

## Untersuchungen über die Ursachen der Faltung von Proteinketten (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Christian B. Anfinsen<sup>[\*]</sup>

Das Telegramm, das ich von der Königlich-Schwedischen Akademie der Wissenschaften erhielt, erwähnt besonders: „... Untersuchungen über Ribonuclease, insbesondere den Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz und biologisch aktiver Konformation ...“. Die Arbeiten, die meine Kollegen und ich über das Wesen des Vorganges ausgeführt haben, der die Faltung von Polypeptidketten zur einzig sinnvollen dreidimensionalen Struktur der Proteine steuert, wurden tatsächlich stark von Beobachtungen am Ribonuclease-Molekül beeinflusst. Viele andere, so etwa *Anson* und *Mirsky*<sup>[1]</sup> in den dreißiger sowie *Lumry* und *Eyring*<sup>[2]</sup> in den fünfziger Jahren, hatten die Reversibilität der Denaturierung von Proteinen beobachtet und diskutiert. Die wirkliche Eleganz dieses Vorgangs, einer Konsequenz der natürlichen Selektion, wurde jedoch erst durch die Arbeiten an der Ribonuclease klar, denn die Rückfaltung dieses Moleküls nach voller Denaturierung durch reduktive Spaltung seiner vier Disulfidbrücken (Abb. 1) erfordert, daß nur eine der 105 Paarungsmöglichkeiten von acht Thiolgruppen zu vier Disulfidbrücken zum Zuge kommt. Die ursprünglichen Beobachtungen, die zu diesem Schluß führten, wurden zusammen mit meinen Kollegen *Michael Sela* und *Fred White* 1956–1957 gemacht<sup>[6]</sup>. Diese Untersuchungen waren in Wirklichkeit der Anfang einer langen Reihe von Arbeiten, die in zunächst noch ziemlich vager Form auf die Totalsynthese des Proteins hinzielten. Wie wir alle

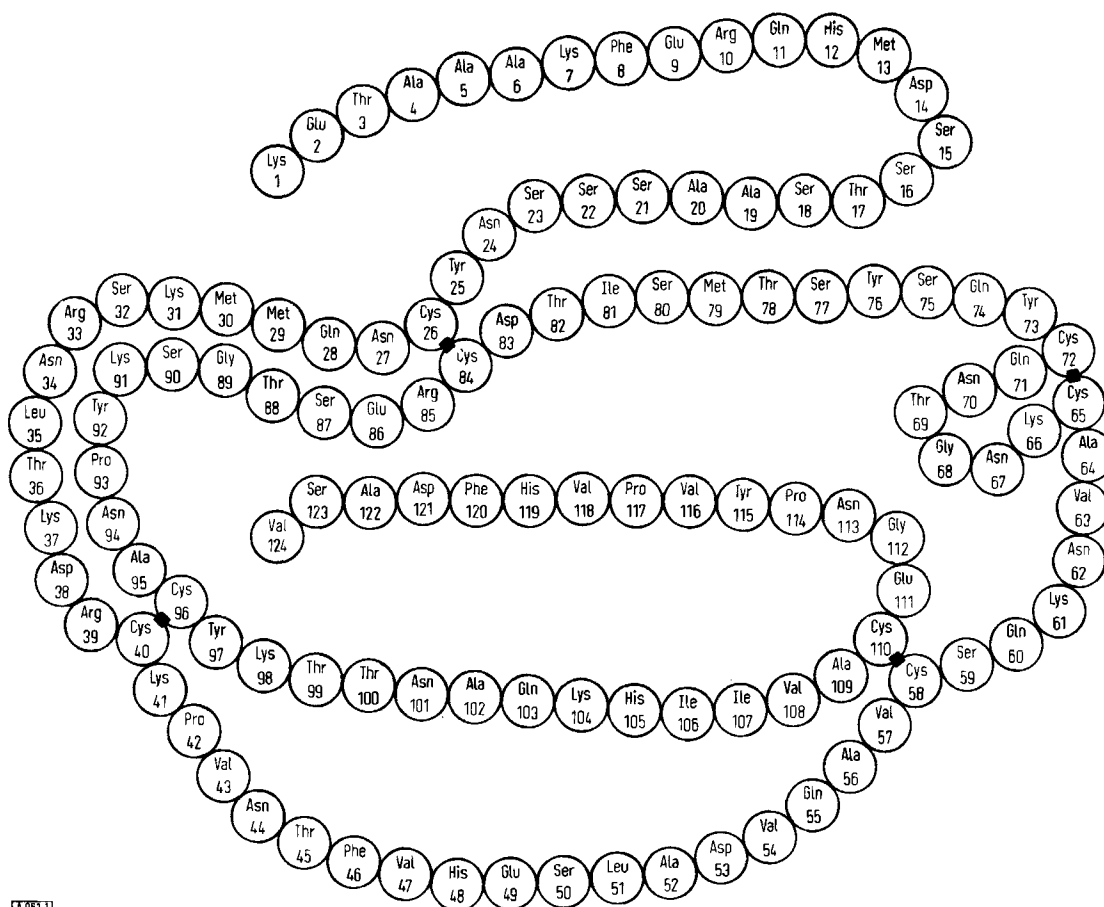
wissen, haben inzwischen *Gutte* und *Merrifield*<sup>[7]</sup> am Rockefeller Institute sowie *Ralph Hirschman* und seine Kollegen am Merck Research Institute<sup>[8]</sup> diese monumentale Aufgabe bewältigt.

Die Arbeiten über die Renaturierung von völlig denaturierter Ribonuclease erforderten viele zusätzliche Untersuchungen<sup>[9–12]</sup>, bis schließlich die Allgemeingültigkeit der Hypothese feststand, die wir gelegentlich<sup>[13]</sup> die „thermodynamische Hypothese“ genannt haben. Diese Hypothese – beinahe eine von selbst einleuchtende Wahrheit, wenn man sich überlegt, wie Zellen organisiert sein könnten – behauptet, daß die dreidimensionale Struktur eines nativen Proteins in seinem normalen physiologischen Milieu (Lösungsmittel, pH-Wert, Ionenstärke, Gegenwart anderer Komponenten wie etwa Metall-Ionen oder prosthetische Gruppen, Temperatur usw.) diejenige ist, in welcher die Gibbs'sche freie Energie des *gesamten Systems* am niedrigsten ist; d. h., daß die native Konformation von der Gesamtheit der interatomaren Wechselwirkungen und infolgedessen von der Aminosäuresequenz in einem *gegebenen Milieu* bestimmt wird. Diese Idee betont die Tatsache, daß wie bei der natürlichen Selektion durch die „Planung“ von Makromolekülen während der Evolution ein Proteinmolekül nur dann eine stabile, sinnvolle Struktur annimmt, wenn es sich unter ähnlichen Bedingungen wie denjenigen befindet, für die es ausgewählt wurde – im sogenannten physiologischen Zustand.

Nachdem wir mehrere Jahre an der Ribonuclease gearbeitet hatten, wurde es uns ebenso wie vielen anderen auf dem Gebiet der Proteinkonformation Tätigen klar, daß Proteine ohne behindernde Disulfidbrücken oder andere kovalente Quervernetzungen bessere Modelle für die Untersuchung von Thermodynamik und Kinetik der Keimbil-

[\*] Prof. Dr. C. B. Anfinsen  
Laboratory of Chemical Biology,  
National Institute of Arthritis,  
Metabolic and Digestive Diseases,  
National Institutes of Health  
Bethesda, Maryland 20014 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1973. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.



[A 961.1]

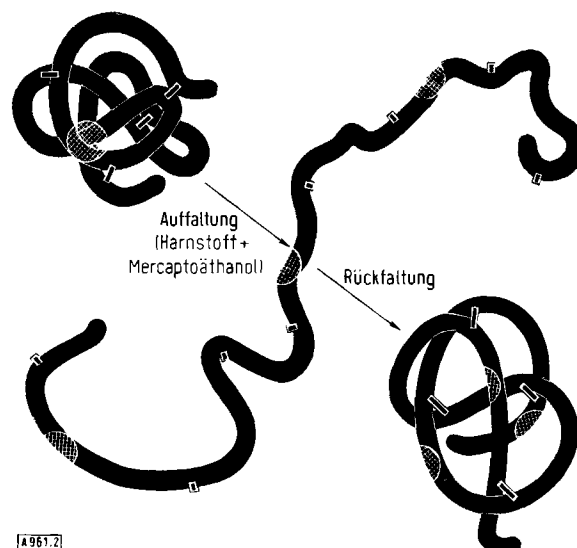
Abb. 1. Die Aminosäuresequenz von Rinderpankreas-Ribonuclease [3–5].

dung und der sich anschließenden Vorgänge der Polypeptidketten-Faltung darstellten. Vieles von dem, was ich im folgenden mitteilen werde, betrifft Arbeiten über die flexible und daher besser zu untersuchende Nuclease aus *Staphylococcus*. Aber ich möchte zunächst über einige der älteren und grundlegenden Experimente mit der Rinderpankreas-Ribonuclease selbst berichten.

