

- [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 auszuschreiben. 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.

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 hydrolysierten 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 Paléus und Neilands<sup>[7]</sup> in Stockholm mit der Reinigung von Cytochrom c auf demselben Austauscher. Die beiden Proteine waren die ersten derart großen

[\*] 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.

Moleküle, die auf diese Weise gereinigt wurden. Die beste Reinigung der Ribonuclease (Abb. 2) erzielt man heute<sup>[18]</sup> mit einem in Uppsala erfundenen Austauscher, einem quervernetzten Sulfoäthylxextran, das nach *Porath* und *Florens*<sup>[19]</sup> Versuchen über die Gelfiltration und *Sobers* und *Petersons*<sup>[20]</sup> Empfehlungen über die Vorteile einer Kohlenhydratmatrix für den Austauscher entwickelt wurde.

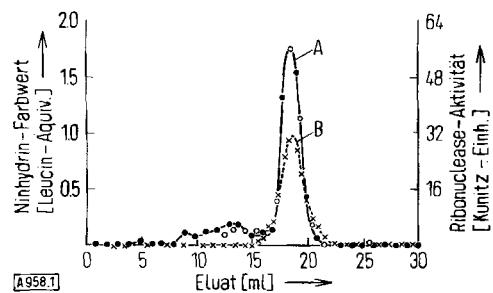


Abb. 1. Chromatographie von kristalliner Rinderpankreas-Ribonuclease (Kurve A) auf dem Polymethacrylsäure-Harz Amberlite IRC-50. Elutionsmittel 0.2 M Natriumphosphat-Puffer, pH=6.45. Kurve B wurde bei Rechromatographie des Materials von A erhalten (aus [5]).

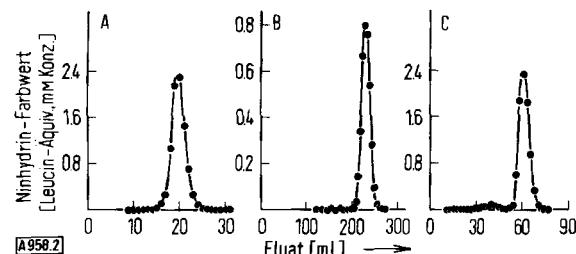


Abb. 2. Verhalten von Ribonuclease, die auf Amberlite IRC-50 gereinigt worden war, auf Amberlite IRC-50 (A), Sephadex G-75 (B) und Sulfoäthyl-Sephadex (C) bei pH=6.5 (aus [8]).

Als wir Pankreasextrakte ohne vorherige Fraktionierung analysierten, beobachteten wir<sup>[6]</sup> bei der Ionenaustausch-chromatographie zwei Maxima mit enzymatischer Aktivität; dasselbe Ergebnis erzielten auch *Martin* und *Porter*<sup>[11]</sup> durch Verteilungschromatographie. Für die ersten Strukturuntersuchungen wurde die Hauptkomponente, Ribonuclease A, ausgewählt. (Bei späteren, unabhängigen Versuchen isolierten *Plummer* und *Hirs*<sup>[12, 13]</sup> Ribonuclease B in reiner Form aus dem Pankreas und zeigten, daß sie die gleiche Zusammensetzung wie Ribonuclease A hat, mit Ausnahme einer Kohlenhydrat-Seitenkette an einem Asparaginrest.

### Aminosäureanalyse

Der zweite Schritt bei der Strukturuntersuchung der Ribonuclease A war die Bestimmung der empirischen Formel des chromatographisch reinen Proteins in Form der Aminosäurezusammensetzung. Ende der dreißiger Jahre fingen wir an, die große Bedeutung der quantitativen Aminosäureanalyse zu erkennen; wir genossen damals den besonderen Vorzug, als junge Doktoren unsere Lehrzeit bei *Max Bergmann* zu beginnen<sup>[14]</sup>. 1945 war es möglich, im Zuge der Wiedergeburt der Chromatographie, die *Martin* und *Syngle*<sup>[15–17]</sup> Anfang der vierziger Jahre bewirkt hatten,

das Problem erneut anzugehen. 1949 konnten wir eine quantitative photometrische Ninhydrinbestimmungsmethode<sup>[18]</sup>, die Elution von Aminosäuren aus Stärkesäulen durch Alkohol-Wasser-Gemische<sup>[19, 20]</sup> und das Auffangen des Eluats in einem automatischen Fraktionensammler<sup>[21]</sup> kombinieren. Indem wir drei derartige Chromatogramme anfertigten, in denen alle sich überlappenden Teile aufgetrennt waren, ließ sich ein Proteinhydrolysat in ungefähr zwei Wochen analysieren. Anfang der fünfziger Jahre wurde der Vorgang durch Überwechseln zur Ionenaustauschchromatographie auf sulfonierten Polystyrol-Harzen bis auf eine Woche beschleunigt (Abb. 3)<sup>[22, 23]</sup>. 1958 wurde der Vorgang in Zusammenarbeit mit *Darrel Spackman*<sup>[25, 26]</sup> bis zu selbsttätig registrierten Kurven automatisiert (Abb. 4 und 5); die Geschwindigkeit wurde außerdem bis auf einen Lauf pro Nacht gesteigert. Kürzere Säulen und höhere Durchflußgeschwindigkeiten<sup>[27]</sup> erlaubten dann eine Analysenzzeit von ungefähr sechs Stunden. Die Arbeit vieler Hochschul- und Industrielaboratorien hat dazu beigetragen, den Vorgang noch einfacher und noch schneller zu machen. Einige Forscher entwickelten in den letzten Jahren ein Zweistunden-System (vgl.<sup>[28]</sup>), weiterhin wurde das

