306 (1911/12).

[7] F. G. Banting u. C. H. Best, J. Lab. clin. Med. 7, 251 (1922).

[8] J. J. Abel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 12, 132 (1926).

[9] A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith u. R. Kitai, Biochem. J. 60, 541 (1955).

[10] J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda u. H. Zahn, Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963).

[11] P. G. Katsoyannis, A. Tometsko u. K. Fukuda, J. Amer. chem. Soc. 85, 2863 (1963); P. G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki u. M. Tilak, ibid. 86, 930 (1964); G. H. Dixon, Excerpta Medica Int. Congr. Ser. 83, 1207 (1964).