### Hinweise für die Richtigkeit der „thermodynamischen Hypothese“

Ein Versuch im Zusammenhang mit der Übertragung der Information der linearen Aminosäuresequenz in die native Konformation, der uns besonders befriedigte, betraf die Umlagerung der ungeordneten („scrambled“) Ribonuclease<sup>[12]</sup>. Wenn man das völlig reduzierte Protein mit seinen acht Thiolgruppen unter denaturierenden Bedingungen wie in einer 8 M Harnstofflösung reoxidieren läßt, bekommt man ein Gemisch, das viele oder sogar alle der möglichen 105 Disulfidbrücken-Isomeren enthält (schematische Darstellung rechts unten in Abb. 2). Dieses Gemisch ist im wesentlichen inaktiv – es besitzt nur ungefähr 1% der Aktivität des nativen Enzyms. Wenn man den Harnstoff entfernt und das ungeordnete Protein einer kleinen Menge von thiolgruppen-haltigen Reagentien, wie etwa Mercaptoäthanol, aussetzt, findet ein Disulfidbrücken-Austausch statt, und schließlich geht die Mischung in ein homogenes Produkt über, das man von nativer Ribonuclease nicht

unterscheiden kann. Dieser Vorgang wird ausschließlich durch die freie Energie der Konformation getrieben, die beim Übergang des Proteins in die stabile, native Struktur



[A 961.2]

Abb. 2. Schematische Darstellung der reduktiven Denaturierung eines durch Disulfidbrücken vernetzten Proteins in 8 M Harnstoff mit Mercaptoäthanol in vitro. Die Umwandlung der gestreckten, denaturierten Form in eine Reihe von statistisch quervernetzten, ungeordneten Isomeren wird rechts unten gezeigt.

gewonnen wird. Nebenher sprachen diese Versuche auch gegen die Notwendigkeit, daß sich die Polypeptidkette während ihrer Verlängerung bei der Biosynthese vom Ami-

no- zum Carboxyende fortschreitend faltet. Dem ungeordneten Protein scheinen die verschiedenartigen Regelmäßigkeiten in der Struktur im wesentlichen zu fehlen, die ein natives Molekül kennzeichnen.

Ein störendes Moment in der Kinetik der soeben beschriebenen Renaturierung („unscrambling“) der Ribonuclease war die Langsamkeit dieses Prozesses, der häufig Stunden beanspruchte<sup>[11]</sup>. Es war bekannt, daß die Synthese einer Proteinkette von der Länge der Ribonuclease (124 Aminosäurereste) im Gewebe eines höheren Organismus ungefähr 2 Minuten dauert<sup>[14, 15]</sup>. Die Diskrepanz zwischen den Geschwindigkeiten in vitro und in vivo führte zur Entdeckung eines Enzymsystems im endoplasmatischen Reticulum (besonders in solchen Zellen, die mit der Sekretion von extrazellulären, Disulfidbrücken enthaltenden Proteinen zu tun haben), das den Disulfidbrückenaustausch katalysiert und das, wenn man es zu Lösungen von reduzierter Ribonuclease oder von Proteinen mit statistisch geknüpften Disulfidbrücken gibt, die schnelle Bildung der richtigen, nativen Disulfidpaarung in weniger als den für die Proteinbiosynthese benötigten 2 Minuten bewirkt<sup>[16, 17]</sup>. Die soeben erwähnte Diskrepanz in den Geschwindigkeiten hätte bei der Faltung von nicht quervernetzten Strukturen nicht beobachtet werden können, und, wie später ausgeführt werden wird, können solche beweglichen Proteine wie die Staphylococcus-Nuclease oder Myoglobin in einigen Zehntelsekunden oder noch weniger völlig renaturiert werden.

muß im aktiven Enzym einer in der SH-Form vorliegen<sup>[18, 19]</sup>. Es scheint in einer rein statistischen Weise umlagernd zu wirken. Ein Protein, dessen Disulfidbrücken weitgehend gelöst und falsch zurückgebildet worden waren, braucht daher nur dem Enzym ausgesetzt zu werden (wobei der essentielle Halbcystinrest in der vorreduzierten Form vorliegen muß), und es werden solange Disulfidbrücken ausgetauscht, bis die native Form des Proteinsubstrats erreicht ist. Wahrscheinlich werden Disulfidbindungen, die gegenüber dem Lösungsmittel exponiert sind oder andere thermodynamisch ungünstige Stellungen einnehmen, ständig gelöst und nach und nach durch günstigere Halbcystinpaarungen ersetzt, bis das Enzym aus räumlichen Gründen oder weil die freie Energie durch Konformationsänderung nicht weiter verringert werden kann, nicht länger mit den Disulfidbindungen in Kontakt kommt. Modelluntersuchungen an Ribonuclease-Derivaten hatten gezeigt, daß bei Störung der genetischen Information, d. h. der linearen Sequenz des Proteins, durch Kettenabbruch oder durch Deletionen von Aminosäuren an verschiedenen Punkten das zugefügte Disulfidaustausch-Enzym im Laufe seiner „Sondierung“ diese thermodynamische Instabilität entdeckt und eine rein statistische Kombination der Disulfidbrücken bewirkt, wobei sich ein inaktives, quervernetztes Gefüge aus Ketten und Kettenfragmenten bildet (z. B.<sup>[20]</sup>). Bei den natürlich vorkommenden Proteinen Insulin und Chymotrypsin induzierte das Enzym tatsächlich solch ei-

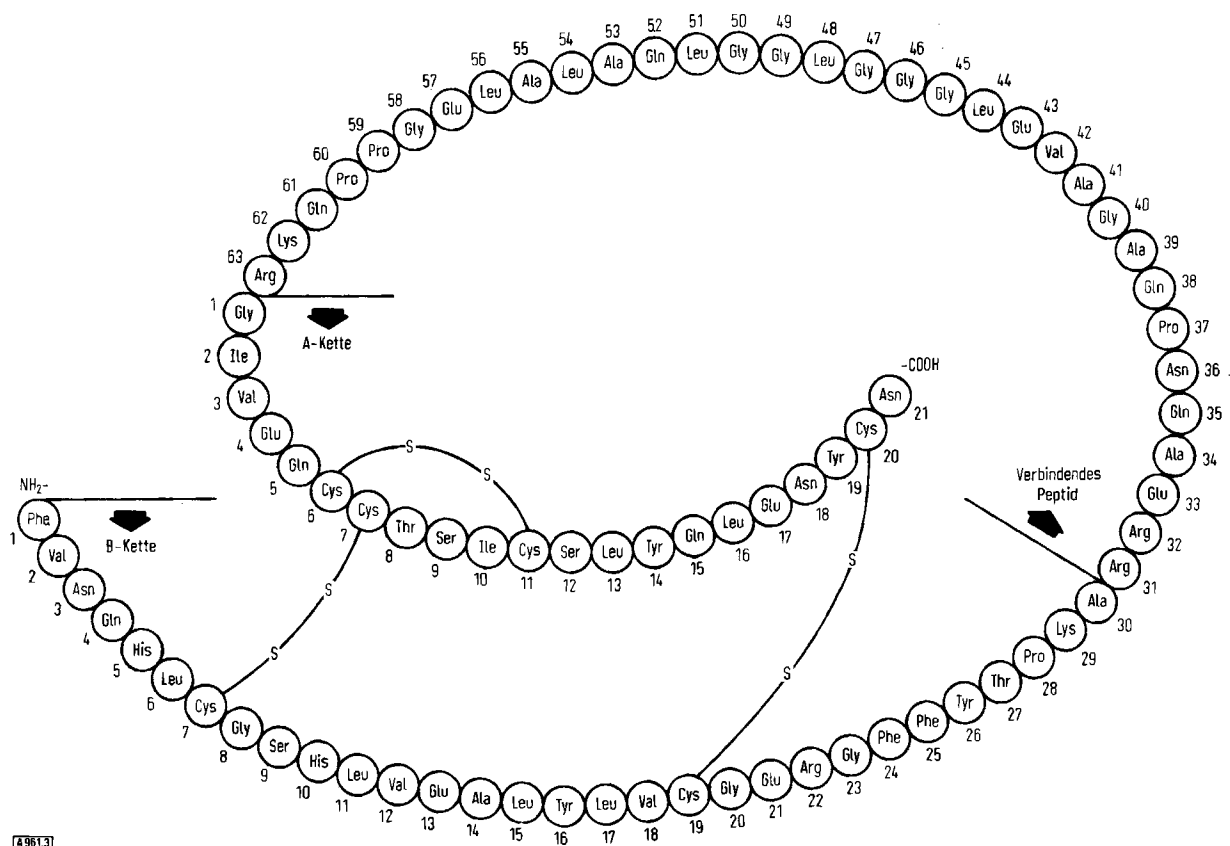


Abb. 3. Die Struktur von Schweine-Proinsulin (R. E. Chance, R. M. Ellis und W. W. Bromer, Science 161, 165 (1968)).