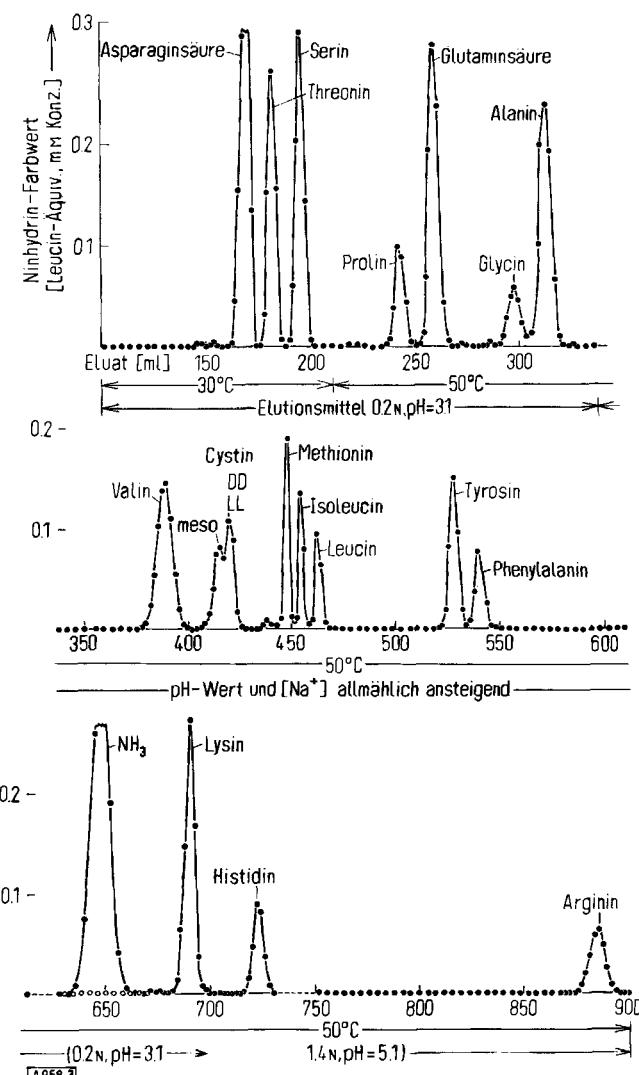


Abb. 3. Die Aminosäuren eines Säurehydrolysat von Ribonuclease A. Die Aminosäuren wurden in einem fünf Tage dauernden Lauf [23] auf einer Säule (150 x 0.9 cm) des sulfonierten Polystyrol-Harzes Dowex 50-X4 getrennt (aus [24]).

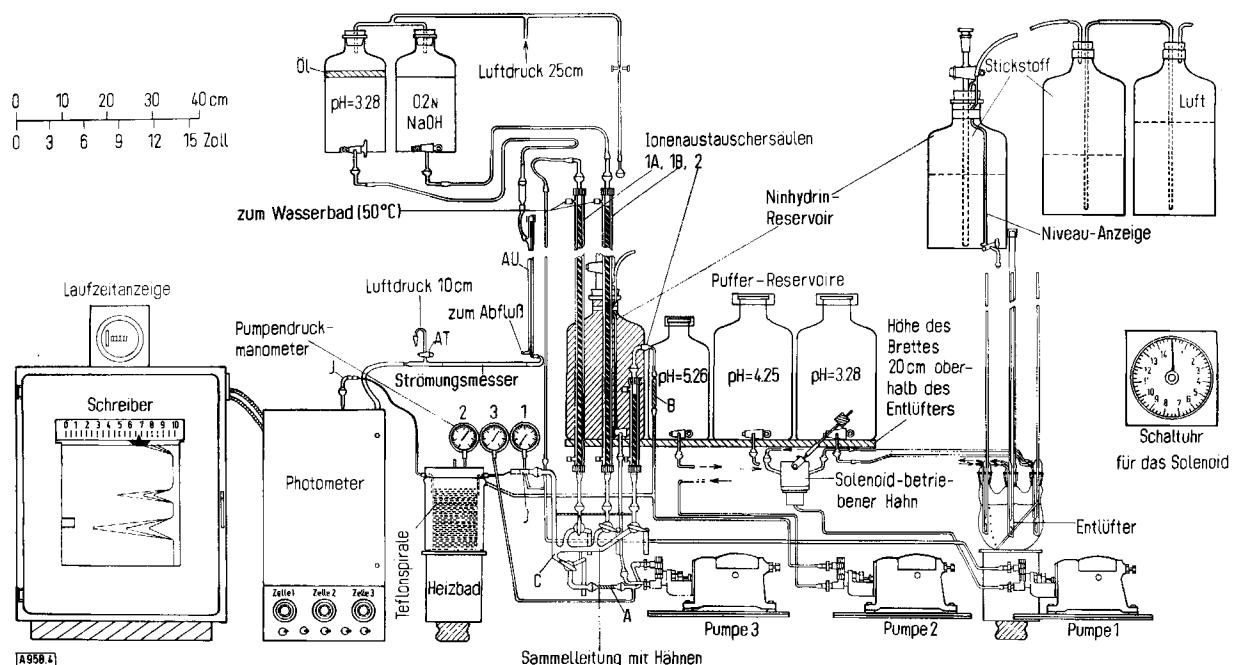


Abb. 4. Schematische Darstellung des automatisch registrierenden Apparates für die chromatographische Analyse von Aminosäuregemischen (aus [26]).

Ninhydrin-Reagens verbessert<sup>[29]</sup>. In den siebziger Jahren haben eine Anzahl von industriell entwickelten Analysatoren mit verstärkter Automation die Zeit für eine vollständige Analyse auf ungefähr eine Stunde herabgesetzt und die Empfindlichkeit bis in den Nanomol-Bereich gesteigert. Der Erfahrungsaustausch zwischen Hochschulwissenschaftlern, Gerätekonstrukteuren und Herstellern von Ionenaustauschern hat eine wichtige Rolle für den Fortschritt der biomedizinischen Forschung dieses Gebietes gespielt.

temperatur ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt, das bereits in extrem niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden kann. Es ist auch durchaus noch möglich, daß die Gaschromatographie von Aminosäurederivaten voll befriedigende Resultate liefern wird.

Die Genauigkeit und Empfindlichkeit der gegenwärtig angewendeten Verfahren für die Aminosäureanalyse sind kürzlich zusammenfassend behandelt worden<sup>[33]</sup>. Die Grundlagenforschung über die quantitative Aminosäu-

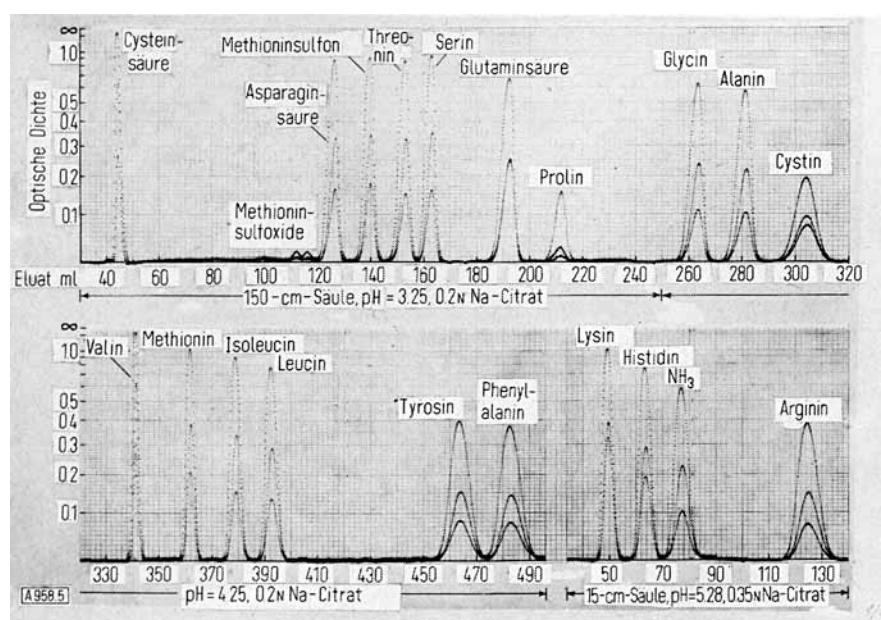


Abb. 5. Chromatographische Analyse eines Aminosäuregemisches, während 22 h mit dem in Abb. 4 gezeigten Gerät automatisch registriert (aus [26]).

