

als eine verkleinerte symbiotische Lebensform betrachtet werden, die sich aus semiautonomen, genetisch unabhängigen, eng miteinander integrierten Organellen zusammensetzt. Für eine solche Betrachtungsweise spricht das Auftreten von DNS in Chloroplasten<sup>[99]</sup> und Mitochondrien<sup>[100]</sup> sowie das Vorkommen einer

[99] A. Gibor u. S. Granick, *Science (Washington)* 145, 890 (1964).  
[100] M. M. K. Nass, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 53, 1215 (1966).

besonderen Messenger-RNS-Fraktion an den Polysomen plasmatischer Membranen<sup>[101]</sup>.

*Für die großzügige Unterstützung der Arbeit durch den Schwedischen Naturwissenschaftlichen Forschungsrat wird gedankt.*

Eingegangen am 1. Juli 1968 [A 685]

[101] B. Attardi u. G. Attardi, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 58, 1051 (1967).

## Lysozyme: Ein Kapitel Molekularbiologie

Von P. Jolles<sup>[\*]</sup>

*Hühnereiweiß-Lysozym war das erste Enzym, dessen Tertiärstruktur aufgeklärt werden konnte. Seine Peptidkette ist in zwei etwa gleich großen Teilen angeordnet, zwischen denen ein tiefer Spalt klafft. Die Substrate (und Inhibitoren) werden in diesem Spalt durch Wasserstoffbrücken gebunden und unter Mitwirkung von Glu 35 und Asp 52 – die das aktive Zentrum bilden – hydrolysiert. – Die Lysozyme, die in vielen Tier- und Pflanzenarten vorkommen, sind zwar chemisch verschieden, haben jedoch qualitativ die gleiche biologische Aktivität; quantitativ lassen sich große Unterschiede nachweisen, die auch die Spezifität betreffen. – Nach Infektion mit Bakteriophagen entsteht in *E. coli* ein Lysozym, dessen Bildung von der Phagen-DNS kontrolliert wird. Da mutierte Phagen abgeänderte Lysozyme erzeugen, eröffnet sich ein weites Feld für die molekularbiologische Forschung.*

### 1. Einleitung

Eines der am eingehendsten untersuchten Enzyme ist das Lysozym des Hühnereiweißes (EC 3.2.1.17). Man kennt die Primärstruktur dieses Enzyms, die Lage der Disulfidbindungen, die Raumstruktur (erstmalige Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Enzyms), sein aktives Zentrum sowie Spezifität und Art seiner Wirkungsweise.

Lysozyme sind weit verbreitete Enzyme, die nicht nur im Hühner- und Vogeleiweiß vorkommen, sondern auch in vielen menschlichen Geweben und Ausscheidungen sowie in einigen anderen Vertebraten und Invertebraten gefunden werden. Auch in Bakterien, Phagen und Pflanzen wurden Lysozyme festgestellt. Diese Enzyme eignen sich daher für vergleichende Studien, besonders über die Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität. Es ist nicht beabsichtigt, in dieser Übersicht alle Forschungsergebnisse seit 1963<sup>[1]</sup> zusammenzufassen, es sollen vielmehr Schwerpunkte und Entwicklungen dargelegt werden, die über die Lysozyme hinaus auch für andere Gebiete der Enzymforschung von Interesse sind.

### 2. Lysozym aus Hühnereiweiß

#### 2.1. Primärstruktur und Disulfidbindungen

Die Aminosäuresequenz des Hühnereiweiß-Lysozyms wurde von Jolles et al.<sup>[2,3]</sup> und von Canfield<sup>[4]</sup> aufgeklärt. Dieses Protein enthält 129 Aminosäuren

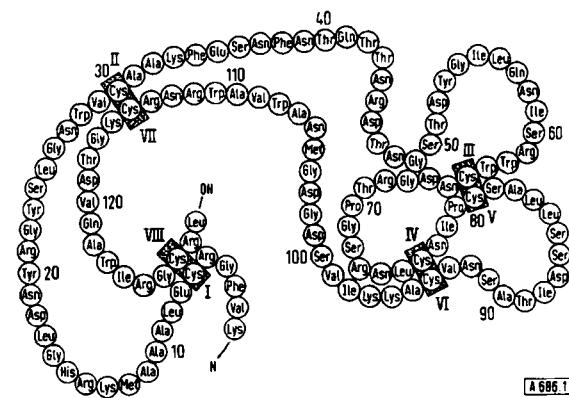


Abb. 1. Primärstruktur und Disulfidbindungen im Hühnereiweiß-Lysozym.

[\*] Prof. Dr. P. Jolles  
 Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences  
 de l'Université  
 Paris VI<sup>2</sup>, 96, Boulevard Raspail (Frankreich)  
 [1] P. Jolles, *Angew. Chem.* 76, 20 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* 3, 28 (1964).

[2] J. Jolles u. P. Jolles, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* 253, 2773 (1961).

[3] J. Jolles, J. Jauregu-Adell, I. Bernier u. P. Jolles, *Biochim. biophysica Acta* 78, 668 (1963).

[4] R. E. Canfield, *J. biol. Chemistry* 238, 2698 (1963).

in einer einzigen Polypeptidkette, die an vier Stellen durch Disulfidbindungen ( $-S-S-$ )<sup>[5-7]</sup> vernetzt ist (Abb. 1).

## 2.2. Dreidimensionale Struktur

Die Konformation des Lysozyms wurde röntgenstrukturanalytisch ermittelt<sup>[8]</sup>. Dazu mußten Proteinkristalle hergestellt und untersucht werden, in die schwere Atome, z. B. Uran, eingebaut wurden, die keinen Einfluß auf die Kristallstruktur haben. Die ersten Erfolge mit dieser Methode hatten Kendrew am Myoglobin aus Wal-Sperma und Perutz am Pferde-Hämoglobin. Durch Korrelieren der ElektronendichteVerteilung bei einer Auflösung von 2 Å mit der Primärstruktur des Hühnereiweiß-Lysozyms gelang es, die räumliche Anordnung der 129 Aminosäuren zu ermitteln und die Lage von etwa 95% der Atome auf etwa 0,3 Å genau festzustellen.

Man kann sich das Molekül aus zwei Teilen zusammengesetzt denken. Die ersten 40 Aminosäuren bilden den rechten Flügel, in welchem die Peptidkette einen Kern unpolarer Aminosäuren in einer stabil erscheinenden Konformation zweimal umwindet ( $\alpha$ -Helixstruktur). Die Aminosäuren 41–95 bilden den linken, konformativ weniger stabil erscheinenden Flügel mit zahlreichen polaren Aminosäuren. Der Rest der Kette füllt zum Teil die Lücke zwischen den beiden Flügeln und umhüllt den äußeren Teil des rechten Flügels, wobei jedoch ein Einschnitt zwischen den beiden Teilen des Moleküls erhalten bleibt<sup>[9]</sup>.

Während Myoglobin lange  $\alpha$ -Helix-Abschnitte enthält, die über meist kurze Knicke ohne Helixstruktur verbunden sind, beträgt der  $\alpha$ -Helixanteil im Lysozym nur etwa 40%. Überdies sind offensichtlich alle Helixstrukturen verzerrt, wobei sich jedoch im allgemeinen die Anzahl der Aminosäuren pro Helixwindung nicht ändert<sup>[10]</sup>. In drei Bereichen mit Helixstruktur mit je etwa zehn Aminosäuren (5–15, 24–34, 88–96) entsprechen die axiale Translation pro Baustein und die Anzahl der Aminosäurereste pro Windung nahezu

den von Pauling und Corey für die  $\alpha$ -Helix angegebenen Werten von 1,5 bzw. 3,6 Å (Tabelle 1). Ein weiterer kurzer Helixabschnitt (80–85) scheint der Wasserstoffbrückenanordnung vom Typ 3,0<sub>10</sub> sehr ähnlich zu sein. Auch die Aminosäuren 119–122 bilden eine isolierte Windung der 3,0<sub>10</sub>-Helix (Abb. 2).

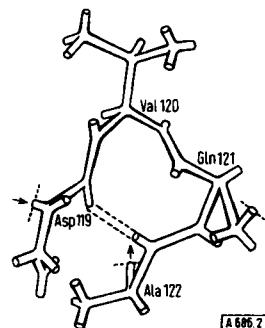


Abb. 2. Windung der 3,0<sub>10</sub>-Helix und Konformation von Val 120 [10]. Die Wasserstoffbrücken sind gestrichelt.

Eine weitere interessante Region ohne Helixstruktur<sup>[10]</sup> liegt zwischen den Aminosäuren 42 und 54 vor. Hier verläuft die Kette wie ein Doppelstrang parallel zu sich selbst, ähnlich dem antiparallel gefalteten Blatt von Pauling und Corey<sup>[11]</sup>, welches man als Grundstruktur des Seidenfibrins annimmt<sup>[12]</sup> (Abb. 3).

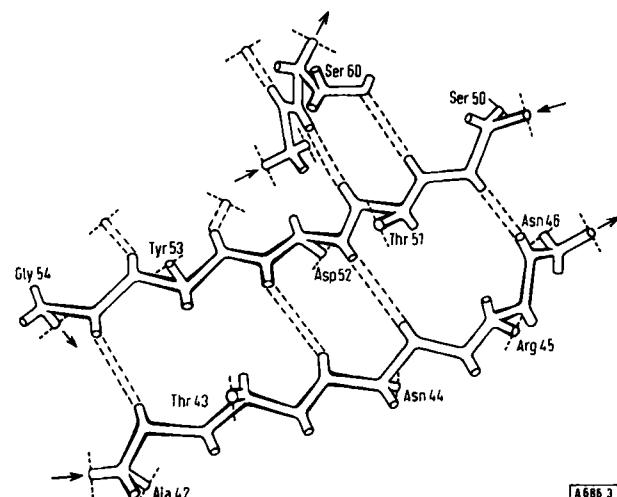


Abb. 3. Region zwischen Ala 42 und Gly 54, in der nach Art eines antiparallel gefalteten Blattes die Polypeptidkette parallel zu sich selbst zurückläuft [10]. Die Wasserstoffbrücken sind gestrichelt.

Alle sauren (Asp und Glu) sowie basischen (Lys, Arg und His) Seitenketten und Endgruppen sind über die Oberfläche des Moleküls verteilt, ebenso die übrigen polaren Seitenketten, außer Glu 57 und Ser 91. Die meisten unpolaren und hydrophoben Seitenketten sind dagegen in das Innere des Moleküls gerichtet<sup>[10]</sup>, ohne jedoch gleichmäßig über die Kette verteilt zu sein. Zwischen den Aminosäuren 38 und 55 kommen keine derartigen Seitenketten vor. Der tiefe Spalt scheint das Molekül in zwei Teile mit verschiedenem Charak-

Tabelle 1. Parameter der Regionen des Hühnereiweiß-Lysozyms mit Helixstruktur [10].

Amino-säuren	Anstieg pro Baustein (Å)	Rotation pro Baustein (°)	Bausteine pro Windung
5–15	1,51	100,2	3,59
24–34	1,485	98,3	3,66
80–85	1,66	106,6	3,38
88–96	1,455	96,7	3,72

[5] P. Jollès, J. Jaurégui-Adell u. J. Jollès, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 3926 (1964).

[6] J. R. Brown, Biochem. J. 92, 13 P (1964).

[7] R. E. Canfield u. A. K. Liu, J. biol. Chemistry 240, 1997 (1965).

[8] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips u. V. R. Sarma, Nature (London) 206, 757 (1965).

[9] L. N. Johnson, Exposés annu. Biochim. méd. 27, 31 (1966).

[10] C. C. F. Blake, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips u. V. R. Sarma, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 365 (1967).

[11] L. Pauling u. R. B. Corey, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 729 (1951).