Bei den folgenden Versuchen diente das Disulfidaustausch-Enzym zur Prüfung der thermodynamischen Stabilität von Proteinen mit Disulfidbrücken. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 42000; von seinen drei Halbcystinresten

nen statistischen Austausch von Disulfidbrücken<sup>[21]</sup>. Chymotrypsin enthält drei durch Disulfidbrücken verbundene Ketten; es leitet sich bekanntlich von einem einkettigen Vorläufer, dem Chymotrypsinogen, durch Ausschneiden

von zwei inneren Abschnitten der Sequenz ab. Später zeigten *Steiner* und seine Kollegen in eleganten Untersuchungen, daß sich Insulin ebenfalls von einem einkettigen Vorläufer, dem Proinsulin (Abb. 3), ableitet, das in die Zweikettenform, in der wir das aktive Hormon normalerweise finden, durch Herausspalten eines Abschnitts aus der Mitte des Proinsulinstranges nach Bildung der drei Disulfidbrücken übergeht<sup>[22]</sup>. Im Gegensatz dazu werden die mehrkettigen Immunglobuline nicht von dem Enzym inaktiviert, da sie als normale Produkte der Disulfidbrückenbindung von vier vorher gebildeten Polypeptidketten bereits eine geordnete Konformation besitzen.

### Voraussetzungen für die richtige Faltung von Polypeptidketten

Die oben dargelegten Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Disulfidbrückenaustausch-Enzym ließen annehmen, daß eine richtige und sinnvolle Translation der genetischen Information bei einem bestimmten Protein nicht mehr möglich ist, wenn die lineare Information durch Deletion von Aminosäureresten verfälscht ist. Wie jedoch bei den meisten Regeln, gibt es auch hier viele Ausnahmen. Erstens wurde bei einer Reihe von Proteinen gezeigt, daß sie nach Kürzung am Amino- oder Carboxyende unter Disulfidbrückenspaltung und -wiederschließung reversibel denaturieren können<sup>[23]</sup>. Andere können in zwei<sup>[24–26]</sup> oder sogar drei Fragmente gespalten werden, die, ohne in Lösung

ase S (RNase S), die aus einem 20-Reste-Fragment des aminoterminalen Endes besteht, das durch eine Vielzahl nicht-kovalenter Wechselwirkungen an den Rest des Moleküls gebunden ist, der aus 104 Aminosäureresten mit allen vier Disulfidbrücken besteht. Die Arbeiten von *Wyckoff*, *Richards* und ihren Mitarbeitern über die dreidimensionale Struktur dieses Zweifragment-Komplexes<sup>[27]</sup> und über die Identifizierung vieler der für die Komplementation wesentlichen Aminosäureseitenketten gehören inzwischen zu den klassischen Untersuchungen. Dasselbe gilt auch für die Arbeiten von *Hofmann*<sup>[28]</sup> und *Scoffone*<sup>[29]</sup> sowie ihren Kollegen über die halbsynthetischen Analogen dieses Enzymderivats. Arbeiten in unserem Laboratorium<sup>[30]</sup> zeigten, daß das 20-Reste-Fragment des RNase-S-Peptids ohne Verlust der enzymatischen Aktivität oder seiner Stabilität in Lösung am Carboxyende um fünf Reste verkürzt werden kann.

Andere Beispiele der Bewahrung eines „Gedächtnisses“ für die native Struktur sind bei komplexierenden Fragmenten des Staphylococcusnuclease-Moleküls gefunden worden<sup>[25, 31]</sup>. Dieses von Calcium-Ionen abhängige, RNA und DNA spaltende Enzym (Abb. 4) besteht aus 149 Aminosäuren und enthält weder Disulfidbrücken noch Thiolgruppen<sup>[32, 33]</sup>. Obwohl es in Lösung eine beachtliche Flexibilität zeigt, wie man am leichten Austausch labiler Wasserstoffatome aus dem Inneren des Moleküls mit dem Wasserstoff des Lösungsmittels sieht<sup>[34]</sup>, weicht zu jedem Zeitpunkt nur ein sehr kleiner Bruchteil der gesamten Population von der intakten nativen Konformation („Format“)

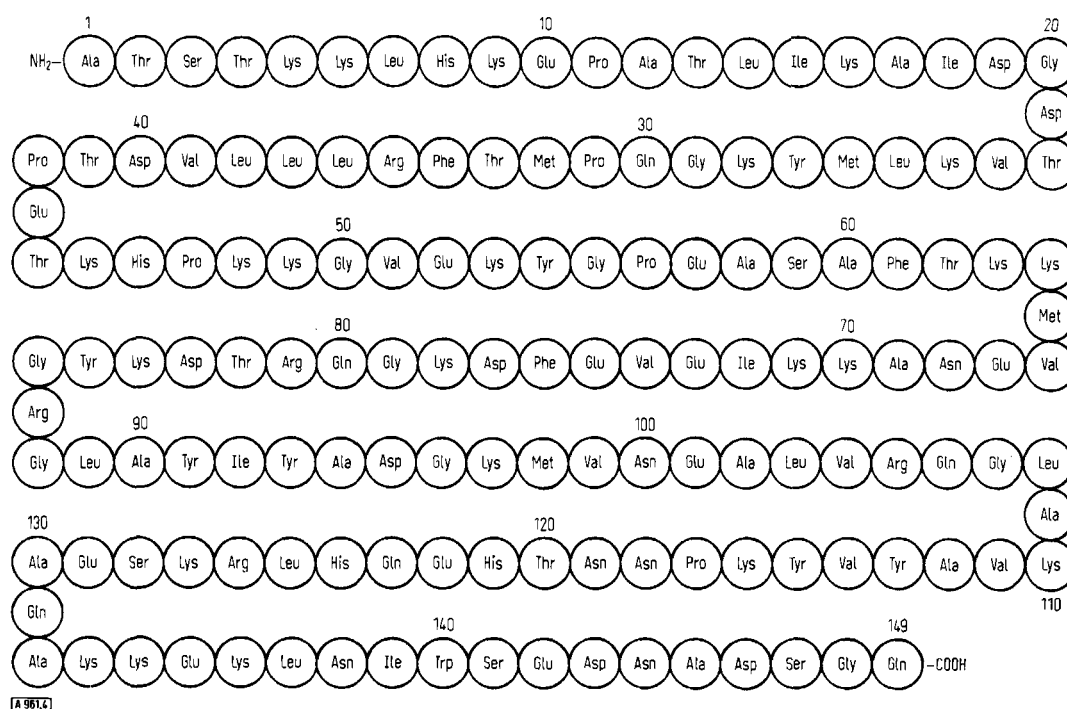


Abb. 4. Die kovalente Struktur der häufigsten extrazellulären Nuclease aus *Staphylococcus aureus* [32, 33].