Auch 1972 gibt es Entwicklungen, die die Aminosäureanalyse noch weiter in den Ultramikrobereich vorantreiben und ihre Dauer verkürzen werden. Dazu gehört die Einführung eines Ninhydrin-Analogen durch *Udenfriend* und seine Kollegen<sup>[30–32]</sup>; diese Verbindung liefert bei Raum-

reanalyse hat auch Verfahren zur Isolierung von Aminosäuren in präparativem Maßstab<sup>[34, 35]</sup>, zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren<sup>[36, 37]</sup>, zur Analyse von Nahrungsmittelhydrolysaten<sup>[38, 39]</sup> und zur Bestimmung freier Aminosäuren in Blutplasma<sup>[40]</sup>, Harn<sup>[41]</sup> und Säuge-

tiergeweben<sup>[42]</sup> liefert, Gebiete, die den Umfang dieses Vortrags sprengen würden. Besondere Entdeckungen, die aus derartigen Untersuchungen resultierten, sind z. B. die Auffindung von 3-Methylhistidin<sup>[43]</sup> und Tyrosin-O-sulfat<sup>[44]</sup> in menschlichem Harn, Acetylasparaginsäure im Gehirn<sup>[45]</sup> und Cystathionin im menschlichen Gehirn<sup>[46]</sup> durch *Harris Tallan*.

## Struktur der Ribonuclease

Die empirische Formel der Rinderpankreas-Ribonuclease (Tabelle 1), bestimmt mit Hilfe der chromatographischen

Methoden, die während der Strukturuntersuchungen angewandt wurden, erwies sich als die eines Moleküls aus 124 Aminosäureresten. Aus dem bekannten Mechanismus der Proteinbiosynthese und der Angreifbarkeit von Peptidbindungen durch enzymatische Hydrolyse geht hervor, daß alle Reste mit sehr großer Sicherheit die L-Konfiguration besitzen. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 13683. Aufgrund unserer Erfahrungen mit der Aminosäurechromatographie versuchten wir, Säulenmethoden zu entwickeln, die imstande waren, die bei der enzymatischen Hydrolyse von perameisensäure-oxidierten Ribonuclease gebildeten Peptide aufzutrennen<sup>[47]</sup>. Abbildung 6 zeigt ein solches Chromatogramm aus den Versuchen von *Werner Hirs*, der der erste frisch promovierte Mitarbeiter war, der sich

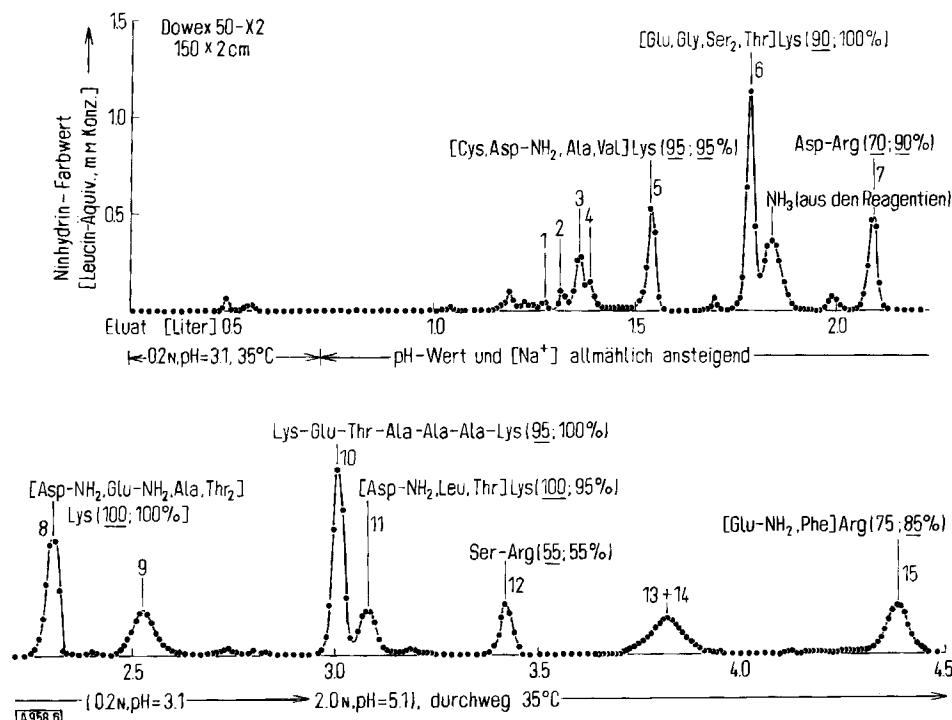


Abb. 6. Chromatographische Trennung der Peptide eines tryptischen Hydrolysats von oxidiertener Ribonuclease A (aus [47]).

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung der Ribonuclease A [47].

Aminosäure	Anzahl der Reste pro Molekül (Molekulargewicht 13683)
Asparaginsäure	15
Glutaminsäure	12
Glycin	3
Alanin	12
Valin	9
Leucin	2
Isoleucin	3
Serin	15
Threonin	10
Halcyctin	8
Methionin	4
Prolin	4
Phenylalanin	3
Tyrosin	6
Histidin	4
Lysin	10
Arginin	4
Summe der Reste	124
Amid-NH <sub>3</sub>	17

unserem Laboratorium anschloß. Fünfzehn junge Mitarbeiter begannen nach ihrem Examen auf dem Gebiet zu arbeiten, über das in diesem Vortrag berichtet wird. Wenn wir ihre Beiträge erwähnen, bedeutet das zugleich, daß wir ihre Ideen, ihre harte Arbeit und den Enthusiasmus anerkennen, der die produktive Forschung erleichtert; jeder dieser Biochemiker hat Teil an der Anerkennung für die hier vorgetragenen Ergebnisse; wir werden ständig von den Ideen dieser selbständigen und fähigen Mitarbeiter angeregt.