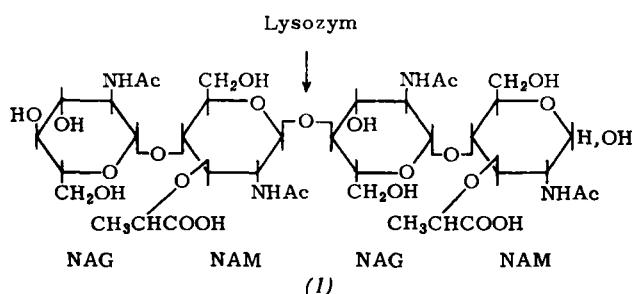
[12] R. E. Marsh, R. B. Corey u. L. Pauling, Acta crystallogr. 8, 62 (1955).

ter zu teilen (rechter Flügel und linker Flügel, siehe oben). Ähnlich wie Myoglobin läßt sich Lysozym als Öltropfen mit polarem Überzug beschreiben<sup>[13]</sup>.

### 2.3. Enzymatische Aktivität des Lysozys

Gleichzeitig mit dem Lysozym entdeckte Fleming<sup>[14]</sup> ein gram-positives Bakterium, *Micrococcus lysodeikticus*, welches gegen dieses Enzym empfindlich ist. Viele Jahre später zeigte Salton<sup>[15]</sup>, daß das Enzymsubstrat im Bakterium ausschließlich in der Zellwand enthalten ist. Einen Hinweis auf die Wirkungsweise des Enzyms erhielten Berger und Weiser<sup>[16]</sup>, als sie fanden, daß Lysozym auch Chitin abbaut, ein lineares polymeres *N*-Acetylglucosamin (NAG); Lysozym wirkt also als  $\beta$ -(1→4)-Glucosaminidase.

Salton und Ghysen<sup>[17]</sup> isolierten später ein Tetrasaccharid aus den Abbauprodukten lysozymbehandelter Zellwände von *M. lysodeikticus*. Dieses Tetrasaccharid besteht aus gleichen Mengen NAG und *N*-Acetylmuraminsäure (NAM) und wird durch Lysozym in ein Disaccharid gespalten, welches NAG und NAM enthält. Demnach sollte das Tetrasaccharid ein Dimeres dieses Disaccharids sein, wobei die beiden Einheiten über eine lysozymempfindliche  $\beta$ -(1→4)-Bindung miteinander verknüpft sind. Das Tetrasaccharid wurde erst 1963 von Jeanloz et al.<sup>[18]</sup> als *N*-Acetylglucosaminyl- $\beta$ -(1→4)-*N*-acetylmuraminyll- $\beta$ -(1→4)-*N*-acetylglucosaminyl- $\beta$ -(1→4)-*N*-acetylmuraminsäure (1) erkannt.



Die vorgeschlagene Struktur des Mucopolysaccharids der Zellwand mit alternierenden NAG- und NAM-Einheiten, die über  $\beta$ -(1→4)-Bindungen verknüpft sind, gleicht der Struktur des Chitins bis auf die eingeschobenen NAM-Moleküle. Lysozym wird daher auf Chitin und auf die Bakterienzellwände wahrscheinlich sehr ähnlich einwirken. So befaßt sich auch ein großer Teil der neueren Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms mit seinen Eigenschaften als Chitinase, insbesondere bei der Einwirkung auf NAG-Oligomere. NAG (2) und andere einfache Aminozucker (3) bis (7) sowie auch trimeres NAG (8) wirken als kompetitive Inhibitoren, indem sie sich wie Teile des makromolekularen Substrates an das Enzym anlagern.

[13] D. C. Phillips, *Sci. American* 215, 78 (1966).

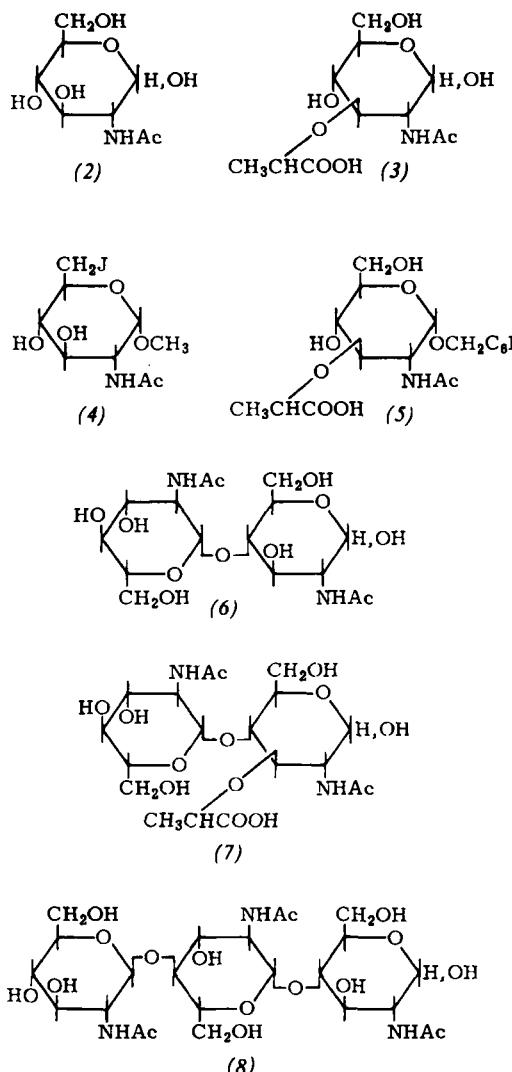
[14] A. Fleming, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B 93, 306 (1922).

[15] M. R. J. Salton, *Nature (London)* 170, 746 (1952).

[16] L. R. Berger u. R. S. Weiser, *Biochim. biophysica Acta* 26, 517 (1957).

[17] M. R. J. Salton u. J. M. Ghysen, *Biochim. biophysica Acta* 36, 552 (1959); 45, 355 (1960).

[18] R. W. Jeanloz, N. Sharon u. H. M. Flowers, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 13, 20 (1963).



Röntgenstrukturanalysen bei geringer Auflösung zeigten, daß niedermolekulare Inhibitoren, die mit dem Substrat aus der Bakterienzellwand oder mit Poly-NAG verwandt sind, an verschiedenen Stellen im Spalt zwischen dem rechten und linken Flügel des Lysozymmoleküls gebunden werden<sup>[19, 19, 20]</sup>.

Trimeres NAG (8) füllt den oberen Teil des Spaltes und tritt mit dem Enzym an mehreren Stellen in Wechselwirkung. So bilden sich sechs starke Wasserstoffbrücken, davon zwei zwischen einem NAG-Baustein und den Seitenketten der beiden Tryptophane 62 und 63. Zu den wichtigeren unpolaren Wechselwirkungen gehört die zwischen einem NAM-Molekül und dem Ringsystem von Trp 62. Diese Wechselwirkung wird durch kleine Änderungen der Konformation des Enzymmoleküls, wie sie bei Reaktion mit dem Trisaccharid (8) auftreten<sup>[13]</sup>, beeinflußt.

Der Komplex, der sich aus Tri-NAG und dem Enzym bildet, ist stabil und unterscheidet sich damit von dem katalytisch wirksamen Enzym-Substrat-Komplex.

Man weiß auch, daß Tri-NAG bei niedrigen Konzentrationen eher als Inhibitor denn als Substrat, das ab-

[19] L. N. Johnson u. D. C. Phillips, *Nature (London)* 206, 761 (1965).

[20] C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips u. V. R. Sarma, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B 167, 378 (1967).

gebaut wird, angesehen werden kann. Da Tri-NAG nur den halben Spalt füllt, muß beim reaktiven Enzym-Substrat-Komplex der Spalt wohl vollständig mit Zuckerresten gefüllt sein. Tatsächlich kann man drei weitere Zuckerreste so an Tri-NAG anfügen, daß hinreichende Wechselwirkungen zwischen den Atomen des Substrates und des Enzyms möglich werden<sup>[13]</sup>. Hierbei wird jedoch die stabile Sesselform des vierten Zuckerrestes derart verzerrt, daß die C-Atome 1,2 und 5 und das Sauerstoffatom an C-5 in einer Ebene liegen<sup>[13]</sup>. Diese Verzerrung unterstützt den Bruch des Substrates nach dem vierten Zuckerrest. Nach diesen und weiteren Beobachtungen löst das Enzym die Zuckerkette zwischen dem vierten und fünften Zuckerbaustein (zwischen C-1 und dem Sauerstoff der glykosidischen Bindung). Die reaktivsten Gruppen in der Nachbarschaft dieser Bindung sind die Seitenketten von Asp 52 und Glu 35.

Nach Beobachtungen von *Phillips*<sup>[13]</sup>, *Blake* et al.<sup>[20]</sup> und *Vernon*<sup>[21]</sup> verläuft die Spaltung der Bakterienzellwand vermutlich folgendermaßen: 1. Das Substrat wird an das Enzym gebunden und durch Wasserstoffbrücken und andere Kräfte in einer günstigen Lage

fixiert. Hierbei wird der Ring des vierten Zuckerrestes verzerrt und in eine zur Bildung eines Carboniumions günstige Konformation gebracht. 2. Die Seitenkette von Glu 35 überträgt ein Proton auf das glykosidische Sauerstoffatom. 3. Die Heterolyse der Bindung zwischen C-1 und diesem Sauerstoffatom führt zu einem Carboniumion, das durch Wechselwirkung mit der negativen Ladung der Seitenkette von 52 stabilisiert wird. 4. Das so aus dem Hexasaccharid entstandene Disaccharid diffundiert vom Enzym ab, ein Wassermolekül greift das Carboniumion an, und die Hydrolyse ist beendet (Abb. 4). Hiernach sind also drei Faktoren für die katalytische Wirkung wichtig: Allgemeine Säurekatalyse, Aktivierung des Substrats durch konformativ Verzerrung und elektrostatische Wechselwirkung.

An dieser Stelle soll eine Bemerkung von *Perutz* angefügt werden<sup>[22]</sup>: „Erstmalig können wir die katalytische Aktivität eines Enzyms mit stereochemischen Begriffen erklären. Es mag voreilig sein, die an bisher nur einem Enzym gefundenen Ergebnisse zu verallgemeinern, jedoch könnten wir unsere Basis erweitern, indem wir Myoglobin und Hämoglobin nach einem Vorschlag von *Monod* zu Ehrenenzymen erheben und ihre Häm-Reste als die aktiven Zentren betrachten. Gemeinsam ist diesen drei Molekülen die Verteilung polarer und unpolarer Seitenketten. Lysozym und die Globine enthalten im Inneren weitgehend Kohlenwasserstoffe und damit ein Medium niedriger Dielektrizitätskonstante. In allen drei Fällen liegt das aktive Zentrum in einer Art Tasche dieses unpolaren Mediums. Diese Tasche enthält einige polare Gruppen, die für die enzymatische Aktivität wesentlich sind.“

#### 2.4. Biosynthese des Lysozyms

*Canfield* und *Anfinsen*<sup>[23]</sup> inkubierten zerkleinerte Henneneileiter mit <sup>3</sup>H-Leucin und konnten anschließend radioaktives Lysozym isolieren. Die Verteilung der Radioaktivität in den Leucinresten entlang der Polypeptidkette des reduzierten und carboxymethylierten Proteins ließ sich durch Abbau mit Trypsin ermitteln. Die isolierten Peptide wurden hydrolysiert und die spezifische Radioaktivität der Leucinreste bestimmt. Nach fünf Minuten Inkubation des Eileiterbreis waren die markierten Leucinreste anders als nach drei Minuten Inkubation verteilt. Offenbar beginnt der Austausch bei den Leucinresten in der Nähe des NH<sub>2</sub>-Endes.