erkennbare Strukturen aufzuweisen, unter Bildung nicht-kovalenter Bindungen rekombinieren und biologisch aktive Strukturen mit physikalischen Eigenschaften ergeben, die denen des ursprünglichen Proteinmoleküls sehr ähnlich sind. *Richards* und seine Kollegen<sup>[24]</sup> entdeckten das erste dieser rekombinierenden Systeme, nämlich die Ribonucle-

ase S. Spektrale und hydrodynamische Messungen zeigen bis zu ungefähr 55°C eine Homogenität in Lösung und eine bemerkenswerte Stabilität. Das Protein ist sowohl gegen Wasserstoffaustausch<sup>[34]</sup> als auch gegen Hydrolyse durch proteolytische Enzyme<sup>[35]</sup> sehr gut stabilisiert, wenn Calcium-Ionen und der inhibierende Ligand 3',5'-Thymidindi-

phosphat (pdTp) zugegeben werden. Beispielsweise spaltet Trypsin unter diesen Bedingungen an nur sehr wenigen Stellen – am lockeren aminoterminalen Teil der Kette und an einer Schleife von Resten, die laut Röntgen-Strukturanalyse aus dem Molekül hervorstehen. Die Spaltung erfolgt zwischen den Lysinresten 5 und 6 sowie in der Sequenz Pro-Lys-Lys-Gly (Rest 47 bis 50) zwischen den Resten 48 und 49 oder 49 und 50<sup>[25]</sup>. Die resultierenden Bruchstücke (6–48) und (49–149) oder (50–149) weisen keine nachweisbare Struktur in Lösung auf<sup>[36]</sup>. Werden sie jedoch in stöchiometrischen Mengen miteinander gemischt, so treten, wie bei der RNase S, wieder enzymatische Aktivität (ungefähr 10%) und charakteristische Eigenschaften der nativen Struktur auf (der Komplex heißt Nuclease

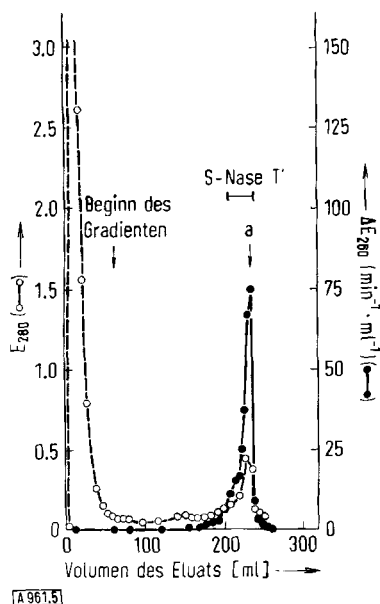


Abb. 5. Isolierung von halbsynthetischer Nuclease T auf einer Phosphocellulose-Säule nach „funktioneller“ Reinigung durch Trypsinhydrolyse in Gegenwart von Calcium-Ionen und Thymidin-3',5'-diphosphat [41].

T). Es wurde kürzlich gezeigt<sup>[37a]</sup>, daß Nuclease T fast isomorph mit der nativen Nuclease ist<sup>[37b]</sup>. Die Spaltungen und Deletionen zerstören also nicht den geometrischen „Sinn“ der Kette. Weiterhin zeigte sich, daß der Rest 149 durch Behandlung mit Carboxypeptidase entfernt werden kann, und daß, wie Peptidsynthesen von Analogen des Fragments (6–47) an fester Phase<sup>[38]</sup> ergaben, auch die Reste 45 bis 49 entbehrlich sind.

Frühere Arbeiten von David Ontjes<sup>[39]</sup> hatten ergeben, daß die schnelle und bequeme Festphasenmethode, die Merrifield<sup>[40]</sup> für die Peptidsynthese entwickelt hatte, zur Synthese von Analogen des (6–47)-Fragments der Nuclease T angewendet werden konnte. Obwohl die Produkte durch beträchtliche Mengen von fehlerhaften Sequenzen, denen infolge der nicht völlig quantitativen Kupplungsreaktion Aminosäurereste fehlen, verunreinigt waren, konnten sie doch mit den üblichen chromatographischen Methoden soweit gereinigt werden, daß mit Sicherheit auf die relative Wichtigkeit der verschiedenen Komponenten der Kette geschlossen werden konnte. Chaiken<sup>[41]</sup> gelang es unter Ausnutzung der begrenzten Proteolyse, die bei der Behandlung der Nuclease mit Trypsin in Gegenwart der stabilisierenden Liganden Calcium-Ionen und pdTp eintritt, diejeni-

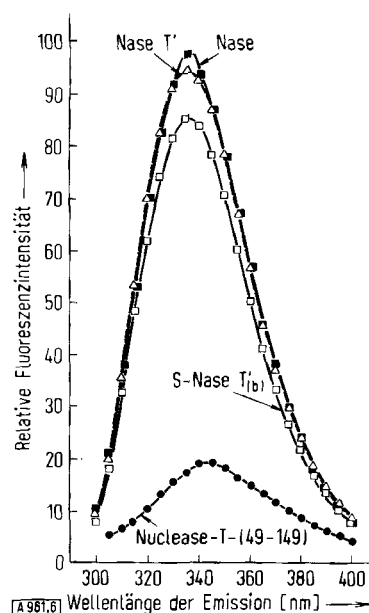


Abb. 6. Anwendung von Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der relativen Hydrophobie (bei der Nuclease wahrscheinlich ein Maß für den nativen Zustand) der molekularen Umgebung des einzigen Tryptophanrestes in diesem Protein [39, 41].

gen fehlerhaften Moleküle des synthetischen Peptids (6–47) wegzuhydrolysieren, die keinen stabilen Komplex mit dem großen, nativen Fragment (49–149) bildeten. Nach dieser Proteolyse erhielt er durch Säulenchromatographie auf Phosphocellulose eine halbsynthetische Nuclease T, die so gut wie identisch mit nativer Nuclease T war (Abb. 5). So wurde gezeigt, daß etwa die starke Erhöhung der Fluoreszenz des einzigen Tryptophanrestes der Nuclease (lokalisiert in Stellung 140 im (50–149)-Fragment), die bei Zugabe des nativen (6–49)-Fragments auftritt, auch dann zu beobachten war, wenn stattdessen das synthetische (6 bis 47)-Peptid zugegeben wurde, das, wie oben beschrieben, über die halbsynthetische Nuclease T hergestellt und gereinigt worden war (Abb. 6).

Die Entbehrlichkeit oder Ersetzbarkeit einiger Reste für die Stabilität des Nuclease-T-Komplexes wurde bei einer großen Anzahl von halbsynthetischen Analogen durch Prüfung der Fluoreszenz, der Aktivität und der Stabilität ge-

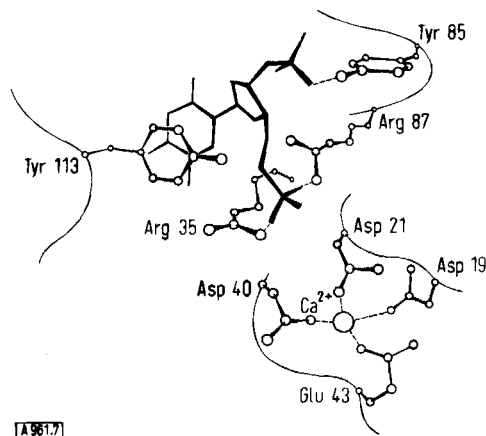


Abb. 7. Aminosäurereste in der Sequenz der Nuclease, die für die katalytische Aktivität und für die Bindung von Substrat und Calcium-Ionen besonders wichtig sind [42].

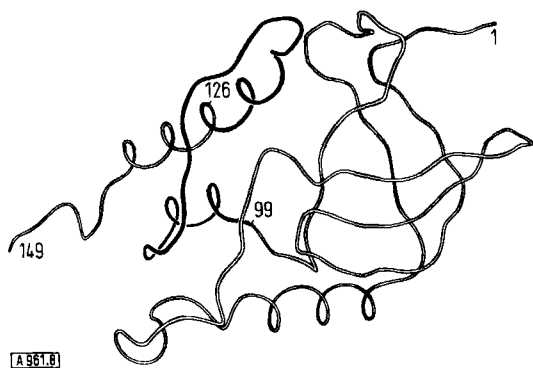


Abb. 8. Schematische Wiedergabe der dreidimensionalen Struktur von Staphylococcus-Nuclease [37b].