*Werner Hirs* erhielt hundertprozentige Ausbeuten an Peptiden, die durch tryptische Hydrolyse vollständig in Freiheit gesetzt wurden, und zwar durch Gradientenelution von Dowex 50-X2. Die Aufklärung der Sequenzen von Aminosäureresten in den Peptiden und das einem Kreuzworträtsel ähnliche Anordnen der Peptide folgte in vielem den Grundsätzen, die *Sanger*<sup>[48]</sup> bei seiner bahnbrechenden Bestimmung der Insulinstruktur aufgestellt hatte. Mit dem größeren Molekül aus 124 Aminosäureresten jedoch waren quan-

titative Methoden bei der Interpretation der Ergebnisse besonders wertvoll. Als chemische Schlüsselmethode bei Untersuchungen von Molekülen dieser Größe erwies sich die sequentielle Abbaumethode, die *Per Edman*<sup>[49]</sup> mit Phenylisothiocyanat als Reagens entwickelt hatte. Statt jedoch die resultierenden Phenylthiohydantoin zu bestimmen, haben wir allgemein eine subtraktive Methode angewendet, bei der wir den Aminosäureanalysator benutzt haben, um zu erfahren, welche Aminosäure bei jedem Schritt entfernt worden war.

ratorium aus Experimenten über die Alkylierung von Lysin bei pH = 8.5<sup>[61]</sup> und fußend auf unabhängigen Versuchen von *Hirs et al.*<sup>[62]</sup> zur Dinitrophenylierung, daß die ε-Aminogruppe von Lysin-41 wahrscheinlich 7–10 Å vom Imidazolring von Histidin-12 und etwas weiter entfernt von Histidin-119 ist.

Das chemische Herantasten liefert jedoch nicht genügend Informationen, um ein adäquates Modell eines Enzyms in seiner Gesamtheit aufzubauen. Die großen Fortschritte bei der Röntgen-Kristallographie, bei der *Perutz*<sup>[63]</sup> und

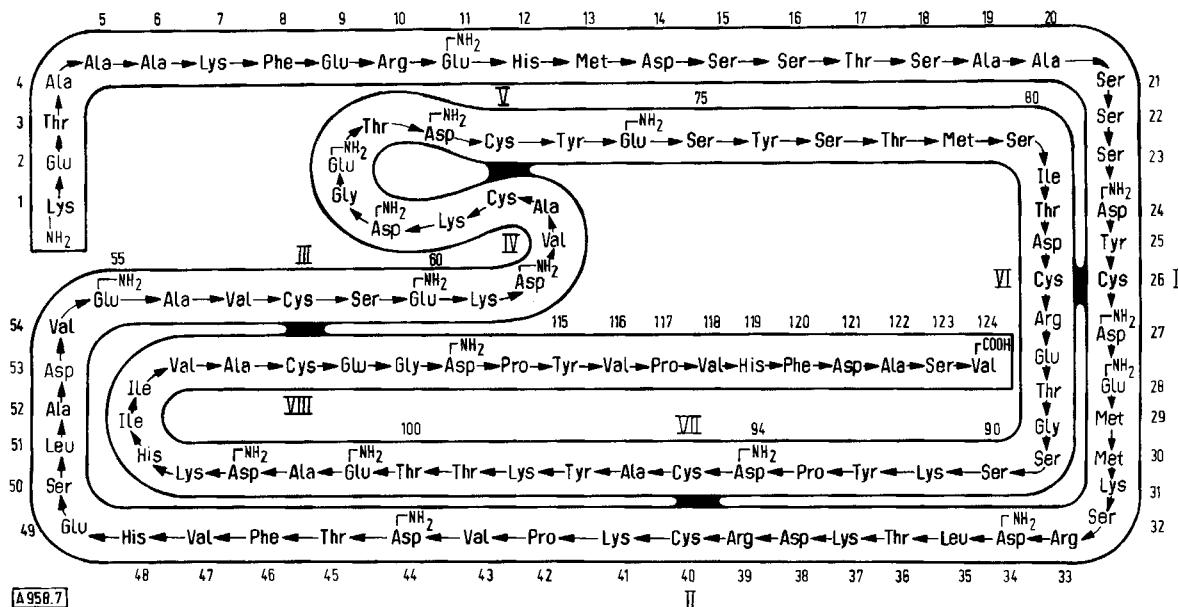


Abb. 7. Sequenz der Aminosäurereste in Rinderpankreas-Ribonuclease A (aus [54], auf [50–57] basierend).

Die Formel der Ribonuclease (Abb. 7), die weitgehend von *Werner Hirs*<sup>[50, 51]</sup>, *Darrel Spackman*<sup>[52]</sup> und *Derek Smyth*<sup>[53, 54]</sup> entwickelt wurde, die aber auch in wichtigen Punkten auf den Ergebnissen einiger Schlüsselexperimente von *Christian B. Anfinsen* und seinen Mitarbeitern<sup>[55–57]</sup> in Bethesda beruht, wird hier mit den üblichen Abkürzungen geschrieben. Ribonuclease war das erste Enzym, für das die Sequenz angegeben werden konnte; die Bestimmung seiner Struktur geht unmittelbar auf den Erfolg *Sangers* beim Hormon Insulin zurück.

Das Aufschreiben einer derartigen zweidimensionalen Formel ist nur der erste Schritt. *Linderström-Lang*<sup>[58]</sup> bezeichnete solch eine Sequenz als Primärstruktur des Proteins. Die Katalyse läuft jedoch in drei Dimensionen ab; an ihr ist beteiligt, was *Lang* Sekundär- und Tertiärstruktur der Kette nannte.

Als Chemiker konnten wir durch Derivatisierungsversuche einige Voraussetzungen über Reste machen, die wegen der Faltung beieinander lagen und das aktive Zentrum der Ribonuclease bildeten. Aufgrund von *Gerd Gundlachs* Arbeiten über die Inaktivierung von Ribonuclease durch Alkylierung mit Jodacetat<sup>[59]</sup> und *Arthur Crestfields* Beweis der reziproken Alkylierung von zwei essentiellen Histidinresten durch Jodacetat bei pH = 5.5<sup>[60]</sup> schlossen wir, daß sich die Imidazolringe von Histidin-119 und -12 im aktiven Zentrum befinden und ungefähr 5 Å voneinander entfernt sind. Weiterhin schloß *Robert Heinrikson* in unserem Labo-

*Kendrew*<sup>[64]</sup> bahnbrechende Arbeit leisteten, haben in dieser Hinsicht ein völlig neues Kapitel aufgeschlagen, wobei allerdings die Kenntnis der Sequenz, mindestens eines beträchtlichen Teils, beim gegenwärtigen Stand der Technik eine Voraussetzung für die Lösung des Problems ist. Wir warteten mit großer Spannung auf die Ergebnisse der Röntgen-Strukturanalyse von Ribonuclease-Kristallen, die 1967 in Arbeiten von *Kartha, Bello* und *Harker*<sup>[65]</sup> über Ribonuclease A sowie von *Wyckhoff* und *Richards* und ihren Mitarbeitern<sup>[66]</sup> über Ribonuclease S erschienen. Bei der S-Form des Enzyms<sup>[67, 68]</sup>, die voll aktiv ist, wurde die Kette in erster Linie zwischen dem 20. und 21. Rest durch kontrollierte Proteolyse mit Subtilisin gespalten.