Diese Beobachtungen<sup>[23]</sup> sind im Einklang mit Vorstellungen, nach denen sich eine Polypeptidkette in der Natur sukzessive vom NH<sub>2</sub>-Anfang zum COOH-Ende aufbaut. Man kann wahrscheinlich annehmen<sup>[13]</sup>, daß sich die Proteinkette schon während der Synthese, ebenfalls vom NH<sub>2</sub>-Ende her, zu ihrer nativen Konformation zu falten beginnt. Teile der Polypeptidkette, insbesondere in der Gegend des NH<sub>2</sub>-Endes, ordnen sich dabei möglicherweise zu stabilen Konformationen, die im fertigen Molekül erhalten bleiben und nach Art eines Kristallisationskeims als Zentren wirken, um die sich der Rest der Kette falten<sup>[13]</sup>. Das dreidimensionale Modell spricht für eine

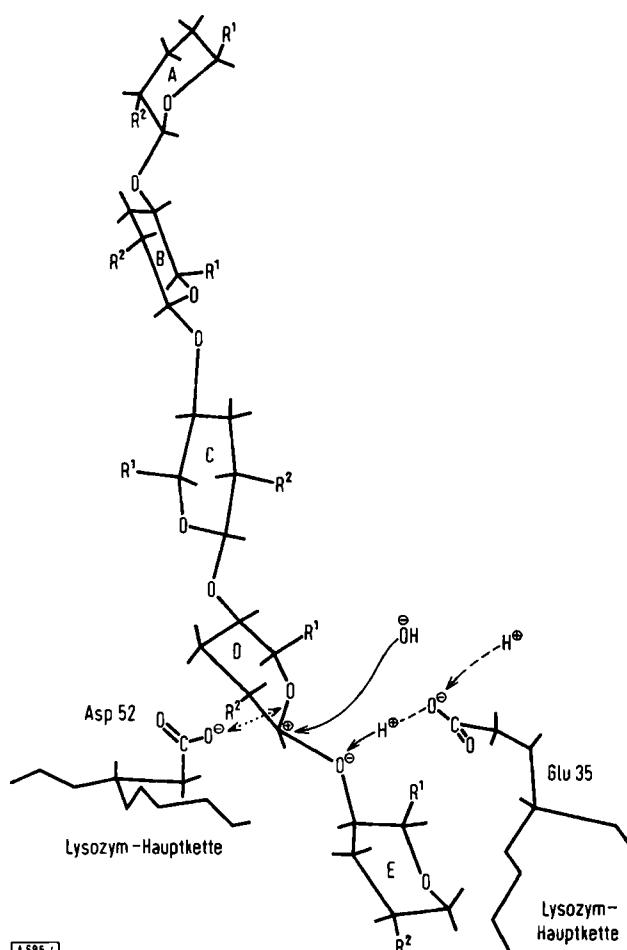


Abb. 4. Die Spaltung eines Substrates erfordert wahrscheinlich die räumliche Nachbarschaft und Aktivität der Seitenketten von Glu 35 und Asp 52 im Lysozym. Vermutlich wird durch Übertragung eines Protons von der Seitenkette der Aminosäure 35 auf den glykosidischen Sauerstoff, über den die Ringe D und E verbunden sind, die Abtrennung des Ringes E bewirkt [13].

[21] C. A. Vernon, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 389 (1967).

[22] M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 448 (1967).

[23] R. E. Canfield u. C. B. Anfinsen, Biochemistry 2, 1073 (1963).

solche Annahme, insbesondere weil die ersten Aminosäuren am NH<sub>2</sub>-Ende in kompakter Anordnung vorliegen.

## 2.5. Beziehung zwischen Struktur und Aktivität

### 2.5.1. Sequenzen am NH<sub>2</sub>- und COOH-Ende

Am NH<sub>2</sub>- und COOH-Ende des Lysozyms lassen sich jeweils die beiden letzten Aminosäuren mit Aminopeptidase bzw. Carboxypeptidase abspalten. Die so gekürzten Enzyme Des-lysylvalin-lysozym<sup>[24]</sup> und Des-arginylleucin-lysozym<sup>[25]</sup> sind noch biologisch wirksam. Bei niedriger Ionenkonzentration ist Des-arginylleucin-lysozym sogar etwas aktiver als das ursprüngliche Molekül, bei hoher Ionenkonzentration dagegen weniger aktiv.

### 2.5.2. Bedeutung der Tryptophanreste

Hühnereiweiß-Lysozym enthält im Molekül sechs Tryptophanreste. Neuere Untersuchungen mit Röntgenstrahlen bei 2 Å Auflösung bewiesen die Bedeutung einiger dieser Reste für die biologische Aktivität<sup>[18, 19]</sup>. Zur weiteren Untersuchung dienten chemische und andere physikalische Methoden<sup>[19, 26, 27]</sup>

Tabelle 2. Beziehung zwischen chemischer Modifikation der Tryptophanreste und biologischer Aktivität des Hühnereiweiß-Lysozyms.

Reagens	Zahl der modifizierten Tryptophanreste zur vollständigen Inaktivierung	ohne Aktivitätsverlust	Umwandlungsprodukte	Aminosäure (Nr.)	Lit.
N-Bromsuccinimid	2				[28]
N-Bromsuccinimid	4				[29]
Jod	1,1		Oxindol wahrscheinlich Oxindol	[a]	[30]
Wasserstoffperoxid	1,4				
2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-bromid		2	[a]	[a]	[31]
N-Bromsuccinimid			[a]	[a]	[32]
1 mol Jod	1			62	[33]
5 mol Jod	2			108, 62	[34]
Jod	1			108	[35]
Ozone		2	N'-Formyl-kynurein	108	[36]
				111	

[a] Nicht geprüft.

- [24] J. Jollès u. P. Jollès, Biochem. biophysic. Res. Commun. 22, 22 (1966).
- [25] W. T. Morgan u. J. P. Riehm, Biochem. biophysic. Res. Commun. 30, 50 (1968).
- [26] K. Hayashi, T. Imoto u. M. Funatsu, J. Biochemistry [Tokyo] 55, 516 (1964).
- [27] S. S. Lehrer u. G. D. Fasman, Biochem. biophysic. Res. Commun. 23, 133 (1966).
- [28] I. Bernier u. P. Jollès, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 253, 745 (1961).
- [29] G. J. S. Rao u. L. K. Ramachandran, Biochim. biophysica Acta 59, 507 (1962).
- [30] F. J. Hartdegen u. J. A. Rupley, Biochim. biophysica Acta 92, 625 (1964).
- [31] Y. Hachimori, H. Horinishi, K. Kurihara u. K. Shibata, Biochim. biophysica Acta 93, 346 (1964).
- [32] T. Bewley u. C. H. Li, Nature (London) 206, 624 (1965).
- [33] K. Hayashi, T. Imoto, G. Funatsu u. M. Funatsu, J. Biochemistry (Tokyo) 58, 227 (1965).

(s. Tabelle 2). Nach neueren Untersuchungen von Kronman et al.<sup>[37]</sup> reagiert N-Bromsuccinimid mit allen Tryptophangruppen im Lysozym gleich. Man muß also bei der Anwendung dieses Reagens zur Bestimmung des „Grades der Exponiertheit“ einer Seitenkette am nativen Protein vorsichtig sein.

### 2.5.3. Rolle des Histidinrestes

Zahlreiche Untersuchungen an Lysozymen mit nur einem Histidinrest im Molekül ergaben, daß diese Aminosäure für die Aktivität unwichtig ist. Lysozyme mit voller Aktivität, die kein Histidin enthalten, wurden aus Enteneiweiß isoliert<sup>[38]</sup>.

### 2.5.4. Rolle der Cystinreste

Das Lysozym des Hühnereiweißes enthält vier Disulfidbrücken. Nachdem man jedoch Lysozym mit nur drei<sup>[39]</sup> oder zwei<sup>[40]</sup> Cystinresten oder sogar ohne einen solchen<sup>[41]</sup> fand, schienen diese Disulfidbrücken für die biologische Aktivität des Moleküls unerheblich zu sein. Jollès et al.<sup>[42]</sup> zeigten jedoch, daß die Disulfidbrücken für die Wärmebeständigkeit der Enzyme von Bedeutung sind. Lysozyme mit vier Cystinbrücken vertragen 0,5- oder 1-minütiges Erhitzen auf 100 °C in saurer oder neutraler Lösung. Menschliche Lysozyme mit drei Cystinresten sind etwas wärmeempfindlicher: Sie zersetzen sich nach einer Minute. Wenn wie im Gänselysozym nur zwei Cystinreste vorhanden sind, so ist die Thermostabilität nahezu verloren gegangen.

Das Lysozym mit dem geringsten Cystingehalt zeigte im übrigen die höchste spezifische Aktivität<sup>[42]</sup>. Setzt man diese gleich 1 für das Lysozym des Hühnereiweißes, so findet man eine ähnliche Aktivität für die Entenenzyme,  $3 \pm 0,5$  für menschliche Lysozyme und  $5 \pm 0,5$  für Gänseenzyme. Die Wechselwirkung zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum des Gänseenzymes verläuft offensichtlich leichter, da dieses Enzym in geringerem Maße gefaltet ist.

### 2.5.5. Reaktivierung von reduziertem Lysozym

Mit  $\beta$ -Mercaptoäthanol in 8 M Harnstofflösung vollständig reduziertes Lysozym läßt sich enzymatisch und nichtenzymatisch wieder aktivieren. Die enzyma-

- [34] C. C. F. Blake, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 435 (1967).
- [35] J. A. Rupley, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 416 (1967).
- [36] A. Previero, M.-A. Coletti-Previero u. P. Jollès, J. molecular Biol. 24, 261 (1967).
- [37] M. J. Kronman, F. M. Robbins u. R. E. Andreotti, Biochim. biophysica Acta 143, 462 (1967).
- [38] J. Jollès, G. Spotorno u. P. Jollès, Nature (London) 208, 1204 (1965).
- [39] P. Jollès, D. Charlemagne, J.-F. Petit, A.-C. Maire u. J. Jollès, Bull. Soc. chim. biol. 47, 2241 (1965).
- [40] A.-C. Dianoux u. P. Jollès, Biochim. biophysica Acta 133, 472 (1967).
- [41] A. Tsugita u. M. Inouye, J. molecular Biol. 37, 201 (1968).
- [42] J. Jollès, A.-C. Dianoux, J. Hermann, B. Niemann u. P. Jollès, Biochim. biophysica Acta 128, 568 (1966).

tische Reaktivierung<sup>[43,44]</sup> gelingt ohne Anlaufzeit über Disulfidaustausch<sup>[45]</sup>. Auf nichtenzymatischem Weg lässt sich das reduzierte Lysozym in gepufferten Lösungen oxidieren, die wenig  $\beta$ -Mercaptoäthanol enthalten. Das reoxidierte hat die gleiche Struktur wie das ursprüngliche Enzym<sup>[46,47]</sup>. Auch aus dem gemischten Disulfid aus Hühnerlysozym und Cystin<sup>[48]</sup> lässt sich das aktive Lysozym wiedergewinnen.

### 2.5.6. Vernetzung des Lysozys

Durch Behandlung mit Phenol-2,4-disulfonylchlorid wird das Lysozym vernetzt. Das so abgeänderte Protein ist noch enzymatisch aktiv, hat ein nahezu unverändertes Molekulargewicht und nach Aussage der optischen Rotationsdispersion<sup>[49]</sup> im wesentlichen die gleiche Konformation wie das ursprüngliche Lysozym.

### 2.5.7. Bestrahlung des Lysozys

Man hat Lysozym mit Röntgendiffraktionsdosen zwischen 1 und 100 mrad sowie mit  $\gamma$ -Strahlen von  $^{60}\text{Co}$ <sup>[51]</sup> bestrahlt. Dosen von wenigen mrad beeinflussen die Aktivität und die Aminosäurezusammensetzung von Lysozym nicht messbar; stärkere Dosen überführen jedoch das ursprüngliche Protein in eine große Anzahl abgewandelter Proteine, von denen einige Lysozymaktivität zeigten. Erst Röntgendiffraktionsdosen von etwa 100 mrad erzeugten Aminosäureänderungen, die man mit einem Gerät zur automatischen Aminosäureanalyse („Autoanalyzer“) feststellen kann. Die Änderungen betreffen vor allem die schwefelhaltigen, die aromatischen und die langkettigen aliphatischen Aminosäuren<sup>[50]</sup>.