genüber enzymatischer Hydrolyse bewiesen<sup>[42]</sup>. Wie in Abbildung 7 veranschaulicht, ist für die Wechselwirkung mit Calcium-Ionen, die für die Nucleaseaktivität normalerweise erforderlich sind, die Beteiligung von vier Aminodicarbonsäuren nötig. Obwohl die *Aktivität* der Komplexe mit synthetischen (6–47)-Fragmenten, in denen man einen Aminosäurerest durch einen Asparagin- oder Glutaminrest ersetzt hatte, aufgehoben war (mit einer partiellen Ausnahme – Asparagin in Position 40), blieben die dreidimensionale Struktur und die Komplexstabilität in den meisten Fällen erhalten. In ähnlicher Weise ergab die Substitution des Argininrestes 35 durch Lysin einen inaktiven Komplex, der aber trotzdem in seiner dreidimensionalen Struktur eine große Ähnlichkeit mit nativer Nuclease T aufwies. Eine zweite Art sich ergänzender Systeme von Nucleasefragmenten<sup>[31]</sup> besteht aus dem tryptischen Fragment (1 bis 126) und einem teilweise überlappenden Abschnitt der Sequenz (99–149), der durch Bromcyanbehandlung des nativen Moleküls hergestellt worden war (schematisch dargestellt in Abb. 8). Diese beiden Peptide bilden einen Komplex mit etwa 15% der Aktivität der Nuclease selbst; dieser ist in Gegenwart von pdTp und Calcium-Ionen gegenüber einer Hydrolyse durch Trypsin bemerkenswert widerstandsfähig. Es können daher viele der überlappenden Reste im Komplex (1–126); (99–149) unter Bildung eines Derivats (1–126); (111–149) weggeschnitten werden. Der weitere Abbau jeder dieser beiden Komponenten, der ersten mit den Carboxypeptidasen A und B, der zweiten mit Leucinaminopeptidase, erlaubt die Herstellung von (1–124); (114–149), das so aktiv und strukturell der nativen Nuclease so ähnlich ist (nachgewiesen durch Bestimmung der hydrodynamischen, spektralen und helicalen Eigenschaften) wie der nicht abgebaute Ausgangskomplex. Es wurde eine Anzahl von synthetischen Analogen der (114 bis 149)-Sequenz hergestellt<sup>[43]</sup>, die ebenfalls Aktivität und „native“ physikalische Eigenschaften aufweisen, wenn sie zu (1–126) gegeben werden. Ich möchte später darauf eingehen, wie die komplexierenden Fragmente bei der Planung von Experimenten zum Studium der Vorgänge bei der Keimbildung und Faltung von Polypeptidketten von Nutzen waren.

### Die Veränderlichkeit der Information für die Kettenfaltung

Die biologische Funktion scheint stärker durch die Geometrie als durch die chemischen Details eines Makromoleküls

erfüllt zu werden. Die klassischen chemischen und kristallographischen Arbeiten über eine große Anzahl anomaler menschlicher Hämoglobine, von Speziesvarianten von Cytochrom c und von anderen Proteinen aus vielen Ausgangsmaterialien sowie die Isolierung von zahlreichen bakteriellen Proteinen nach Mutation der korrespondierenden Gene haben recht deutlich gezeigt, daß Proteinsequenzen beträchtlich modifiziert werden können, ohne daß damit ein Verlust der Funktion einhergeht. Soweit kristallographische Arbeiten an der dreidimensionalen Struktur ausgeführt worden sind, zeigen die Ergebnisse, daß das geometrische Problem des „Entwerfens“ von Molekülen, die einem bestimmten funktionellen Bedarf dienen, durch natürliche Selektion auf vielen Wegen gelöst werden kann. Nur die *Geometrie* des Proteins und seines aktiven Zentrums muß bewahrt bleiben, außerdem natürlich die Reste, die tatsächlich in unnachahmlicher Weise am katalytischen oder regulatorischen Mechanismus teilnehmen<sup>[44]</sup>. Arbeiten an Modellsystemen haben zu ähnlichen Schlüssen geführt. In unseren Arbeiten über Ribonuclease wurde z. B. gezeigt, daß ziemlich lange Ketten von Poly-D,L-alanin an acht der elf Aminogruppen des Enzyms angebracht werden können, ohne daß ein Verlust der enzymatischen Aktivität eintritt<sup>[45]</sup>. Weiterhin konnte das polyalanylierte Enzym durch Reduktion der vier Disulfidbrücken in 8 M Harnstoff in eine gestreckte Kette umgewandelt werden; dieses völlig denaturierte Material ließ sich dann reoxidieren und ergab das aktive, richtig gefaltete Ausgangsmaterial. Die Chemie des Proteins konnte also weitgehend modifiziert werden, und seine Fähigkeit zur Rückfaltung nach der Denaturierung schien nur von *inneren* Resten abhängig zu sein und nicht von solchen, die an der Oberfläche des Proteins dem Lösungsmittel ausgesetzt waren. Dies ist natürlich genau die Schlußfolgerung, die auch *Perutz* und seine Kollegen<sup>[46]</sup> sowie andere Autoren<sup>[47]</sup> zogen, die Daten von verschiedenen Proteinsystemen gesammelt und miteinander in Beziehung gesetzt haben. Der Mutation und der natürlichen Selektion werden bei der Entwicklung der Arten oder bei zufälligen Mutationen ein hoher Freiheitsgrad zugestanden, doch müssen einige Aminosäurereste, die dazu bestimmt sind, den inneren hydrophoben Kern von Proteinen aufzubauen, sorgfältig bewahrt werden (oder dürfen höchstens durch andere Reste mit sehr ähnlicher Raumerfüllung und Hydrophobie ersetzt werden).

### Die für Faltung und Stabilität von Proteinen notwendige Kooperativität

Die Beispiele von nicht kovalenter Wechselwirkung einander ergänzender Proteinfragmente, von denen oben die Rede war, stützen die Vorstellung von der Wichtigkeit kooperativer Wechselwirkungen für die Stabilität von Proteinstrukturen. Wie bei den grundlegenden Regeln der Sprachen ergibt ein unvollständiger Satz auch hier häufig nur Unsinn. Es scheint ein sehr fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen stabilen nativen Proteinstrukturen und zufälligen, biologisch bedeutungslosen Polypeptidketten zu bestehen.

Ein sehr gutes Beispiel für die Unzulänglichkeit einer unvollständigen Sequenz erbrachten unsere Beobachtungen am Nucleasefragment (1–126). Dieses Fragment enthält

alle Reste, die das aktive Zentrum der Nuclease bilden. Trotzdem zeigt dieses Fragment, das ungefähr 85% der gesamten Sequenz der Nuclease enthält, nur ungefähr 0.12% der Aktivität des nativen Enzyms<sup>[48]</sup>. Die weitere Anknüpfung von 23 Resten während der Biosynthese oder die Zugabe der Reste (99–149) *in vitro* als komplementierendes Fragment<sup>[31]</sup> stellt bei diesem unvollständigen Produkt einer Gentranslation die Stabilität, die für die Aktivität benötigt wird, wieder her.

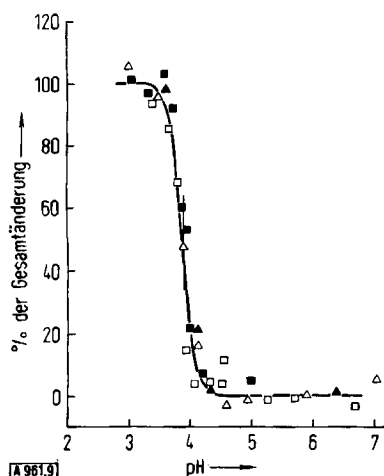


Abb. 9. Änderungen der reduzierten Viskosität und der molaren Elliptizität bei 220 nm während des säurekatalysierten Überganges von nativer zu denaturierter Nuclease. □ und ■, reduzierte Viskosität, Δ und ▲, molare Elliptizität bei 220 nm. □ und Δ, Messungen während der Zugabe von Säure; ■ und ▲, Messungen während der Zugabe von Base. (A. N. Schlechter, H. F. Epstein und C. B. Anfinsen, unveröffentlichte Ergebnisse.)

Der Übergang vom unvollständigen, inaktiven Enzym mit einer Zufallsstruktur zum aktiven Enzym mit sinnvoller und stabiler Struktur ist offenbar sehr fein ausgewogen. Die Schärfe dieses Übergangs geht aus Versuchen der Art, wie sie in Abbildung 9 gezeigt wird, hervor. Die Nuclease macht einen plötzlichen Übergang von einem nativen, globulären Protein zu einem statistisch desorientierten Polypeptid während eines sehr kleinen pH-Bereichs durch, dessen Zentrum bei  $\text{pH}=3.9$  liegt. Der Übergang sieht wie ein „Zweizustandsvorgang“ aus – entweder alles nativ oder alles denaturiert – und tatsächlich geht die klassische mathematische Behandlung solcher Daten von einem Zweizustandsprozeß aus. Es war jedoch möglich, durch NMR- und spektrophotometrische Versuche<sup>[49, 50]</sup> zu zeigen, daß in Wirklichkeit einer der vier Histidin- und einer der sieben Tyrosinreste in der Nuclease vor dem allgemeinen und plötzlichen Zusammenbruch der organisierten Struktur desorientiert werden. Solche Hinweise für eine stufenweise Denaturierung und Renaturierung sind jedoch sicherlich nicht typisch für die Masse der kooperativ stabilisierten Moleküle.