Die Überprüfung des Modells zeigt, daß die ungefähre Lage der Imidazolringe von Histidin-12 und -119 sowie der ε-Aminogruppe von Lysin-41 mit den chemischen Voraussagen übereinstimmt. Das Substrat für Ribonuclease (Abb. 8) ist Ribonucleinsäure, welche, wie Experimente aus den Laboratorien von *Todd*, von *Cohn* und von *Markham* (besprochen in<sup>[69]</sup>) ergaben, an der 5'-Phosphatesterbindung nach einem pyrimidin-enthaltenden Nucleotid gespalten wird und durch Transphosphorylierung das 2',3'-Cyclophosphat ergibt, das im zweiten Schritt zum 3'-Ester hydrolysiert wird. Die Röntgen-Strukturanalyse zeigt, daß das Substrat in eine Mulde auf der Oberfläche des Proteins hineinpäßt, wobei sich der Phosphatteil nahe den beiden Imidazolringen der Histidine-12 und -119 befindet und

der Pyrimidinring sich in eine hydrophobe Tasche einpaßt, die in der Nähe des aromatischen Ringes von Phenylalanin-120 liegt.

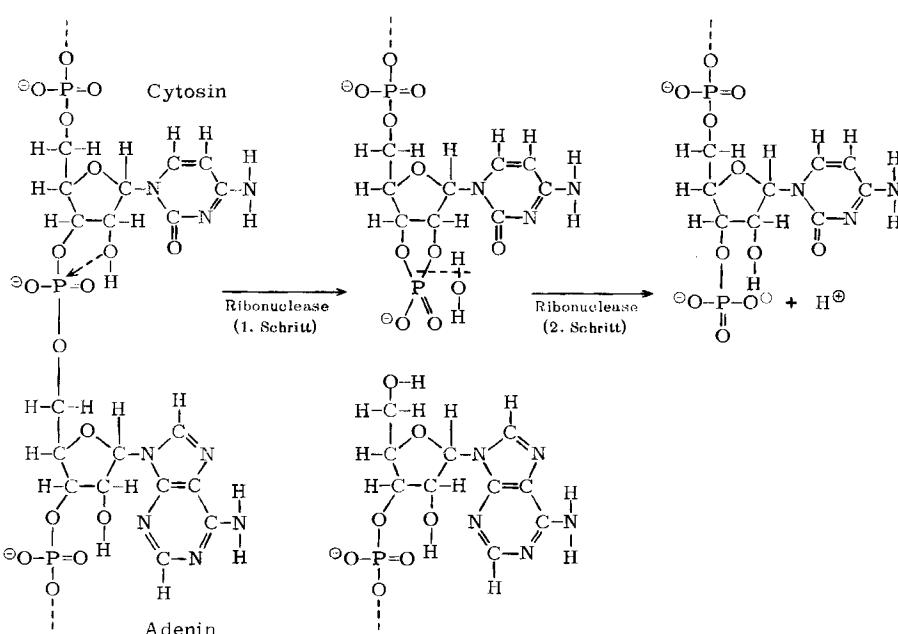


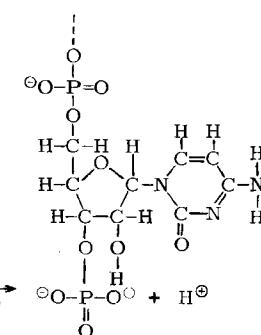
Abb. 8. Wirkung der Ribonuclease auf Ribonucleinsäure (s. Zusammenfassung in [69]).

Ausgehend von diesem Bild des aktiven Zentrums (zusammengefaßt in<sup>[70]</sup>) werden derzeit in einer Anzahl von Laboratorien chemische und physikalische Versuche unternommen, um den katalytischen Vorgang so genau wie möglich zu beschreiben. Hauptrollen beim push-pull-Mechanismus, der die Transphosphorylierung oder Hydrolyse der Phosphatesterbindung bewirkt, spielen ein geladener und ein ungeladener Imidazolring.

Diese neuerlichen Experimente leiten über zum dritten Kapitel der Ribonuclease-Historie, zur chemischen Synthese, die durch die vielen Fortschritte der Synthesemethoden für Peptide in jüngster Zeit ermöglicht worden ist. Die Synthese eines Präparates mit 70% der Aktivität nativer Ribonuclease war eine großartige Leistung von Gutte und Merrifield<sup>[71, 72]</sup>. Ein aktives Ribonuclease-S-Protein wurde von Hirschmann, Denkewalter und Mitarbeitern<sup>[73]</sup> hergestellt. Die Ausbeuten dieser Synthesen hängen von einer sehr wichtigen Eigenschaft der Disulfidbindungen der Ribonuclease ab, die von White<sup>[74]</sup> sowie Anfinsen et al.<sup>[75]</sup> untersucht wurde und, besonders im Hinblick auf ihre spezielle biologische Bedeutung, von Anfinsen<sup>[76]</sup> zusammenfassend dargestellt wurde. Die reduzierte Kette mit acht Thiolgruppen faltet sich und gibt die für die aktive Konformation des Enzyms richtigen Paarungen von Disulfidbindungen. Die intramolekularen Kräfte, die solch eine Faltung leiten, und die ähnlichen Kräfte, die zur spezifischen Zusammenlagerung der Ketten eines Proteins mit mehreren Untereinheiten, wie etwa Hämoglobin, beitragen, werden weiterhin untersucht.

Die Möglichkeit, Ribonuclease oder größere Teile davon zu synthetisieren, eröffnet neue Wege für die Identifizierung von Resten, die für die Aktivität wesentlich sind, und zwar durch Herstellung von Analogen der Ribonuclease mit Substituenten an spezifischen Positionen. Hofmann et al.

sowie Scuffone et al. (besprochen in<sup>[70]</sup>) haben derartige Versuche zur künstlichen Variation des Aminoendes vom Richardsschen S-Peptid ausgeführt. Wir haben mit Merri-



field und seinen Mitarbeitern in der im folgenden dargelegten jüngsten Versuchsreihe zusammengearbeitet, in der die Anwendung einer Art chemischer Chirurgie am Carboxyende des Moleküls und der Nutzen synthetischen Austauschs veranschaulicht wird.