### 2.5.8. Folgerungen

Bekanntlich sind die Aminosäuren 35 (Glu) und 52 (Asp) sowie einige Trp-Reste für die biologische Aktivität des Lysozyms unerlässlich. Dies regte zu einigen Syntheseversuchen an. So wurden Polypeptide mit Carboxylfunktionen in hydrophoben und in hydrophilen Regionen (Phe/Glu = 1:0,3; mittleres Molekulargewicht 63650) synthetisiert<sup>[52]</sup>, die die Fähigkeit zum Abbau der Zellwände von *M. lysodeikticus* haben sollen. Synthesen kurzer Sequenzen von Hühnerlysozym beschrieben Morley<sup>[53]</sup> und Jollès<sup>[54]</sup>.

- [43] R. F. Goldberger, C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 239, 628, 1406 (1964).
- [44] P. Venetianer u. F. B. Straub, Biochim. biophysica Acta 67, 166 (1963).
- [45] D. Givol, R. F. Goldberger u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 239, PC 3115 (1964).
- [46] C. J. Epstein u. R. F. Goldberger, J. biol. Chemistry 238, 1380 (1963).
- [47] R. F. Goldberger u. C. J. Epstein, J. biol. Chemistry 238, 2988 (1963).
- [48] L. Kanarek, R. A. Bradshaw u. R. L. Hill, J. biol. Chemistry 240, PC 2756 (1965).
- [49] G. L. Moore u. R. A. Day, Science (Washington) 159, 210 (1968).
- [50] K. Dose, S. Risi u. H. Rauchfuss, Biophysik 3, 202 (1966).
- [51] A. M. Desai u. K. S. Korgaonkar, Radiat. Res. 21, 61 (1964).
- [52] V. K. Naithani u. M. M. Dhar, Biochim. biophysica Res. Commun. 29, 368 (1967).
- [53] J. S. Morley, unveröffentlicht.
- [54] P. Jollès u. J. Jollès, Helv. chim. Acta 51, 980 (1968).

## 2.6. Untersuchung von Lysozym mit physikalisch-chemischen Methoden

Lysozym zeigt bei Wechselwirkung mit einem Substrat oder Inhibitor eine Rotverschiebung seines UV-Spektrums. Nach Betrachtungen am Modell soll Tryptophan für diese Verschiebung verantwortlich sein<sup>[55,56]</sup>.

In Gegenwart von *N*-Acetylglucosamin erhöht sich der Circulardichroismus des Lysozyms im aromatischen Gebiet, was ebenfalls der Beteiligung von Tryptophan zugeschrieben wird<sup>[57]</sup>.

Bei Anlagerung von Inhibitoren kann sich die Tryptophanfluoreszenz erheblich ändern<sup>[58,59]</sup>. Große Änderungen der Tryptophanfluoreszenz des Lysozyms und des Komplexes von Lysozym mit Tri-*N*-acetyl-*D*-glucosamin treten bei Verschiebung des pH-Wertes auf. Sie wurden Änderungen der Ionisierung einiger Gruppen im Enzym zugeordnet<sup>[58,60,61]</sup>. Im betrachteten pH-Bereich sollte sich die Konformation des Enzyms nicht wesentlich ändern. Ferner wurde eine selektive Lösung der Tryptophanfluoreszenz des Lysozyms durch Jodidionen beobachtet<sup>[62]</sup>. Fluoreszenzänderungen von UV-bestrahltem Lysozym untersuchte Churchich<sup>[63]</sup>.

Die optische Rotationsdispersion wäßriger Lysozymlösungen hat man zwischen 195 und 600 nm gemessen<sup>[64]</sup> und Fragen der Konformation unter verschiedenen Bedingungen untersucht<sup>[64-67]</sup>.

Neuere Anwendungen der magnetischen Kernresonanz in der Proteinchemie führten zu detaillierteren Informationen über das Verhalten von Enzymen in Lösung<sup>[68]</sup>. Es wurden einige Zuordnungen im tiefeldigen (aromatischen) Bereich des Lysozymspektrums getroffen, mehrere Konformationen von denaturiertem Lysozym verglichen und spektrale Änderungen bei Anlagerung von Inhibitoren beschrieben<sup>[68]</sup>.

Die Aufklärung der Tertiärstruktur von Lysozym regte zu Versuchen an, stereochemische Beziehungen zwischen Primär- und Tertiärstruktur zu finden<sup>[69]</sup>. Solche Bemühungen könnten durch eine statistische Analyse der Aminosäuresequenzen ergänzt werden<sup>[70]</sup>. Zur Zeit wird eine Methode zur Festlegung von Segmenten mit  $\alpha$ -Helixstruktur in Polypeptidketten bekannter Primärstruktur ausgearbeitet<sup>[71]</sup>.

- [55] K. T. Hayashi, G. Imoto u. M. Funatsu, J. Biochemistry (Tokyo) 54, 381 (1963); 55, 516 (1964).
- [56] F. W. Dahlquist, L. Jao u. M. Raftery, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 26 (1966).
- [57] A. N. Glazer u. N. S. Simmons, J. Amer. chem. Soc. 88, 2335 (1966).
- [58] S. S. Lehrer u. G. D. Fasman, Biochim. biophysica Res. Commun. 23, 133 (1966).
- [59] M. Shinitzky, V. Grisaro, D. M. Chipman u. N. Sharon, Arch. Biochim. Biophys. 115, 232 (1966).
- [60] R. F. Steiner u. H. Edelhoch, Nature (London) 192, 873 (1961).
- [61] S. S. Lehrer u. G. D. Fasman, J. biol. Chemistry 242, 4644 (1967).
- [62] S. S. Lehrer, Biochim. biophysic. Res. Commun. 29, 767 (1967).
- [63] J. E. Churchich, Biochim. biophysica Acta 120, 406 (1966); 126, 606 (1966).
- [64] Y. Tomimatsu u. W. Gaffield, Biopolymers 3, 509 (1965).
- [65] C. Tanford u. N. S. Otchin, J. molecular Biol. 15, 489 (1966).
- [66] K. Ogasahara u. K. Hamaguchi, J. Biochemistry (Tokyo) XII, 61, 199 (1967).
- [67] K. Ikeda, K. Hamaguchi, M. Imanichi u. T. Amano, J. Biochemistry (Tokyo) 62, 315 (1967).
- [68] J. S. Cohen u. O. Jaretzky in C. Nicolau: Experimental Methods in Molecular Biology. Wiley, New York, im Druck; Proc. nat. Acad. Sci. USA (1968), im Druck.
- [69] A. M. Liquori, J. Polymer Sci. 12, 207 (1966).
- [70] J. W. Prothero, Biophysic. J. 6, 367 (1966).
- [71] P. F. Periti, G. Quagliarotti u. A. M. Liquori, J. molecular Biol. 24, 313 (1967).

*Sophianopoulos*<sup>[72]</sup> und *Antonini*<sup>[73]</sup> fanden, daß Lysozym bei zunehmendem pH-Wert bei 20°C reversibel polymerisiert, wobei bei pH = 5–9 das Dimere überwiegt.

Schließlich seien Untersuchungen von *Hamaguchi*<sup>[66]</sup> erwähnt, der die Auswirkungen vieler Reagentien, des pH-Wertes und der Temperatur auf die Stabilität und die Konformation von Lysozym untersuchte.

## 2.7. Wirkungsweise des Lysozyms

Lysozym wurde ausgiebig zum Abbau von Bakterienzellwänden benutzt<sup>[17, 18]</sup> (vgl. Abschnitt 2.3.). *Salton*<sup>[74]</sup> (Tabelle 3) und *Hara*<sup>[75]</sup> beschrieben den Einfluß chemischer Modifikationen der Zellwände auf

Tabelle 3. Einfluß chemischer Modifikationen der Zellwände auf ihre Lysozymempfindlichkeit [74].

Modifikation	Wirkung
O-Acetylierung (OH)	völlige Hemmung
Veresterung (COOH)	teilweise
Diäthylammoniumsalzbildung (COOH)	Hemmung
Entacetylierung am Stickstoff	teilweise
N-Succinylierung (NH <sub>2</sub> )	Hemmung
Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (NH <sub>2</sub> )	völlige Hemmung
Umsetzung mit 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid (DANS) (NH <sub>2</sub> )	gesteigerte Empfindlichkeit
Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (NH <sub>2</sub> )	keine Wirkung
Umsetzung mit 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid (DANS) (NH <sub>2</sub> )	keine Wirkung

ihre Lysozymempfindlichkeit. *Sharon*<sup>[76, 77]</sup> gelang die Isolierung eines Disaccharids (NAG–NAM), zweier Disaccharid-Peptide und der entsprechenden Tetrasaccharide aus den Abbauprodukten lysozymbehandelter Zellwände von *Micrococcus lysodeikticus*. Diese Verbindungen wurden zu Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von Lysozym verwendet. Die Synthese von Muraminsäurederivaten ermöglichte weitere Untersuchungen der Enzymspezifität<sup>[78]</sup>. Nachdem bekannt war, daß Lysozym auf kolloidales Chitin einwirkt<sup>[16]</sup>, wurden mehrere Arbeiten über die Reinigung löslicher *N*-Acetylglucosamin-Oligosaccharide verschiedener Kettenlänge<sup>[79, 80]</sup> und die Wirkung von Lysozym auf diese Verbindungen veröffentlicht<sup>[81]</sup> („Chitinaseaktivität“, EC 3.2.1.14, von Lysozym).

Zu den genauer untersuchten niedermolekularen Substanzen gehört das Tetrasaccharid NAG–NAM–NAG–NAM. Den Abbau dieses Lysozymsubstrates zum Disaccharid konnte *Sharon*<sup>[76]</sup> papierchromatographisch, kolorimetrisch und polarimetrisch verfolgen. Neben dem Disaccharid wurden zahlreiche Oligosaccharide charakterisiert.

[72] A. J. *Sophianopoulos* u. K. E. *Van Holde*, J. biol. Chemistry 239, 2516 (1964).

[73] M. *Bruzzi*, E. *Chiancone* u. E. *Antonini*, Biochemistry (Washington) 4, 1796 (1965).

[74] M. R. J. *Salton*, Exposés annu. Biochim. méd. 27, 34 (1966).

[75] S. *Hara* u. Y. *Matsushima*, J. Biochemistry (Tokyo) 62, 118 (1967).

[76] N. *Sharon*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 402 (1967).

[77] D. *Mirelman* u. N. *Sharon*, Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 237 (1966); J. biol. Chemistry 242, 3414 (1967).

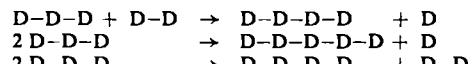
[78] R. W. *Jeanloz*, Exposés annu. Biochim. méd. 27, 45 (1966).

[79] J. A. *Rupley*, Biochim. biophysica Acta 83, 245 (1964).

[80] R. F. *Powning* u. H. *Irzykiewicz*, J. Chromatogr. (Amsterdam) 29, 115 (1967).

[81] R. F. *Powning* u. H. *Irzykiewicz*, Biochim. biophysica Acta 124, 218 (1966).

Lysozym wirkt jedoch nicht nur hydrolytisch, sondern katalysiert auch Transglykosidierungen<sup>[76, 82]</sup>. Möglicherweise wird das Tetrasaccharid bei der Hydrolyse nicht direkt gespalten, sondern es findet vorher eine Transglykosidierung statt (Schema 1). Für Chitooligosaccharide wurden derartige Reaktionen bereits



Schema 1. Ablauf der durch Lysozym bewirkten Transglykosidierungen<sup>[82]</sup>.