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse von Messungen der Viskosität und des vom Helixgehalt abhängigen Circular dichroismus sind typisch für die meisten Proteine. Bei der Nuclease ist nicht nur der Übergang vom nativen zum denaturierten Molekül während der pH-Änderung von 3.2 auf 6.7 sehr scharf, sondern auch der Prozeß der Renaturierung erfordert nur eine sehr kurze Zeitspanne.

Ich möchte diese kinetischen Stop-Flow-Versuche<sup>[50]</sup> hier nicht im einzelnen diskutieren, sondern mich kurz fassen. Man kann zeigen, daß der Vorgang in zwei Phasen stattfindet: Einer anfänglichen schnellen Keimbildung und Faltung mit einer Halbwertszeit von etwa 50 Millisekunden folgt eine zweite, etwas langsamere Umwandlung mit einer Halbwertszeit von etwa 200 Millisekunden. Die erste Phase ist völlig temperaturunabhängig (und daher wahrscheinlich entropiegetrieben), die zweite ist temperaturabhängig.

## Keimbildung der Faltung

Eine Kette von 149 Aminosäureresten mit zwei rotationsfähigen Bindungen pro Rest und mit zwei bis drei erlaubten oder begünstigten Orientierungen pro Bindung sollte in der Größenordnung von  $4^{149}$  bis  $9^{149}$  Konformationen in Lösung einnehmen können. Wegen der extremen Geschwindigkeit der Rückfaltung muß sich der Prozeß jedoch innerhalb einer begrenzten Anzahl von „Reaktionswegen“ abspielen, selbst wenn die Statistik durch stereochemische Grundregeln nach Art des „Ramachandran-Diagramms“ stark eingeschränkt ist. Es ist daher notwendig, die Existenz einer nur begrenzten Zahl von erlaubten Anfangsereignissen im Faltungsprozeß zu fordern. Solche Vorgänge, allgemein als Keimbildung bezeichnet, finden wahrscheinlich in den Teilen der Polypeptidkette statt, die an Konformationsgleichgewichten zwischen statistischer und kooperativ stabilisierter Anordnung teilnehmen können. Die Notwendigkeit einer kooperativen Stabilisierung ist sehr wahrscheinlich, da man nicht erwarten kann, daß in wäßriger Lösung ionische Wechselwirkungen oder solche durch Wasserstoffbrücken wirkungsvoll mit den Wechselwirkungen der Lösungsmittelmoleküle konkurrieren können, und alles, was kleiner als ein ansehnlicher Keim von miteinander in Wechselwirkung stehenden Aminosäureseitenketten ist, würde wahrscheinlich nur eine sehr kurze Lebensdauer haben. Weiterhin ist es wichtig zu betonen, daß die Aminosäuresequenzen von Polypeptidketten, die als Material für Proteinmoleküle gedacht sind, nur dann einen funktionellen Sinn haben, wenn sie sich in der gleichen dreidimensionalen Anordnung wie in der nativen Proteinstruktur befinden. Die Annahme scheint vernünftig zu sein, daß als Keimbildungsstellen diejenigen Teile eines Proteins dienen werden, die um die Konformation, die sie im fertigen Protein einnehmen, „herumflattern“ können, und daß sie dann eine relativ starre Struktur bilden, die durch eine Reihe kooperativer Wechselwirkungen stabilisiert ist. Man könnte erwarten, daß diese Keimbildungszentren in ihrem „nativen Format“ (Abb. 10) solche potentiell vorgegebenen Unterstrukturen wie Helices, Faltblattstrukturen oder Beta-Bögen enthalten.

Leider kann man mit Methoden, die auf hydrodynamischen oder spektralen Messungen beruhen, diese seltenen und nur vorübergehenden Keimbildungen nicht entdecken. Um die geforderten „flatternden“ Gleichgewichte nachzuweisen und ihre wahrscheinliche Lebensdauer in der Lösung zu bestimmen, braucht man indirekte Methoden, die das kurzzeitige Auftreten einzelner Moleküle im „nativen Format“ in der untersuchten Population anzeigen. Eine derartige Methode, die kürzlich bei der Untersuchung der Faltung

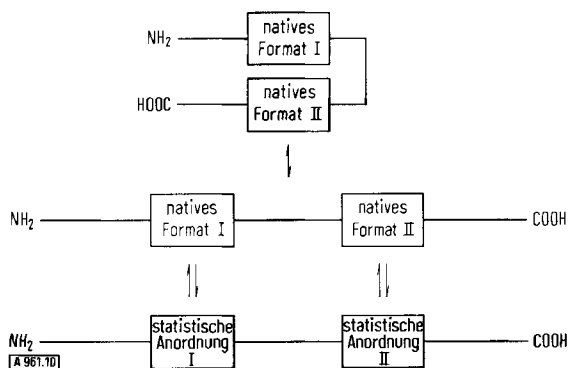


Abb. 10. Faltungsmöglichkeiten für Proteinketten. (Die Diskussion dieses ziemlich wahrscheinlichen, aber subjektiven Vorschlags findet sich im Text.)

von Staphylococcus-Nuclease und ihren Fragmenten in unserem Laboratorium benutzt worden ist, bedient sich der Antikörper, die gegen bestimmte Abschnitte der Aminosäuresequenz spezifisch sind<sup>[51]</sup>.

Abbildung 8 zeigt die dreidimensionale Struktur, welche die Staphylococcus-Nuclease vermutlich in Lösung einnimmt. Die Stellen, an denen eine organisierte Struktur vorliegt, sind die dreisträngigen antiparallelen Faltblattstrukturen, die sich ungefähr zwischen den Resten 12 und 35, und die  $\alpha$ -helicalen Regionen, die sich zwischen den Resten 54 und 67, 99 und 106 sowie 121 und 134 befinden. Antikörper gegen bestimmte Regionen des Nucleasemoleküls wurden hergestellt durch Immunisierung von Ziegen mit den jeweiligen Polypeptidfragmenten des Enzyms oder durch Injektion des intakten nativen Proteins mit anschließender Fraktionierung der resultierenden Antikörperpopulation auf Affinitätschromatographiesäulen. Diese bestanden aus Agarose, die kovalent gebunden das jeweils untersuchte Peptidfragment enthielt<sup>[52, 53]</sup>. Nach der ersten Methode wurde z. B. ein Antikörper hergestellt, der gegen das Polypeptid aus den Resten (99–149) gerichtet war, von dem man weiß, daß es in Lösung als statistisch gefaltete Kette ohne die ausgedehnten Helix-Anteile vorliegt, die diesen Teil der Nuclease innerhalb des intakten Gesamtmo-

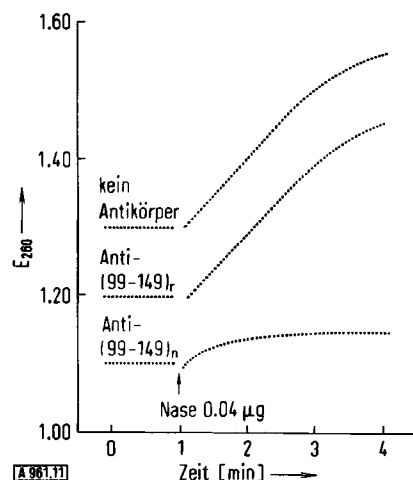


Abb. 11. Hemmung der Nuclease-Aktivität durch das Anti-[Fragment (99–149)<sub>n</sub>] und Ausbleiben einer Hemmung durch das Anti-[Fragment (99–149)<sub>r</sub>], das gegen das Peptid (99–149), vermutlich in seiner statistischen, ungeordneten Konformation, hergestellt worden war (D. H. Sachs, A. N. Schechter, A. Eastlake und C. B. Anfinsen, unveröffentlicht) [51].

leküls auszeichnen. Solch ein Antikörperpräparat bezeichnen wir als Anti-(99–149)<sub>r</sub>, wobei der Index r den statistischen (random) Zustand des Antigens kennzeichnet. Die anschließende Chromatographie dieser Antikörperpopulation auf einer zweiten Affinitätsäule, die aus Agarose mit den Resten (127–149) bestand, ergab eine nicht ausfällbare einwertige Immunglobulinfraktion, die spezifisch für die Nucleasesequenz (99–126) war.