Wie können wir prüfen, ob die Nähe des aromatischen Ringes von Phenylalanin-120 zum Pyrimidinring des Substrats zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen beiden sechsgliedrigen Ringen in einer Weise führt, die für die Bindung des Substrats an das Enzym wichtig ist? Michael Lin konnte in unserem Laboratorium die letzten sechs Reste der Ribonuclease, unter ihnen Phenylalanin-120 und Histidin-119, enzymatisch (mit Pepsin nach Anfinsen<sup>[77]</sup> plus Carboxypeptidase A) abschneiden. Das resultierende Molekül<sup>[78]</sup> ist völlig inaktiv und bindet kein Substrat. Gleichzeitig hatten Gutte und Merrifield das 14-Reste-L-Peptid von Glutaminsäure-111 bis Valin-124 synthetisiert. Wenn man dieses synthetische Fragment mit dem Molekül mischt, dem die Reste 119–124 fehlen, wird das zugegebene Peptid adsorbiert, und die Aktivität des nativen Proteins wird zu 90% wiederhergestellt<sup>[79]</sup>. Das fehlende Histidin für das aktive Zentrum wird auf diese Weise wieder zugeführt; andere Reste im Peptid adsorbieren sich an den Proteinkern derart, daß die Bindungsstelle und das katalytische Zentrum zurückgebildet werden. Im Prinzip entspricht dieses Resultat den früheren Versuchen von Richards und Vithayathil<sup>[68]</sup> über die Abspaltung und Adsorption des S-Peptids am Aminoende.

Wenn statt Phenylalanin in Stellung 120 Leucin oder Isoleucin in das synthetische Peptid eingeführt werden, hat die Kombination von Peptid und Protein nur 10% der Aktivität der Ribonuclease, bindet aber das Substrat genauso gut wie das native Enzym<sup>[80]</sup>. Wir schließen daraus, daß der aromatische Ring nicht wesentlich für die Bindung

des Pyrimidinringes oder für die Aktivität ist. Die niedrige Aktivität des leucin- oder isoleucin-substituierten Peptids zeigt jedoch, daß der aromatische Ring des Phenylalanins in die hydrophobe Tasche genauer hineinpaßt als die aliphatischen Seitenketten und wahrscheinlich dazu dient, das Histidin-119 exakter in das empfindliche Gleichgewicht mit Histidin-12 zu orientieren, das dem aktiven Zentrum seine volle katalytische Aktivität gibt.

Man kann auch auf andere Weise untersuchen, welche Reste ohne Verlust der Aktivität variiert werden können; sie besteht darin, die Unterschiede der Pankreas-Ribonucleasen verschiedener Tierspezies zu untersuchen, wie man es für die Enzyme von Schaf<sup>[81]</sup>, Ratte<sup>[82]</sup> und Schwein<sup>[83, 84]</sup> getan hat.

### Desoxyribonuclease

Weiterhin kann man, um zu erkennen, warum Ribonuclease so spezifisch für ihr spezielles Substrat ist, Enzyme

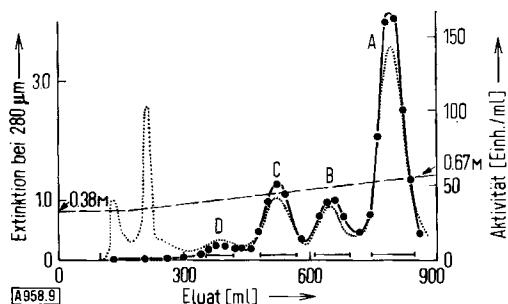


Abb. 9. Chromatographie von Rinderpankreas-Desoxyribonuclease, hergestellt durch Ammoniumsulfatfällung [89], auf Phosphocellulose bei pH = 4.7 mit einem Natriumacetatpuffer steigender Molarität (aus [92]).

untersuchen, die ähnliche Substrate hydrolyseren. In den letzten Jahren haben wir unsere Aufmerksamkeit auf Pankreas-Desoxyribonuclease gerichtet. Dieses Enzym, das ungefähr doppelt so groß wie Ribonuclease ist, hydrolysiert DNA in Gegenwart von zweiwertigen Kationen, wie etwa Mn<sup>2+</sup>, und gibt 5'-Mononucleotide sowie größere Bruchstücke<sup>[85]</sup>. Die Desoxyribonuclease erregte erstmalig Aufmerksamkeit durch die klassischen Untersuchungen von Avery, McLeod und McCarty<sup>[86, 87]</sup>, die zeigten, daß sich das transformierende Prinzip von *Pneumococcus* durch die Wirkung des Enzyms zerstören ließ. Auf McCarty's<sup>[88]</sup> Versuche über die Reinigung des Enzyms aus Pankreas folgten die von Kunitz<sup>[89]</sup> und von Lindberg<sup>[90]</sup>. Unsere Arbeiten begannen, als Paul Price als Doktorand die chromatographische Reinigung von Desoxyribonuclease in Angriff nahm. Seine ersten Versuche zeigten, daß das Enzym in Abwesenheit von zweiwertigen Metall-Ionen extrem empfindlich gegenüber Proteolyse ist. Der Erfolg der Reinigung hing daher davon ab, ob Metall-Ionen wie etwa Ca<sup>2+</sup> anwesend waren oder ob Diisopropylfluorophosphat, das die Pankreasproteasen inaktiviert, zugesetzt wurde. Es gelang ihm, Desoxyribonuclease-Präparate auf Sulfoäthyl-Sephadex<sup>[91]</sup> in zwei aktive Komponenten zu zerlegen; später erzielte Hans Salnikow mit Phosphocellulose noch bessere Trennungen (Abb. 9)<sup>[92]</sup>. Es gibt drei aktive Hauptkomponenten: Desoxyribonuclease A ist ein Glykoprotein, Desoxyribonuclease B ein Sialoglykoprotein, und Desoxyribonuclease C ist der Desoxyribonuclease A ähnlich, besitzt aber einen Prolin- statt eines Histidinrestes. Diese drei Desoxyribonucleasen sind auch im Pankreasssaft eines einzigen Tieres vorhanden.