„D“ = Zellwanddisaccharid von *M. lysodeikticus* (NAG–NAM).

beschrieben<sup>[83–86]</sup>. Weiterhin kann Lysozym als Transferase wirken; so beobachtete *Sharon*<sup>[87]</sup> die Übertragung von NAG–NAM auf zahlreiche Mono- und Disaccharide (NAG, D-Glucose, D-Glucoside usw.) sowie die Bildung und Spaltung von  $\beta$ -(1→2)-glykosidischen Bindungen. *N*-Acetylglucosamin und nahe verwandte Oligosaccharide<sup>[88]</sup> sowie Derivate des D-Glucosamins<sup>[89]</sup> hemmen die enzymatische Aktivität von Lysozym stark. Nach Fluoreszenzuntersuchungen reagieren diese Inhibitoren mit dem Tryptophanrest am aktiven Zentrum des Enzyms (Tabelle 4).

Tabelle 4. Änderungen der Lage des Emissionsmaximums ( $\lambda_{\text{max}}$ ) und dessen Höhe (Q) von Lysozym bei Zugabe eines hemmenden Zuckers<sup>[88]</sup>.

Zucker [a]	Konzentration bei 50% Hemmung (mmol)	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm) [b]	$\Delta Q$ (%) [c]
Tetra-NAG	≈ 1	-10	+40
Di-NAG	0,6	-10	+25
Di-NAG–NAM	3	-10	-12
NAG–NAM-Pentapeptid	3	-10	+ 7
Gal-NAG	7	-10	+18
NAG	7	0	- 7
NAG–NAM	12	0	-12
NAG–NAM-Methylester	25	0	-12
Cellobiose	>100	0	0

[a] Die Monomeren in den Oligosacchariden sind  $\beta$ -(1→4)-verknüpft.

[b]  $\Delta\lambda_{\text{max}}$  = Verschiebung des Emissionsmaximums.

[c]  $\Delta Q$  = Änderung der Höhe des Emissionsmaximums, bezogen auf die Höhe des Emissionsmaximums von Lysozym (=100%).

*Lowe*<sup>[90]</sup> und *Osawa*<sup>[91]</sup> beschrieben weitere synthetische Lysozymsubstrate, die sich für kolorimetrische Untersuchungen eignen.

[82] N. *Sharon*, 3. int. Lysozym-Symposium, Mailand 1964.

[83] J. A. *Rupley*, Science (Washington) 150, 382 (1965).

[84] V. I. *Maksumov*, E. D. *Kaverzneva* u. N. A. *Kravchenko*, Biochimija 30, 1007 (1965).

[85] F. W. *Dahlquist* u. M. *Raftery*, Nature (London) 213, 625 (1967).

[86] F. W. *Dahlquist*, L. *Jao* u. M. *Raftery*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 26 (1966).

[87] J. J. *Pollock*, D. M. *Chipman* u. N. *Sharon*, Arch. Biochem. Biophysics 120, 235 (1967); Biochem. biophys. Res. Commun. (1969), im Druck.

[88] M. *Shinitzky*, V. *Grisaro*, D. M. *Chipman*, N. *Sharon*, Arch. Biochem. Biophysics 115, 232 (1966).

[89] A. *Neuberger* u. B. M. *Wilson*, Biochim. biophysica Acta 147, 473 (1967).

[90] G. *Lowe*, G. *Sheppard*, M. L. *Sinnott* u. A. *Williams*, Biochem. J. 104, 893 (1967).

[91] T. *Osawa* u. Y. *Nakazawa*, Biochim. biophysica Acta 130, 56 (1966).

## 2.8. Immunologische Studien

Nach Abbau mit Pepsin konnten vier immunologisch aktive Peptide gereinigt und strukturell aufgeklärt werden; sie scheinen je wenigstens eine antigene Determinante zu enthalten<sup>[92]</sup>. Ein nach Trypsinabbau isoliertes Peptid, welches aus den Sequenzen Trp<sub>62</sub> bis Arg<sub>68</sub>, Asn<sub>74</sub>–Leu<sub>83</sub> und Leu<sub>84</sub>–Lys<sub>96</sub> mit den beiden Disulfidbrücken Cys<sub>64</sub>–Cys<sub>80</sub> und Cys<sub>76</sub>–Cys<sub>94</sub> besteht, zeigt ebenfalls eine schwache, aber definierte immunologische Aktivität. Nach Bonavida et al.<sup>[93]</sup> verhält sich mit Bromcyan behandeltes Lysozym immunologisch weitgehend wie das native Enzym. Man vermutet<sup>[94]</sup>, daß das enzymatisch aktive Zentrum und die antigenen Determinanten des Lysozyms eng beieinander liegen. Aus Lysozymantiseren von Kaninchen wurden durch Gelfiltration und Chromatographie an DEAE-Zellulose niedrigmolekulare (3,5 S), univalente, gereinigte Antikörper erhalten<sup>[95]</sup>. Die Trennung von Antilysozym-Antikörpern mit verschiedenen Determinantspezifitäten sowie Antikörper gegen einen bestimmten Teil des Lysozymmoleküls wurden kürzlich beschrieben<sup>[95a]</sup>.

## 3. Lysozyme verschiedenem Ursprungs

Lysozyme sind in der Natur weit verbreitet. Man findet sie in vielen Organen, Geweben und Sekreten von Vertebraten (Milz, Niere, Leukocyten, Tränen, Speichel, Milch, Serum). Lysozyme kommen jedoch auch in Invertebraten, Bakterien, Phagen und Pflanzen vor. Nach unseren Untersuchungen ist das Lysozym des Hühnereiweißes<sup>[1]</sup> ein basisches Protein mit niedrigem Molekulargewicht (15 000). In saurer Lösung bei höherer Temperatur ist es stabil, in alkalischer dagegen nicht. Es lysiert Suspensionen von *Micrococcus lysodeikticus* und bei Reaktionen mit geeigneten Substraten werden Substanzen freigesetzt, die mit Reagenzien auf reduzierende Zucker oder Aminozucker nachgewiesen werden können. Diese Charakterisierung gilt jedoch nur bedingt für andere Lysozyme<sup>[96]</sup>. Wir geben anschließend einen kurzen Überblick über einige speziell interessierende und vollständig gereinigte Lysozyme.

### 3.1. Reinigung, Analyse und Struktur

#### 3.1.1. Zwei Lysozyme aus einem Sekret: die Enteneiweiß-Lysozyme<sup>[97]</sup>

Durch Chromatographie am Ionenaustauscher Amberlite CG-50 ließen sich aus angereichertem Entenlysozym zwei (oder sogar drei) Enzyme charakterisieren

[92] S. Shinka, M. Imanishi, N. Miyagawa, T. Amano, M. Inouye u. A. Tsugita, Biken J. (Osaka) 10, 89 (1967).

[93] B. Bonavida, A. Miller u. E. Sercarz, Informationsaustauschgruppe Nr. 5, Immunopathologie (31. 1. 1967).

[94] R. V. Fellenberg u. L. Levine, Immunochemistry 4, 363 (1967).

[95] O. Kuwahara, S. Shinka, M. Imanishi, N. Miyagawa, T. Mori u. T. Amano, Biken J. (Osaka) 9, 1 (1966).

[95a] R. Arnon, J. Biochemistry (Berlin) 5, 583 (1968); R. Arnon u. M. Sela, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59 (1969), im Druck.

ren<sup>[97]</sup>, nämlich Entenlysozym I, II und III (in der Reihenfolge des Austritts aus der Säule). Die Lysozyme II und III sind wohldefinierte Verbindungen, die man stets findet, und die man selbst aus einem einzigen Ei isolieren kann. Sie enthalten kein Histidin<sup>[97–100]</sup> (Abb. 5). Erstmalig fand man in einem Sekret zwei

Ente II: H-Lys-Val-Tyr-Ser-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys

Huhn: H-Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys

Ente III: H-Lys-Val-Tyr-Gln-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys

Milch: H-Lys-Val-Phe-Glu-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Arg-

Arg-Leu-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-

Cys-Ala-Ala-Asn-Tyr-Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg-Cys-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Ser-Asn-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg-Cys-Ala-Ala-Asn-Tyr-Glu-Ser-Gly-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg-

Trp-Glu-Ser-Gly-Tyr-Asn-Thr-Arg-

Asp-Thr-Asn-Gly-Ser-Thr-Asx-Tyr-

Asp-Thr-Asn-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-

Asp-Thr-Asn-Gly-Ser-Thr-Asx-Tyr-

-Ser-Thr-Asp-Tyr-

Abb. 5. Aminosäuresequenzen (53 Aminosäuren) am Aminoende der Lysozyme II und III aus Enteneiweiß sowie des Lysozyms aus Hühnereiweiß [100]; N-terminale Sequenz und Sequenzen im aktiven Zentrumsbereich (Asp 52 und Glu 53) vom Muttermilchlysozym [107]. x in Asx: Zwischen Asp und Asn ist noch nicht entschieden.

Lysozyme, welche sich chromatographisch verschieden verhalten und kleine Unterschiede der Struktur aufweisen<sup>[99, 100]</sup>, die sich jedoch nicht durch einfaches Vergleichen der Aminosäurezusammensetzung erkennen lassen. Die strukturellen Unterschiede äußern sich in unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten, im Verhalten gegen kompetitive Inhibitoren wie NAG<sup>[101]</sup> und in den scheinbaren Affinitätskonstanten für das bakterielle Substrat<sup>[102]</sup> (Tabelle 5).

#### 3.1.2. Ein eigenartiges Vogellysozym: das Lysozym aus Gänseeiweiß<sup>[40]</sup>

Aus Gänzen mehrerer Arten konnte durch Chromatographie an Ionenaustauschern nur ein Lysozym erhalten und charakterisiert werden. Dieses Enzym hat eine völlig andere Aminosäurezusammensetzung als die Lysozyme der anderen Vögel<sup>[40, 103]</sup>. Wichtig ist der geringe Cystin- (zwei Reste pro Molekül) und Tryptophangehalt (drei Reste pro Molekül)<sup>[104]</sup>. Gänselysozym ist auch in saurer Lösung sehr wärmeempfindlich<sup>[101]</sup>. Es reagiert mit ganz anderer Geschwindigkeit mit Zellen von *M. lysodeikticus*<sup>[102]</sup>

[96] P. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 49, 1001 (1967).

[97] J. Jollès, G. Spotorno u. P. Jollès, Nature (London) 208, 1204 (1965).

[98] M. Imanishi, S. Shinka, N. Miyagawa, T. Amano u. A. Tsugita, Biken J. (Osaka) 9, 107 (1966).

[99] J. Jollès, J. Hermann, B. Niemann u. P. Jollès, Europ. J. Biochem. (Berlin) 1, 344 (1967).

[100] B. Niemann, J. Hermann u. J. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 50, 923 (1968).

[101] P. Jollès, J. Saint-Blancard, D. Charlemagne, A.-C. Dianoux, J. Jollès u. J.-L. Le Baron, Biochim. biophysica Acta 151, 532 (1968).

[102] J.-P. Locquet, J. Saint-Blancard u. P. Jollès, Biochim. biophysica Acta 167, 150 (1968).

und unterscheidet sich in seiner Spezifität gegen niedermolekulare Substrate bei pH = 6,2 merklich von anderen Lysozymen [104, 105].

### 3.1.3. Lysozyme aus normalen menschlichen Geweben und Sekreten

Jollès et al. [39, 96] gewannen eine große Anzahl chromatographisch reiner Lysozyme aus normalen menschlichen Geweben und Ausscheidungen durch Ionenaustauscherchromatographie an Amberlite CG-50, so Lysozym aus Milch [106, 107], Tränen [107], Speichel [108], Placenta [109], Milz, Serum und Leukozyten [110]. Diese menschlichen Enzyme sind einander chromatographisch sehr ähnlich, unterscheiden sich aber stark von den Vogellysozymen. In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, daß sich zwei Hühnerlysozyme (Ei und Lunge) verschieden verhalten, ebenso zwei Hundelysozyme (Milz und Niere) [1].