Wenn andererseits eine Fraktion des Antiserums gegen native Nuclease, die auf einer Agarose-Nuclease-Säule isoliert worden war, auf Agarose-(99–149) weiterfraktioniert wurde, so resultierte eine Fraktion, die für die Sequenz (99–149) spezifisch war, aber vermutlich nur, wenn dieses Stück der Sequenz das „native Format“ einnahm. Dieser Schluß gründet sich auf die Beobachtung, daß diese Anti-(99–149)<sub>n</sub> genannte Fraktion (der Index n kennzeichnet das „native Format“) die enzymatische Aktivität der Nuclease stark hemmt, während Anti-(99–126)<sub>r</sub> oder Anti-(99 bis 149)<sub>r</sub> das nicht tun (s. Abb. 11). Er stützt sich ferner auf die Beobachtung, daß die konformationsstabilisierenden Liganden pdTp und Calcium-Ionen die Präzipitierbarkeit der Nuclease durch Anti-(1–126)<sub>r</sub> und Anti-(99–149)<sub>r</sub> beträchtlich inhibieren, aber kaum, wenn überhaupt, die Präzipitierbarkeit durch Anti-(1–149)<sub>n</sub> beeinflussen<sup>[51]</sup>. Diese Befunde gaben dem Gedanken neue Nahrung, daß viele Antigen determinanten, die von Antikörpern gegen Fragmente erkannt werden, nur in aufgefalteten oder nicht nativen Konformationen in der Nuclease vorhanden sind. Die Reaktion zwischen Anti-(99–149) und Nuclease ist, wie die gemessenen Änderungen in der Kinetik der Inhibition der Enzymaktivität (Abb. 12) zeigten, extrem schnell. K<sub>off</sub> dagegen ist so klein, daß man es vernachlässigen kann.

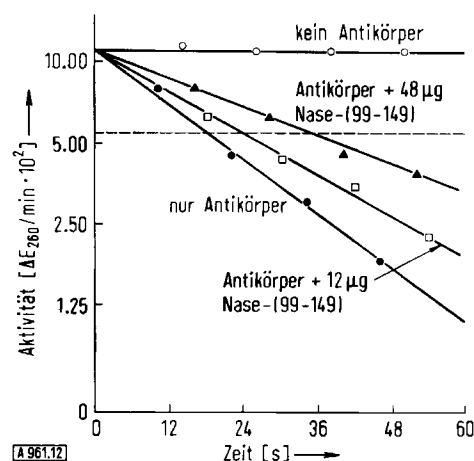


Abb. 12. Halblogarithmische Auftragung der Aktivität gegen die Zeit für die Bestimmung von 0.05 µg Nuclease in Gegenwart von: ○—○ keinem Antikörper; ●—● 6 µg Anti-(99–126)<sub>n</sub>; □—□ 6 µg Anti-(99 bis 126)<sub>n</sub> + 12 µg (99–149); ▲—▲ 6 µg Anti-(99–126)<sub>n</sub> + 48 µg (99–149). Die gestrichelte Linie gibt die halbe Anfangsgeschwindigkeit wieder.

Das System kann durch zwei simultane Gleichgewichte beschrieben werden. Das erste betrifft das „Flattern“ des Fragments (99–149), das wir „P“ nennen wollen, zwischen statistischem und nativem „Format“, das zweite die Assoziation von Anti-(99–149)<sub>n</sub>, das wir einfach „Ab“ nennen wollen, mit dem Fragment P in seinem nativen Format (P<sub>n</sub>):



$$P_r \rightleftharpoons P_n \quad K_{\text{konf.}} = \frac{[P_n]}{[P_r]}$$

$$Ab + P_n \rightleftharpoons AbP_n \quad K_{\text{ass.}} = \frac{[AbP_n]}{[Ab] \cdot [P_n]}$$

$$K_{\text{konf.}} = \frac{[AbP_n]}{K_{\text{ass.}} \cdot [Ab] \cdot [P_r]}$$

Gleichgewichte mit den dazugehörigen Gleichgewichtskonstanten, an denen das Fragment (99–149) der Nuclease teilnimmt.

Die Menge des nicht gebundenen Antikörpers im zweiten Gleichgewicht kann man aus Messungen der Inaktivierungskinetik der Hydrolyse des denaturierten DNA-Substrats bestimmen, und zwar durch Zugabe einer Standardmenge von Nuclease zum präinkubierten Gemisch aus Fragment (99–149) und Anti-(99–149)<sub>n</sub>. Unter der Voraussetzung, daß die Affinität von Anti-(99–149)<sub>n</sub> für (99–149)<sub>n</sub> genau so groß ist wie für die native Nuclease, und da man weiß, daß K<sub>konf.</sub> im ersten Gleichgewicht klein ist, kann der Wert für den Term K<sub>konf.</sub> durch meßbare Parameter beschrieben werden. Eine Reihe typischer Werte, die in Tabelle 1 gezeigt werden, läßt vermuten, daß ungefähr

Tabelle 1. Untersuchung des Gleichgewichts zwischen dem Peptidfragment (99–149) in seiner statistischen Form [Fragment (99–149)<sub>n</sub>] und der Form, die dieses Fragment innerhalb der nativen Struktur der Nuclease annimmt [Fragment (99–149)<sub>n</sub>]. Abkürzungen: P = Fragment (99–149); Ab = Antikörper; [P<sub>r</sub>] = Gesamt-Konzentration von P.

$$K_{\text{konf.}} = \frac{[AbP_n]}{K_{\text{ass.}} \cdot [Ab] \cdot [P_r]}$$

[Ab] <sub>gesamt</sub> [μmol/l]	[P <sub>r</sub> ] [μmol/l]	t <sub>1/2</sub> [s]	[Ab] <sub>frei</sub> [μmol/l]	[Ab] <sub>gebunden</sub> [μmol/l]	K <sub>konf.</sub>	% von P <sub>r</sub> als P <sub>n</sub>
0.076	0	18	0.076	0		
0.076	0.65	20	0.068	0.0080	2.20 × 10 <sup>−4</sup>	0.022
0.076	2.0	24	0.057	0.019	2.02 × 10 <sup>−4</sup>	0.020
0.076	2.6	27	0.051	0.025	2.29 × 10 <sup>−4</sup>	0.023
0.076	7.8	35	0.039	0.037	1.47 × 10 <sup>−4</sup>	0.015
0.076	6.5	33	0.042	0.034	1.51 × 10 <sup>−4</sup>	0.015

$$K_{\text{konf.}} = (2.0 \pm 0.4) \times 10^{-4}$$

0.02% des Fragments (99–149) zu jedem gegebenen Zeitpunkt im nativen „Format“ existieren. Obwohl dieser Wert niedrig zu sein scheint, ist er im Vergleich mit der Wahrscheinlichkeit, daß ein Peptidfragment eines Proteins sich lediglich zufällig im nativen Format befindet, sehr groß. Empirische Betrachtungen der großen Datenmenge, die heute über die Beziehungen zwischen Sequenz und dreidimensionaler Struktur vorliegen<sup>[54]</sup>, im Verein mit einer zunehmend verfeinerten theoretischen Behandlung der Energieverhältnisse bei der Faltung von Polypeptidketten<sup>[55]</sup>, lassen die Möglichkeit einer a-priori-Voraussage über Proteinkonformationen immer näher rücken. Es ist sicher, daß wesentliche Fortschritte im Verständnis der zellulären Organisation, der Ursachen für Anomalien und der Kontrolle dieser Anomalien erreicht werden können, wenn wir die Folgen einer genetischen Information für den dreidimensionalen Phänotyp voraussagen können.

Eingegangen am 16. Februar 1973 [A 961]  
Übersetzt von Dr. Harold Rüdiger, Köln

- [1] M. L. Anson, *Advan. Protein Chem.* 2, 361 (1945).
- [2] R. Lumry u. H. Eyring, *J. Phys. Chem.* 58, 110 (1954).
- [3] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 235, 633 (1960).

- [4] J. T. Potts, A. Berger, J. Cooke u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 237, 1851 (1962).
- [5] D. G. Smyth, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 238, 227 (1963).
- [6] M. Sela, F. H. White u. C. B. Anfinsen, *Science* 125, 691 (1957).
- [7] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 246, 1922 (1971).
- [8] R. Hirschman, R. F. Nutt, D. F. Veber, R. A. Vitali, S. L. Varga, T. A. Jacob, F. W. Holly u. R. G. Denkwalter, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 507 (1969).
- [9] F. H. White, Jr., u. C. B. Anfinsen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 81, 515 (1959).
- [10] F. H. White, Jr., *J. Biol. Chem.* 236, 1353 (1961).
- [11] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela u. F. H. White, Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 1309 (1961).
- [12] E. Haber u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 237, 1839 (1962).
- [13] C. J. Epstein, R. F. Goldberger u. C. B. Anfinsen, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 439 (1963).
- [14] H. M. Dintzis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 247 (1961).
- [15] R. E. Canfield u. C. B. Anfinsen, *Biochemistry* 2, 1073 (1963).
- [16] R. F. Goldberger, C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 238, 628 (1963).
- [17] P. Venetianer u. F. B. Straub, *Biochim. Biophys. Acta* 67, 166 (1963).
- [18] S. Fuchs, F. DeLorenzo u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 242, 398 (1967).