Die Bestimmung der chemischen Struktur der Desoxyribonuclease A wurde von Hans Salnikow<sup>[93]</sup> begonnen und in diesem Jahr von Ta-hsiu Liao<sup>[94]</sup> abgeschlossen. Als

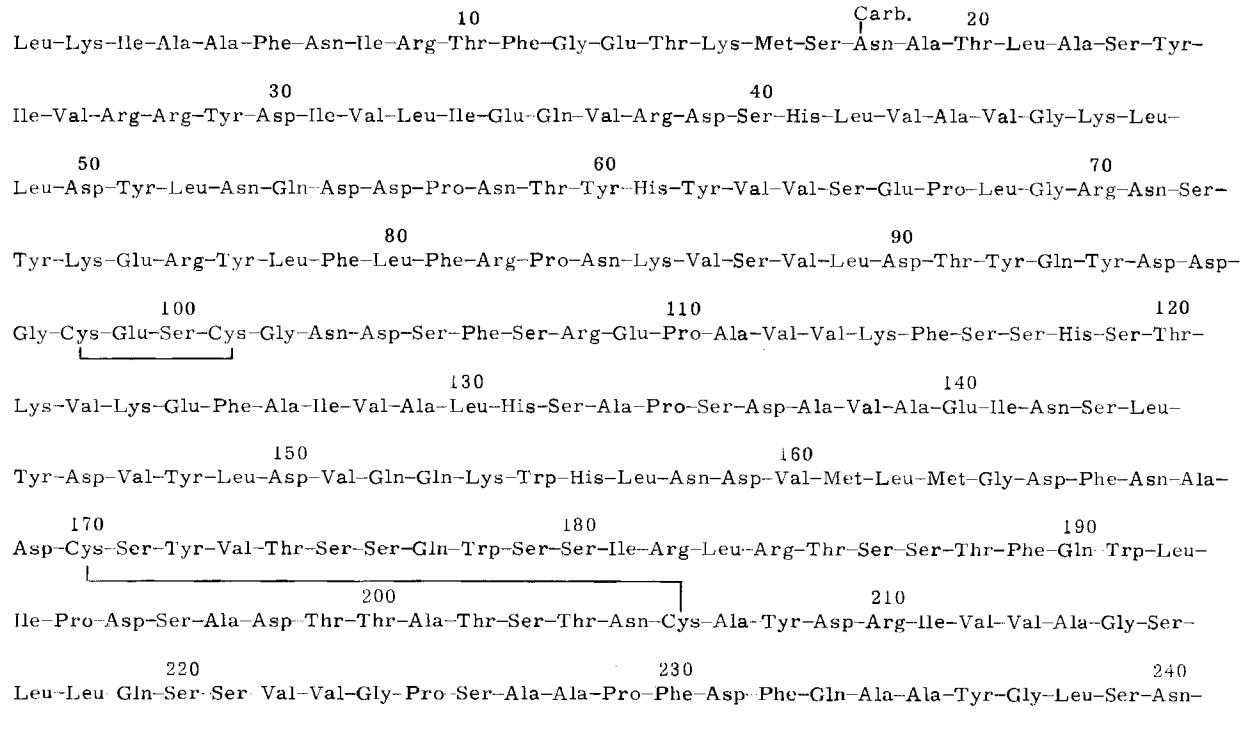


Abb. 10. Sequenz der Aminosäurereste in Rinderpankreas-Desoxyribonuclease A (aus [93, 94]). Carb. = Kohlenhydrat-Seitenkette.

Arbeitshypothese für die Struktur des Moleküls (Abb. 10) nehmen wir eine einzige Kette von 257 Resten und zwei Disulfidbrücken an. Die Anordnung der tryptischen und der chymotryptischen Peptide in der reduzierten und carbonylmethylierten Kette und die Paarung der Halbcystinreste im nativen Enzym wurde durch die Spaltung des Moleküls an den vier Methioninresten durch Bromcyan nach der Methode von Gross und Witkop<sup>[95]</sup> sehr erleichtert. Aminosäureanalysen im Nanomol-Bereich ermöglichen Sequenzbestimmungen an kleinen Mengen von Peptiden, die durch Chromatographie oder Papierelektrophorese isoliert waren.

Einige der besonderen Struktureigenschaften lassen sich anhand von Abbildung 11 diskutieren. Die Kohlenhydrat-Seitenkette, die zwei N-Acetylglucosamin- und zwei bis sechs Mannosereste<sup>[91, 92, 96]</sup> enthält und die, wie Brian Catley zeigte, über eine Aspartamidohehexosaminbindung an eine Sequenz von -Ser-Asn-Ala-Thr<sup>[96]</sup> angeheftet ist, findet man an nur einer Stelle der Kette, nämlich an Rest 18. Tony Hugli untersuchte die Nitrierung von Desoxyribonuclease<sup>[97]</sup> mit Tetranitromethan<sup>[98]</sup>; das Enzym wird durch Modifikation eines einzigen Tyrosinrestes inaktiviert, der sich als Rest 62 erweist. Paul Price entdeckte, daß die Inaktivierung von Desoxyribonuclease durch Jodacetat in Gegenwart von Cu<sup>2+</sup>-Ionen und Tris-Puffer<sup>[99]</sup> von einer Carboxymethylierung eines Histidinrestes begleitet ist; aus der Sequenz eines 3-Carboxymethylhistidin enthaltenden Peptids und der des Proteins findet man, daß der essentielle Imidazolring im Rest 131 vorliegt. Desoxyribonuclease C<sup>[92]</sup> ist das Ergebnis einer Mutation, die bewirkt, daß ein Histidin- durch einen Prolinrest ersetzt wird, ohne daß sich dabei die Aktivität ändert, Hans Salnikow und Dagmar Murphy<sup>[100]</sup> haben gezeigt, daß dieser Wechsel in Position 118 eintritt. Dieser Histidinrest in der Desoxyribonuclease A ist also nicht essentiell für die enzymatische Aktivität.

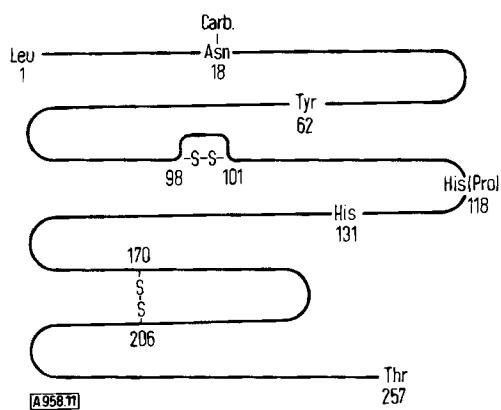


Abb. 11. Darstellung der Besonderheiten von Desoxyribonuclease A [94] und der Substitution von Histidin durch Prolin in Desoxyribonuclease C [100]. Carb. = Kohlenhydrat-Seitenkette.

Die beiden Disulfidbrücken der Desoxyribonuclease A besitzen einige ungewöhnliche Eigenschaften. Paul Price zeigte, daß beide Bindungen auch ohne denaturierende Agentien in Abwesenheit von Calcium-Ionen sehr leicht durch Thiole reduziert werden können, wobei ein inaktives Produkt entsteht. Bei Anwesenheit von Calcium-Ionen ist eine Bindung stabil, die andere wird reduziert<sup>[101]</sup>, das Produkt ist aktiv.

Ta-hsia Liao hat die nicht essentielle Disulfidbrücke identifiziert: Es ist diejenige, die die kleine Schleife zwischen den Resten 98 und 101<sup>[94]</sup> bildet. Öffnet man die größere Schleife, die von den Halbcystinen 170 und 206 gebildet wird, geht die Aktivität verloren.