Aminosäureanalysen aller menschlichen Lysozyme gaben vergleichbare Ergebnisse und scheinen dafür zu sprechen, daß aus den genannten menschlichen Geweben und Sekreten stets das gleiche Lysozym gewonnen wurde. Diese Ansicht stützen auch neuere immunochemische Befunde von Osserman und Lawlor [111]. Jedoch mahnen die Ergebnisse über die Entenenzyme II und III mit ihren strukturellen Unterschieden trotz sehr ähnlicher Analysen zur Vorsicht; die endgültigen vergleichenden Untersuchungen der Trypsinabbauprodukte der reduzierten, carboxymethylierten Enzyme bleiben abzuwarten. Einige Angaben über die Struktur des Muttermilchlysozums wurden von Jollès [107] veröffentlicht.

Die Elektropherogramme der beim Abbau von Lysozymen der Milch und des Speichels entstehenden Peptide scheinen nahezu identisch zu sein [107]. Bei anderen menschlichen Lysozymen bestehen noch Unklarheiten, die zur Zeit untersucht werden. Die von Jollès et al. isolierten menschlichen Lysozyme erweisen sich bei Titration mit Suspensionen von *M. lysodeikticus* als drei- bis viermal so aktiv (bei äquivalenten Konzentrationen) wie das Lysozym des Hühnereiweißes.

### 3.1.4. Lysozyme von Leukämie-Patienten

Bei einigen Leukämien findet man große Mengen an Lysozym(en) im Blut [112] und/oder im Urin [111]. Jollès et al. [112] bestimmten die Lysozymkonzentrationen im Serum einer Gruppe von Patienten mit ver-

[103] R. E. Canfield u. S. McMurry, Biochem. biophysic. Res. Commun. 26, 38 (1967).

[104] A.-C. Dianoux u. P. Jollès, Helv. chim. Acta 52 (1969), im Druck.

[105] D. Charlemagne u. P. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 49, 1103 (1967).

[106] P. Jollès u. J. Jollès, Nature (London) 192, 1187 (1961).

[107] J. Jollès u. P. Jollès, Biochemistry (Washington) 6, 411 (1967); Bull. Soc. Chim. biol. 50 (1968), im Druck.

[108] J.-F. Petit u. P. Jollès, Nature (London) 200, 168 (1963).

[109] J.-F. Petit, M. Panigel u. P. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 45, 211 (1963).

[110] D. Charlemagne u. P. Jollès, Nouvelle Rev. franc. Hématol. 6, 355 (1966).

[111] E. F. Osserman u. D. P. Lawlor, J. exp. Medicine 124, 921 (1966).

[112] P. Jollès, M. Sternberg u. G. Mathé, 3. int. Lysozym-Symposium, Mailand 1964.

schiedenen Krankheiten des hämopoetischen Gewebes. Dabei ergab sich ein Zusammenhang zwischen dem Lysozymspiegel des Serums und der Zahl der Granulocyten; vielleicht besteht auch ein Zusammenhang mit der Zahl der Monocyten. Die Lysozyme aus dem Serum und den Leukocyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurden gereinigt und analysiert [110]. Sie scheinen mit den Enzymen normaler Gewebe identisch zu sein. Jedoch folgt bei der Ionenaustauscherchromatographie an Amberlite CG-50 der Hauptmenge des aktiven Enzyms stets eine kleine Menge einer weiteren wirksamen Substanz. Um festzustellen, ob beide Enzyme identisch sind, wird ein Vergleich der Elektropherogramme der Abbauprodukte nötig sein.

Osserman und Lawlor [111] reinigten Lysozyme aus Serum und Harn von Patienten mit monocytärer und monomyelocytärer Leukämie und fanden weitgehende Übereinstimmung mit den Daten des Lysozums gesunder Menschen [107]. Mit einer automatischen Methode zeigte Jollès [113], daß im Gegensatz zu anderen Leukämien nur bei der akuten Myeloblastenleukämie große Mengen an Lysozym ausgeschieden werden. Bei der Reinigung des Enzyms an Ionenaustauschern findet man zwei Spitzen mit biologischer Aktivität [114].

### 3.1.6. Lysozyme aus Phagen: Ein Beitrag zum Problem des genetischen Codes. Die erste Enzymsynthese in vitro

Nach Infektion mit Bakteriophagen entsteht in *Escherichia coli*-Zellen ein Lysozym [115], dessen Bildung von der Phagen-DNS kontrolliert wird (Abb. 6).

H-Met-Asn-Ile-Phe-Glu-Met-Leu-Arg-Ile-Asp-Glu-Gly-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Tyr-Lys-Asp-Thr-Glu-Gly-Tyr-Tyr-Thr-Ile-Gly-His-Leu-Leu-Thr-Lys-Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala-Ala-Lys-Ser-Glu-Leu-Asp-Lys-Ala-Ile-Gly-Arg-Asn-Cys-Asn-Gly-Val-Ile-Thr-Lys-Asp-Glu-Ala-Glu-Lys-Leu-Phe-Asn-Gln-Asp-Val-Asp-Ala-Ala-Val-Arg-Gly-Ile-Leu-Arg-Asn-Ala-Lys-Leu-Lys-Pro-Val-Tyr-Asp-Ser-Leu-Asp-Ala-Val-Arg-Arg-Cys-Ala-Leu-Ile-Asn-Met-Val-Phe-Gln-Met-Gly-Glu-Thr-Gly-Val-Ala-Gly-Phe-Thr-Asn-Ser-Leu-Arg-Met-Leu-Gln-Gln-Lys-Arg-Trp-Asp-Glu-Ala-Ala-Val-Asn-Leu-Ala-Lys-Ser-Arg-Trp-Tyr-Asn-Gln-Thr-Pro-Asn-Arg-Ala-Lys-Arg-Val-Ile-Thr-Thr-Phe-Arg-Thr-Gly-Thr-Trp-Asp-Ala-Tyr-Lys-Asn-Leu-OH

Abb. 6. Aminosäuresequenz vom Lysozym des T4-Phagen [41]. Die Sequenz vom Lysozym des T2-Phagen ist dieselbe mit drei Ausnahmen: Asn (40) → Ser, Ala (41) → Val und Thr (151) → Ala [115a].

Erzeugt man im Phagen Mutationen, so erhält man mehrere mutierte Lysozyme [116]. Ein Vergleich der chemischen Struktur der mutierten Lysozyme und des Wildtyplysozums scheint Fragen zum genetischen Code beantworten zu können. Mit Acridinderivaten, z. B.

[113] P. Jollès, M. Bonnafé, A. Mouton u. L. Schwarzenberg, Rev. franç. études clin. biol. 12, 996 (1967).

[114] A. Mouton u. P. Jollès, unveröffentlicht (1968).

[115] G. Koch u. W. J. Dreyer, Virology 6, 291 (1958).

[115a] M. Inouye u. A. Tsugita, J. molecular Biol. 37, 213 (1968).

[116] G. Streisinger, F. Mukai, W. J. Dreyer, B. Miller u. S. Horiuchi, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 25 (1961).

mit dem rasterverschiebenden [117] Mutagen Proflavin, kann man nicht nur die RNS-Codewörter für die einzelnen Aminosäuren in vivo, sondern auch die Leserichtung der Lysozym-Messenger-RNS und deren Nucleotidsequenz bestimmen. *Tsugita* et al. [118] haben bereits 16 absolute Codewörter für elf Aminosäuren ermittelt, die Leserichtung der Messenger-RNS bestimmt und einen Teil der Nucleotidsequenz der Messenger-RNS für das Lysozym des T4-Phagen aufgeklärt. Dies gelang durch vergleichende Untersuchungen der chemischen Strukturen des Wildtyplysozys und der Lysozyme von proflavininduzierten Doppelmutanten.

Die vollständige Aminosäuresequenz des T4-Phagenlysozys ist ebenfalls geklärt [41]. Das Molekulargewicht soll 18134 betragen. Die Primärstrukturen des T4-Phagenlysozys und des Lysozys aus Hühnereiweiß stimmen nicht überein, jedoch scheint die Verteilung von basischen, sauren und hydrophoben Aminosäuren ähnlich zu sein. Das Lysozym des T4-Phagen enthält keine S-S-Brücken und nur zwei Tryptophanreste. Es ist weniger stabil als das Hühnerenzym [119].

Aktives T4-Phagenlysozym konnte in zellfreien Systemen in Gegenwart von RNS aus phageninfizierten Bakterienzellen gewonnen werden. Diese Darstellung des aktiven Lysozys in vitro hat die Merkmale einer de-novo-Synthese, die messenger-RNS-spezifisch ist und durch Chloramphenicol, Puromycin und RNase gehemmt wird. Der Einbau von Aminosäuren und das Erscheinen der Lysozymaktivität folgen einer ähnlichen Kinetik und werden durch Mg-Ionen in gleicher Weise beeinflußt. Eine T4-Mutante mit „amber“-Mutation im Lysozymgen kann die Lysozymsynthese nicht anregen; dies zeigt, daß die gemessene Aktivität die des Phagenlysozys ist [120, 121].

### 3.1.7. Lysozyme aus Invertebraten

*Jollès* et al. fanden in vielen Invertebraten Spuren von Lysozym(en); Anneliden, Mollusken und Enchondermen enthalten größere Mengen [123, 124]. Interessant sind die beobachteten jahreszeitlichen Schwankungen der Lysozymkonzentrationen [125] sowie die Tatsache, daß diese Enzyme eine große Chitinaseaktivität besitzen.

[117] S. Brenner, L. Barnett, F. H. C. Crick u. A. Orgel, J. molecular Biol. 3, 121 (1961).

[118] E. Terzaghi, Y. Okada, G. Streisinger, J. Enrich, M. Inouye u. A. Tsugita, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 500 (1966).

[119] A. Tsugita, M. Inouye, E. Terzaghi u. G. Streisinger, J. biol. Chemistry 243, 391 (1968).

[120] R. F. Gesteland, W. Salser u. A. Bolle, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 2036 (1967).

[121] R. F. Gesteland, W. Salser u. A. Bolle, Nature (London) 215, 588 (1967).

[122] P. Jollès, M. Horisberger u. E. van Leemputten, unveröffentlicht (1968).

[123] P. Jollès, J. Jollès-Thaureaux u. C. Fromageot, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 151, 1368 (1957).

[124] P. Jollès u. S. Zuili, Biochim. biophysica Acta 39, 212 (1960).

[125] B. Niemann u. P. Jollès, unveröffentlicht (1968).

### 3.1.8. Lysozyme aus Pflanzen

*Fleming* berichtete bereits 1922 [14] über die bakteriolytische Wirkung von pflanzlichen Geweben. Später fanden *Meyer* et al. [126] Lysozymaktivität in groben Anreicherungen proteolytischer Enzyme aus Papaya- und Feigenlatex. 1955 konnten *Smith* et al. [127] ein Lysozym aus Papayalatex kristallin erhalten, das nach *Howard* und *Glazer* [128] ein Molekulargewicht von etwa 25000 hat und aus einer einzigen Polypeptidkette mit Glycin am Aminoende besteht. Papayalysozym lysiert Zellwände von *M. lysodeikticus* nur ein Drittel so schnell wie Lysozym aus Hühnereiweiß, zeigt jedoch gegen Tetra-N-acetylglucosamin eine 400-mal größere Chitinaseaktivität als Hühnerlysozym. Eine Beteiligung von Tryptophan am aktiven Zentrum von Papayalysozym konnte nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen konnten von *Jollès* et al. [122] mit einem Lysozym aus Weißrüben gemacht werden.