- [19] F. DeLorenzo, R. F. Goldberger, E. Steers, D. Givol u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 241, 1562 (1966).
- [20] I. Kato u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 244, 5849 (1969).
- [21] D. Givol, F. DeLorenzo, R. F. Goldberger u. C. B. Anfinsen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 766 (1965).
- [22] D. F. Steiner, *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser. II* 30, 60 (1967).
- [23] C. B. Anfinsen, *Develop. Biol. Suppl.* 2, 1 (1968).
- [24] F. M. Richards, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 44, 162 (1958).
- [25] H. Taniuchi, C. B. Anfinsen u. A. Sodja, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1235 (1967).
- [26] I. Kato u. N. Tominaga, *FEBS Lett.* 10, 313 (1970).
- [27] H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou, A. W. Hanson, J. R. Knox, B. Lee u. F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 245, 305 (1970).
- [28] K. Hofmann, F. M. Finn, M. Linetti, J. Montibeller u. G. Zanetti, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 3633 (1966).
- [29] E. Scoffone, R. Rocchi, F. Marchiori, L. Moroder, A. Marzotto u. A. M. Tamburro, *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5450 (1967).
- [30] J. T. Potts, Jr., D. M. Young u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 238, 2593 (1963).
- [31] H. Taniuchi u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 246, 2291 (1971).
- [32] J. L. Cone, C. L. Cusumano, H. Taniuchi u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 246, 3103 (1971).
- [33] J. L. Bohnert u. H. Taniuchi, *J. Biol. Chem.* 247, 4557 (1972).
- [34] A. N. Schechter, L. Moravsek u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 244, 4981 (1969).
- [35] H. Taniuchi, L. Moravsek u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 244, 4600 (1969).

- [36] H. Taniuchi u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 244, 3864 (1969).
- [37] a) H. Taniuchi, D. Davies u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 247, 3362 (1972); b) A. Arnone, C. J. Bier, F. A. Cotton, E. E. Hazen, Jr., D. C. Richardson, J. S. Richardson u. A. Yonath, J. Biol. Chem. 246, 2302 (1971).
- [38] G. R. Sanchez, I. M. Chaiken u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 1973, im Druck.
- [39] D. Ontjes u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 244, 6316 (1969).
- [40] R. B. Merrifield, Science 150, 178 (1965).
- [41] I. M. Chaiken, J. Biol. Chem. 246, 2948 (1971).
- [42] I. M. Chaiken u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 246, 2285 (1971).
- [43] I. Parikh, L. Corley u. C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 246, 7392 (1971).
- [44] W. M. Fitch u. E. Margoliash, Evol. Biol. 4, 67 (1970).
- [45] J. P. Cooke, C. B. Anfinsen u. M. Sela, J. Biol. Chem. 238, 2034 (1963).
- [46] M. F. Perutz, J. C. Kendrew u. H. C. Watson, J. Mol. Biol. 13, 669 (1965).
- [47] C. J. Epstein, Nature 210, 25 (1966).
- [48] D. Sachs, H. Taniuchi, A. N. Schechter u. A. Eastlake, unveröffentlichte Arbeiten.
- [49] H. Epstein, A. N. Schechter u. J. Cohen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2042 (1971).
- [50] H. F. Epstein, A. N. Schechter, R. F. Chen u. C. B. Anfinsen, J. Mol. Biol. 60, 499 (1971).
- [51] D. H. Sachs, A. N. Schechter, A. Eastlake u. C. B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3790 (1972).
- [52] D. H. Sachs, A. N. Schechter, A. Eastlake u. C. B. Anfinsen, J. Immunol. 109, 1300 (1972).
- [53] D. H. Sachs, A. N. Schechter, A. Eastlake u. C. B. Anfinsen, Biochemistry 11, 4268 (1972).
- [54] C. B. Anfinsen u. H. Scheraga, Advan. Protein Chem., im Druck.
- [55] H. A. Scheraga, Chem. Rev. 71, 195 (1971).

## Die chemische Struktur der Pankreas-Ribonuclease und -Desoxyribonuclease (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Stanford Moore und William H. Stein<sup>[\*]</sup>

### Einleitung

Die Ergebnisse, die wir bei unseren Versuchen an zwei Enzymen erhalten haben, sind typisch für viele Enzyme, wie wir gleich zu Beginn dieses Vortrags betonen möchten. Um die Vielzahl der Reaktionen von Proteinen in lebenden Zellen zu verstehen, muß man die Molekülarchitektur möglichst vieler Proteine verschiedenen Ursprungs und verschiedener Funktion kennen. Derartige Informationen werden in Laboratorien überall in der Welt durch die Erfahrung vieler Forscher zusammengetragen. Diese Kenntnisse sind für den Fortschritt der medizinischen Forschung von fundamentalem Wert; die diesjährigen Nobel-Preise sowohl für Chemie (für Arbeiten über die Ribonuclease) als auch für Physiologie oder Medizin (für Arbeiten über Antikörper) wurden für grundlegende Forschungen über Chemie und Biologie von Proteinen vergeben.

Im Rahmen eines Übersichtsartikels<sup>[1]</sup> hielten wir es einmal für sehr instruktiv, die Strukturformel der Ribonuclease mit ihren 1876 C-, H-, N-, O- und S-Atomen voll auszu-schreiben. Eine Darstellung des gesamten Moleküls mit allen Atomen der Amino-, Carboxy-, Hydroxy- und Guanidogruppen, Imidazolringe, phenolischen Gruppen, Indolringe, aromatischen, aliphatischen und Thioäther-Seitenketten, Thiolgruppen und Disulfidbrücken hilft mit, die so gut wie unbegrenzte Zahl der Möglichkeiten, wie sich solche Gruppen anordnen lassen, zu veranschaulichen.

[\*] Prof. Dr. S. Moore und Prof. Dr. H. Stein  
The Rockefeller University  
New York, N. Y. 10021 (USA)  
Kombinierter Text der Nobel-Vorträge von Prof. Dr. S. Moore und Prof. Dr. H. Stein

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1973. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Diese Eigenart der Proteine macht es der Natur möglich, Katalysatoren für sehr viele spezifische Reaktionen zu entwerfen. Es gibt kein Gesetz, welches besagt, daß eine Nucleinsäure oder ein Polysaccharid kein Enzym sein könnte, aber man kann verstehen, daß sich die bisher isolierten Enzyme als Proteine erwiesen; ein Protein ist, manchmal durch das Zusammenwirken mit Coenzymen, dafür ausgerüstet, am gesamten Katalog der organischen Reaktionen teilzunehmen, die in der lebenden Zelle der Katalyse bedürfen.

### Reinigung der Ribonuclease

Der erste Schritt bei der Untersuchung der Struktur der Ribonuclease war natürlich ihre Reinigung. Ribonuclease wurde zuerst 1920 von Jones<sup>[2]</sup> beschrieben, der zeigte, daß im Rinderpankreas ein relativ hitzestabiles Enzym vorkommt, welches Hefe-Nucleinsäure hydrolysieren konnte. Dubos und Thompson<sup>[3]</sup> gelang etwa 18 Jahre später eine partielle Reinigung des Enzyms, 1940 beschrieb Kunitz<sup>[4]</sup> die Isolierung von kristalliner Rinderpankreas-Ribonuclease, die durch fraktionierende Fällung mit Ammoniumsulfat gewonnen worden war. Um nach Möglichkeit sicher zu sein, daß wir die Strukturuntersuchungen mit einer einzigen Molekülspezies begannen, nutzten wir die Trennfähigkeit der Ionenaustauschchromatographie aus (Abb. 1). Während Werner Hirs in unserem Laboratorium die chromatographische Reinigung der Ribonuclease auf dem Polymethacrylsäure-Harz Amberlite IRC 50 erprobte<sup>[5,6]</sup>, befaßten sich Palés und Neilands<sup>[7]</sup> in Stockholm mit der Reinigung von Cytochrom c auf demselben Austauscher. Die beiden Proteine waren die ersten derartig großen