## 3.2. Spezifität, Reaktionsgeschwindigkeit und Wirkungsweise

Lysozyme aus Tieren verschiedener Arten oder manchmal auch verschiedener Organe oder Sekrete desselben Tieres unterscheiden sich chemisch, haben jedoch qualitativ die gleiche biologische Aktivität: Sie lysieren eine Suspension toter Zellen von *Micrococcus lysodeikticus* (Definition eines Lysozys) [129]. Die Reaktionsgeschwindigkeiten unterscheiden sich aber von Enzym zu Enzym. Später beobachtete man auch unterschiedliche Spezifitäten [96, 105] und Unterschiede im Verhalten gegen Inhibitoren [101, 102]. Bei diesen Experimenten wurden als Substrate verwendet: tote Zellen von *M. lysodeikticus*, Zellwände lysozymempfindlicher Bakterien (*B. megatherium*), Zellwände von Mycobakterien [130], lösliche Substrate von *M. lysodeikticus*, polymeres N-Acetylglucosamin aus Chitin (Chitotetraose usw.) und Zellwandsaccharide wie NAG-NAM-NAG-NAM.

### 3.2.1. Reaktionsgeschwindigkeit. Scheinbare Affinitätskonstante

Unter gleichen Bedingungen werden viele der eben erwähnten Substrate schneller von Lysozymen aus Vogeleiweiß als von menschlichen Lysozymen angegriffen [96, 129]. Entenlysozym scheint bei pH = 6,2 am vollständigsten und schnellsten auf Chitotetraose und Chitopentaose [105] einzuwirken. In Tabelle 5 sind die Affinitätskonstanten von sieben Lysozymen zum bakteriellen Substrat zusammengestellt [102].

[126] K. Meyer, E. Hahnel u. A. Steinberg, J. biol. Chemistry 163, 733 (1946).

[127] E. L. Smith, J. R. Kimmel, D. M. Brown u. E. O. P. Thompson, J. biol. Chemistry 215, 67 (1955).

[128] J. B. Howard u. A. N. Glazer, J. biol. Chemistry 242, 5715 (1967).

[129] P. Jollès, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 167, 350 (1967).

[130] H. de Wijs u. P. Jollès, Biochim. biophysica Acta 83, 326 (1964).

Tabelle 5. Scheinbare Affinitätskonstanten verschiedener Lysozyme zu Zellen von *Micrococcus lysodeikticus* [102].

Lysozym	scheinbare Affinitätskonstante (mg Zellen/l)
Mensch	normale Leukocyten
	100 $\pm$ 10
	normales Plasma
Vögel	Milch
	110 $\pm$ 10
	Hühnereiweiß
	115 $\pm$ 10
Vögel	Enteneiweiß II
	150 $\pm$ 10
	Enteneiweiß III
Vögel	Gänseeiweiß
	400 $\pm$ 100

### 3.2.2. Spezifität und Wirkungsweise

Die in Abschnitt 3.2. erwähnten Substrate werden von Hühner-, Enten- und menschlichen Lysozymen nicht zu Aminosäuren oder Monosacchariden, sondern vielfach zum Disaccharid NAG-NAM abgebaut [96, 129]. Die Entenlysozyme und das Lysozym aus menschlichen Tränen bauen das Tetrasaccharid NAG-NAM-NAG-NAM zum Disaccharid NAG-NAM, jedoch nicht zu freien Aminozuckern ab. Etwa 30% des Tetrasaccharids bleiben von der Hydrolyse verschont. In jedem Fall beobachtet man Transglykosidierungen. Diese Lysozyme scheinen also gleichartig zu wirken [131]. Ähnlich werden auch Tetra-NAG und Penta-NAG verdaut: Es finden ebenfalls Transglykosidierungen statt, aber unter den Abbauprodukten tritt auch freies NAG auf. Der Anteil an unverdautem Tetra-NAG variiert bei vorgegebenem pH-Wert von Enzym zu Enzym [105].

Anders verhält sich Gänselysozym. Bei pH = 6,2 werden Zellen von *M. lysodeikticus* rasch angegriffen, jedoch bricht die Lyse bald ab. Niedermolekulare Substrate wie NAG-NAM-NAG-NAM werden erst bei niedrigerem pH-Wert allmählich angegriffen [105]. Auch die beim Abbau der Zellen entstehenden Reaktionsprodukte variieren mit dem pH-Wert [104].

### 3.2.3. Verhalten der Lysozyme in Gegenwart von Inhibitoren

Die Wirksamkeit des Lysozyms aus Hühnereiweiß kann durch NAG [19, 30] gehemmt werden. Unter gleichen experimentellen Bedingungen variiert diese Hemmwirkung von Enzym zu Enzym [101]. Die menschlichen Lysozyme werden stärker von NAG gehemmt als Hühnerlysozym. Während die beiden Entenlysozyme bei pH = 6,2 zu weniger als 50% gehemmt werden, zeigt sich beim Gänselysozym praktisch überhaupt keine Hemmwirkung (Abb. 7). Ähnlich verhalten sich die Lysozyme gegen Tetra-NAG [101].

Andere Inhibitoren wie Histamin oder L-Histidin-methylester [88] hemmen dagegen Gänse- und Hühnerlysozym bei gleichen Konzentrationen in ähnlicher Weise [101].

[131] N. Sharon, J. Jollès u. P. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 48, 731 (1966).

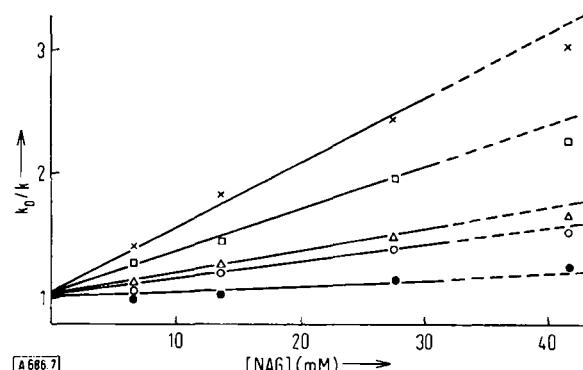


Abb. 7. Hemmung der Aktivität mehrerer Lysozyme ( $0,63 \cdot 10^{-6}$  M) gegen Zellen von *M. lysodeikticus* durch NAG (bei pH = 6,2) [101]; x = Mensch, □ = Huhn, △ = Ente II, ○ = Ente III, ● = Gans.

### 3.2.4. Immunologischer Vergleich der Lysozyme

Arnheim und Wilson [132] reinigten Lysozyme aus dem Eiweiß von Vögeln, die 17 Arten der Ordnung Galliformes angehören, durch Chromatographie an Sephadex G-75 und prüften diese Enzyme mit dem Antikörper des Haushuhnllysozyms auf ihre Reaktivität. Das Haushuhn und sein nächster Verwandter, das Wildhuhn, haben anscheinend identische Lysozyme, die sich von den Lysozymen der anderen untersuchten Arten (Rebhuhn, Wachtel, Fasan) durch quantitative Mikrokomplementbildung unterscheiden lassen.

Durch Immunodiffusion konnten die meisten antigenen Unterschiede nicht gefunden werden. Besonders eng verwandt sind die Lysozyme des Haushuhns, des Rebhuhns und der amerikanischen Wachtel.

Osserman und Lawlor [111] berichteten über immunochemische Ergebnisse, nach denen die bisher untersuchten menschlichen Lysozyme identisch zu sein scheinen. Unterschiede zu den Vogeleiweißenzymen zeigen sich darin, daß das Antiserum gegen menschliches Lysozym die Aktivität der Ei-lysozyme nicht hemmt.

## 4. Schlußbetrachtung

### 4.1. Definition und Bedeutung der Lysozyme

Nach den in Abschnitt 3. beschriebenen Ergebnissen muß man die in Abschnitt 1. und 2. gegebene Definition eines Lysozyms etwas revidieren [96]. Man kann sich Lysozyme vorstellen, deren isoelektrischer Punkt niedriger als 10,5–11 (Hühnerenzym) liegt; das Molekulargewicht kann wie beim Phagenenzym (18 000) [119] höher als 15 000 sein. Die Stabilität bei höherer Temperatur geht verloren, wenn der Cystingehalt des Enzyms zu gering wird [42]. Allen bisher untersuchten Lysozymen gemeinsam ist die Fähigkeit, Bakterien wie *M. lysodeikticus* zu lysieren, wobei  $\beta$ -(1→4)-Bindungen zwischen einem NAM- und einem NAG-Rest gespalten werden. Das Verhalten gegen niedermole-

[132] N. Arnheim u. A. C. Wilson, J. biol. Chemistry (1968), im Druck.

kulare Substrate scheint zumindest in einigen Fällen vom pH-Wert abzuhängen [104].

Bis heute ist nur wenig über die Bedeutung der Lysozyme in vivo bekannt<sup>[133]</sup>. Hühnereiweiß-Lysozym wird bisher als einziges Lysozym klinisch angewendet und zwar wegen seiner

der Bakterienzellwand reagieren. Lysozym spaltet die NAM-NAG-Bindung, und Penicillin verhindert vor allem die Biosynthese der Peptidbrücken. Penicillin hemmt auch die lysierende Wirkung von Lysozym, vermutlich wegen seiner strukturellen Verwandtschaft mit der *N*-Acetyl muraminsäure der Bakterienzellwand [140] (Abb. 8).

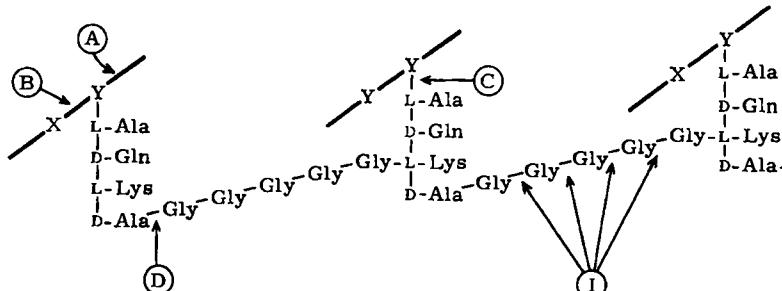


Abb. 8. In diesem Abschnitt des Peptidoglycans von *Staphylococcus aureus* zeigen die Pfeile auf die Bindungen, die von den Enzymen gelöst werden [135]. X = NAG; Y = NAM; A = Lysozym; B = Endo-acetylglucosaminidase; C = Acetylmuraminy-l-alanin-Amidase; D und I = Endopeptidase.

basischen (Zusatz zu Kuhmilch) und antibakteriellen Eigenschaften, die man als enzymatische Wirkung auf Substrate in den Zellwänden gram-positiver und gram-negativer Bakterien erklärt, obwohl bei den letztgenannten solche Substrate schwer zugänglich sind. In vivo – in Anwesenheit von Substanzen wie Komplementsfraktionen, Lipoproteinen, Immunglobulinen<sup>[133a]</sup> oder Nucleinsäuren<sup>[133b]</sup> – hat das Lysozym wahrscheinlich noch unerforschte Eigenschaften. Ferner kann es in vivo unter Verlust seiner katalytischen Aktivität in eine künstlich erzeugte Struktur aus Phospholipiden und Protein eingeschlossen werden<sup>[134]</sup>. Solche Komponenten kommen in vielen biologischen Membranen vor. Derartige Untersuchungen könnten einen neuen Zugang zum Phänomen der Enzymlatenz eröffnen und für die Theorie der Membranbildungen von Bedeutung sein.

## 4.2. Die Stellung von Lysozym unter den Peptidoglycane abbauenden Enzymen

Die Peptidoglycane der Bakterienzellwände werden meistens von bakteriolytischen Endoenzymen abgebaut. Man kann sie in drei Klassen einteilen: Carbohydrasen, Acetylmuraminy-l-alanin-Amidasen und Peptidasen<sup>[135]</sup>. Zu den Carbohydrasen gehören Endo-acetyl muramidasen, Endo-acetylglucosaminidasen und Exo-acetylglucosaminidasen. Die Lysozyme gehören zur Gruppe der Endo-acetyl muramidasen, zu denen auch das „32-Enzym“ aus *Streptomyces albus* G<sup>[136]</sup>, das „F<sub>1</sub>-Enzym“ aus *St. albus* G<sup>[137]</sup>, das „B-Enzym“ aus *Chalaropsis*<sup>[138]</sup> und Autolysin aus *Streptococcus faecalis*<sup>[139]</sup> gehören.

Es mag erwähnt werden, daß Lysozym und Penicillin – beide von *Fleming* entdeckt – mit dem gleichen Peptidoglycan

[133] *P. Jollès*, *Revue des Docteurs en Pharmacie (Paris)* 1968.  
 [133a] *U. W. Smith, R. Witty u. P. Brown*, *Nature (London)* 220, 387 (1968).

[133b] *D. Cattan, D. Bourgoin u. U. Joly, Bull. Soc. Chim. biol.*  
50, 409 (1968).

[134] D. Romeo u. B. de Bernard, Nature (London) 212, 1491 (1966).

[135] *J. L. Strominger u. J.-M. Ghysen*, Science (Washington) 156, 213 (1967).

[136] *J. M. Ghysen u. J. L. Strominger, Biochemistry (Washington) 2, 1110, 1119, (1963).*

[137] E. Munoz, J. M. Ghysen, M. Leyh-Bouille, J.-F. Petit u. R. Tinelli, Biochemistry 5, 3091 (1966).

[139] D. J. Pupper, J. E. Strominger, G. J. M. Clayton, *Science* (Washington) **146**, 781 (1964).

### 4.3. Lysozyme und Evolution

Lactose-Synthetase (EC 2.4.1.c) katalysiert die folgende Reaktion [141]:



Das lösliche Enzym der Milch erfordert die Gegenwart zweier Proteine, A und B, um wirksam zu werden. Einzeln sind diese Proteine nicht katalytisch aktiv. Man nimmt heute an, daß die Proteine A und B natürlich vorkommende Untereinheiten sind, und daß die enzymatische Aktivität mit der Bildung eines Komplexes AB zusammenhängt. Das Protein B wurde kristallin erhalten und erwies sich als  $\alpha$ -Lactalbumin. Die Aminosäuresequenz ist aufgeklärt (Abb. 9). Danach zeigt  $\alpha$ -Lactalbumin eine enge

**Hühnerlysozym:** H-Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-  
**Rinder- $\alpha$ -lactalbumin:** H-Glu-Glu-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Arg-

Ala-Met-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Glu-Leu-Lys—Asp-Leu-Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-

Asn-Trp-Val-Cys-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu—Ser-Asn-Phe-Asn-Thr-Gln-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr—Phe-His-Thr-Ser-Gly-Tyr-Asx-Thr-Glx-

Ala-Thr-Asn-Arg-Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ile-Leu-Gln,  
(Ala, Ile, Val, Glx)-Asx—Asx(Glx, Ser, Thr, Asx)-Tyr-Gly-Leu-Phe-(Glx-

Ile-Asn-Ser - Arg-Trp-Trp-Cys-Asn-Asp-Gly-Arg-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-  
Ile,Asx,Asx)-Lys-Ile - Trp-Cys - Lys-Asx-Asx-Glx-Asx-Pro-His-Ser - Ser-

Asn-Leu-Cys-Asn-Ile-Pro-Cys-Ser - Ala-Leu-Leu-Ser - Ser-Asp-Ile—Thr-Asx-Ile—Cys-Asn-Ile-Ser - Cys-Asp-Lys-Phe-Leu-Asx-Asx-Asx-Leu-Thr-

Ala-Ser-Val-Asn-Cys-Ala-Lys-Lys-Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-(Asx,Asx,Ile)-Met-Cys-Val-Lys-Lys-Ile-Leu—Asp-Lys-Val-Gly-Ile-

Asn-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg-Asn-Arg-Cys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Gln-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln

$$\begin{array}{c}
 \text{Ala-Trp-Ile-Arg-Gly-Cys} \text{--- Arg-Leu-OH} \\
 \text{--- Trp-Leu} \text{--- Cys-Glu-Lys-Leu-OH}
 \end{array}$$

Abb. 9. Vergleich der Aminosäuresequenzen des Rinder- $\alpha$ -lactalbumins und des Lysozyms aus Hühnereiweiß [142]. x in Asx und Glx: Zwischen Asp und Asn bzw. Gln und Glu ist noch nicht entschieden.

[140] H. Felsenfeld u. R. E. Handschumacher, Molecular Pharmacol. 3, 153 (1967).

[141] U. Brodbeck, W. L. Denton, N. Tanahashi u. K. E. Ebner, J. biol. Chemistry 242, 1391 (1966).

strukturelle Verwandtschaft zum Lysozym des Hühnereiweißes. Folgen wir Brew et al.<sup>[142]</sup>, so läßt die weite Verbreitung von Lysozym im Tierreich und das ausschließliche Vorkommen von  $\alpha$ -Lactalbumin und Lactose in der Milch auf eine direkte Evolution von  $\alpha$ -Lactalbumin aus Lysozym in einem Vorfahren der Säugetiere als einen ersten Schritt der Evolution von Lactose-Synthetase und der Milchdrüsen schließen. – Auch zwischen Avidinen und Lysozymen bestehen genetische Beziehungen<sup>[143]</sup>.

Lysozym und  $\alpha$ -Lactalbumin haben zwar ähnliche chemische Strukturen<sup>[142]</sup>, doch fehlt dem  $\alpha$ -Lactalbumin die lysierende Wirkung, vermutlich weil die für die Aktivität des Hühnerysosyzms wichtige Aminosäure 35 (Glu) durch Histidin ersetzt ist.

Trotz der Tatsache, daß Hühnereiweiß-, Phagen- und Papayalatelysosyzm völlig verschieden zusammengesetzt sind, lysieren alle diese Enzyme die Zellen von *M. lysodeikticus*. Hühnereiweiß-Lysozym, andere Vogellysosyzme (sogar Gänselysosyzm mit seinen sehr abweichenden Eigenschaften), menschliche Lysozyme (Mol.-Gew. 15000)<sup>[96, 107]</sup> usw. haben ähnliche Strukturen und aktive Zentren (Abb. 5) und scheinen die

Aufgabe zu haben, Bakterienzellwände zu verdauen, während Phagenlysozym (Mol.-Gew. 18000)<sup>[119]</sup> eine spezifische Affinität zu *E. coli*-Zellen zu haben scheint. Papayalatelysosyzm (Mol.-Gew. 25000)<sup>[128]</sup> reagiert mehr als Chitinase denn als Lysozym; der Tryptophanrest scheint am aktiven Zentrum nicht mehr beteiligt zu sein.

Auch Weißrüberlysosyzm und Lysozyme aus Invertebraten sind weitaus bessere Chitinases als Muraminidasen. So stellt sich die Frage, ob diese letzteren Enzyme noch zu den Lysosyzmen gezählt werden können, die, laut offizieller Nomenklatur, vor allem Muraminidasen („Mucopeptide, *N*-Acetyl muramylhydrolasen“) sein sollen mit schwacher Chitinaseaktivität. Diese muß jedoch vorhanden sein, denn ein Enzym aus *Chalaropsis*<sup>[144]</sup>, das nur eine Muraminidase ist, wurde nicht Lysosyzm genannt.

Eingegangen am 19. Juni 1968 [A 686]

[142] K. Brew, T. C. Vanaman u. R. L. Hill, J. biol. Chemistry 242, 3747 (1967).

[143] N. M. Green, Nature (London) 217, 254 (1968).

[144] J. H. Hash u. M. V. Rothlauf, J. biol. Chemistry 242, 5586 (1967).

## ZUSCHRIFTEN

### Organometallsubstituierte Sulfide als Liganden in Pentacarbonylchrom(0)-Komplexen<sup>[\*\*]</sup>

Von H. Schumann, O. Stelzer und W. Gick<sup>[\*]</sup>

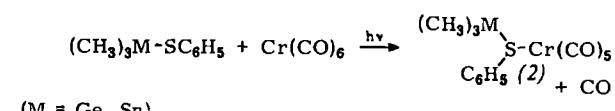
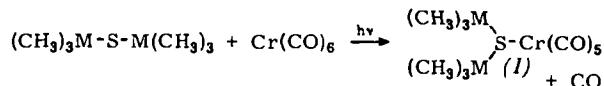
Organogermanium-, -zinn- und -bleisulfide sind erstaunlich stabil, was vielfach mit einer Beteiligung der freien Elektronenpaare des Schwefels an der Metall-Schwefel-Bindung im Sinne von (p→d) $\pi$ -Mehrfachbindungsanteilen begründet wird<sup>[1]</sup>. Übereinstimmend damit sollten Trimethylgermyl- und Trimethylstannylsulfide sich komplexchemisch anders verhalten als Dialkyl- oder Diarylsulfide, die in einer Vielzahl von Komplexen als  $\sigma$ -Donoren auftreten<sup>[2]</sup>. So ergaben bisherige Untersuchungen<sup>[3]</sup>, daß bei Reaktionen zwischen Übergangsmetallcarbonylen und Organozinnssulfiden die Zinn-Schwefel-Bindungen gespalten wurden; es gelang nicht, beständige Komplexe mit Organozinnssulfiden als Liganden darzustellen.

Durch Umsetzung von Bis(trimethylgermyl)-, Bis(trimethylstannyl)-, Phenyltrimethylgermyl- oder Phenyltrimethylstannylsulfid mit Hexacarbonylchrom in Tetrahydrofuran (THF) bei Raumtemperatur unter UV-Bestrahlung<sup>[4]</sup> konnten wir nun erstmals stabile Carbonylchrom(0)-Komplexe mit organometallsubstituierten Sulfiden als Liganden synthetisieren.

Die Wahl des Lösungsmittels ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Verwendet man an Stelle von THF etwa Pentan, so wird die Reaktionsgeschwindigkeit stark verringert; dies dürfte einerseits auf die unterschiedliche Löslichkeit des Hexacarbonylchroms in diesen Solventien, andererseits aber auch auf eine Teilnahme von THF am Reaktionsablauf zurückzuführen sein<sup>[5]</sup>.

Die Verbindungen (1) und (2) sind gegen Luftsauerstoff und Wasser empfindlich, ihre thermische Beständigkeit ist wesentlich geringer als die der entsprechenden Organometallphosphin-Komplexe<sup>[6]</sup>.

Die IR-Spektren zeigen infolge Aufhebung der Entartung der  $E_1$ -Schwingung unter dem Einfluß der unsymmetrischen



Verbindung, M =	Zers.-P. (°C)	$\nu_{\text{CO}}$ (cm $^{-1}$ )	$\delta\text{CH}_3$ [a] (Hz)	$\nu_{\text{CrS}}$ (cm $^{-1}$ )	$\nu_{\text{MS}}$ (cm $^{-1}$ )	$\nu_{\text{MS}}$ [b] (cm $^{-1}$ )	$\lambda$ (nm)
(1a), Ge	70	2066	-49	449	383	414	420
		1984			360	366	$\epsilon = 895$
		1930					
		1912					
(1b), Sn	95	2087	-45	447	325	366	435
		2004			348	321	$\epsilon = 816$
		1956					
		1937					
(2a), Ge	45	2079	-46	446	367	374	413
		1996					$\epsilon = 774$
		1949					
		1930					
(2b), Sn	45	2074	-44	451	342	342	417
		1996					$\epsilon = 1200$
		1949					
		1926					

[a] 5-proz. Lösung in  $\text{CDCl}_3$ , TMS als externer Standard.

[b] Im freien Organometallssulfid.

Liganden<sup>[7]</sup> vier CO-Valenzschwingungen für das  $\text{Cr}(\text{CO})_5$ -Gerüst, deren Lage nur wenig vom Komplexpartner abhängig ist. Auch die CrS- und MS-Valenzschwingungen ändern ihre Frequenzen innerhalb der Reihe nur geringfügig. Bei