Falls sich eine Röntgen-Strukturanalyse der kristallinen Desoxyribonuclease A durchführen läßt, wird der nächste Schritt die Korrelation der durch chemische Versuche erhaltenen Ergebnisse mit der dreidimensionalen Struktur des Enzyms sein.

## Schluß

Im Laufe der Untersuchungen von Enzymen mit unterschiedlichen Funktionen hatten wir die Freude, mit Kenji Takahashi zusammenzuarbeiten, mit dem wir eine Carboxygruppe von Glutaminsäure als Teil des aktiven Zentrums der Ribonuclease T<sub>1</sub> identifizierten<sup>[102]</sup>. Die essentielle Thiolgruppe und der Histidinrest von Streptococcus-Proteinase wurden in Zusammenarbeit mit Stuart Elliott und Teh-yung Liu<sup>[103, 104]</sup>, die Veresterung der Carboxygruppen im aktiven Zentrum von Pepsin zusammen mit T. G. Rajagopalan<sup>[105]</sup> untersucht.

Der Biochemiker braucht eine Fülle von grundlegenden Kenntnissen über verschiedene Enzyme, bevor er die katalytische Aktivität in allen Einzelheiten erklären kann. Die Enzymchemie hat heute einen Entwicklungsstand erreicht, der dem der organischen Chemie zu Anfang dieses Jahrhunderts ähnelt. Damals bemühte man sich sehr, die Eigenschaften der Unzahl kleiner organischer Verbindungen, die Mensch und Natur ersinnen können, festzuhalten. Heute ist auf dem Gebiet der Polypeptide die Liste der bekannten Strukturen relativ klein. Die zuerst untersuchten Enzyme sind diejenigen, die man in Gramm-Mengen gewinnen kann, z. B. Ribonuclease, Trypsin, Lysozym, Carboxypeptidase, Subtilisin. Die Erfahrung bei der Bestimmung solcher Strukturen führt zur Entwicklung von Ultramikromethoden, die den Bereich der Strukturuntersuchungen bis zu Gewebsenzymen, die in nur sehr kleinen Mengen vorhanden sind, erweitern werden.

Wenn man die Struktur sehr vieler Enzyme kennt, werden sich die Konstruktionsprinzipien erkennen lassen, nach denen die Natur Katalysatoren für gegebene Zwecke aufbaut; und derartige Forschungen über Proteine werden sich in der Praxis auszahlen. Diese Möglichkeit kann am Beispiel eines aktuellen Forschungsprojektes veranschaulicht werden. Dieses Projekt entwickelte sich folgendermaßen: Bei der Untersuchung der Bedeutung der dreidimensionalen Konfiguration für die Aktivität der Ribonuclease löste George Stark das Enzym bei 40°C in 8 M Harnstoff<sup>[106]</sup>. Bei einem dieser Experimente war die Ribonuclease inaktiv, nachdem der Harnstoff durch Dialyse entfernt worden war; es stellte sich heraus, daß Spuren von Cyanat in der Harnstofflösung die ε-Aminogruppen des Enzyms carbamyliert hatten. Die Chemie dieser Reaktion führt uns zu Wöhlers<sup>[107]</sup> Beobachtung aus dem Jahre 1828 über die Beziehung zwischen Ammoniumcyanat und Harnstoff zurück. 1970 begannen Anthony Cerami und James Manning<sup>[108]</sup>, zwei junge Forscher an der Rockefeller Uni-

versity, auf völlig eigene Initiative zu untersuchen, ob Spuren von Cyanat in Harnstoff bei dem schon vorher beobachteten günstigen Einfluß von Harnstoff gegen die Sichelbildung von Erythrocyten bei Patienten mit Hämoglobin S eine Rolle spielen könnten. Sie entdeckten, daß es solch einen Effekt von Cyanat auf menschliche Erythrocyten tatsächlich gibt, und daß er von einer Carbamylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe der Valinreste an den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von Hämoglobin S begleitet ist. Die Erkenntnis, daß eine relativ einfache chemische Modifikation von Hämoglobin S die normale Funktion des fehlerhaften Moleküls annähernd wiederherstellen kann, eröffnet die Möglichkeit, daß ein genetischer Defekt des Menschen durch Derivatisierung eines Proteins geheilt werden kann, ohne daß das Gen geändert werden muß.

Diese Ergebnisse bieten ein Beispiel dafür, wie in der Grundlagenforschung ein Befund zu einem anderen führt und schließlich den Menschen Nutzen bringt. Wenn wir die Biochemie 1972 betrachten, ist es wichtig, sich klarzumachen, wie lückenhaft unsere Kenntnis der molekularen Basis des Lebens noch ist. Über sehr wenige Makromoleküle kann man in solcher Ausführlichkeit diskutieren wie über Ribonuclease oder Hämoglobin. Die Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion ist jedoch die Grundlage für ein rationales Erkennen des verwinkelten Zusammenwirkens in lebenden Systemen.

## Dank

Die Forschungen in unserem Laboratorium über Ribonuclease und Desoxyribonuclease, die in diesem Vortrag wiedergegeben worden sind, wurden ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung der Rockefeller University, des United States Public Health Service und der National Science Foundation.

Eingegangen am 16. Februar 1973 [A 958]  
Übersetzt von Dr. Harold Rüdiger, Köln

- [1] W. H. Stein u. S. Moore, *Sci. Amer.* 204, Nr. 2, S. 81 (1961).
- [2] W. Jones, *Amer. J. Physiol.* 52, 203 (1920).
- [3] R. J. Dubos u. R. H. S. Thompson, *J. Biol. Chem.* 124, 501 (1938).
- [4] M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* 24, 15 (1940).
- [5] C. H. W. Hirs, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 1893 (1951).
- [6] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 200, 493 (1953).
- [7] S. Paléus u. J. B. Neilands, *Acta Chem. Scand.* 4, 1024 (1950).
- [8] A. M. Crestfield, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 238, 618 (1963).
- [9] J. Porath u. P. Flodin, *Nature* 183, 1657 (1959).
- [10] H. A. Sober u. E. A. Peterson, *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 1711 (1954).
- [11] A. J. P. Martin u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 49, 215 (1951).
- [12] T. H. Plummer, Jr., u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 238, 1396 (1963).
- [13] T. H. Plummer, Jr., u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 239, 2530 (1964).
- [14] S. Moore, W. H. Stein u. M. Bergmann, *Chem. Rev.* 30, 423 (1942).
- [15] A. J. P. Martin u. R. L. M. Syngle, *Biochem. J.* 35, 1358 (1941).
- [16] A. J. P. Martin, *Annu. Rev. Biochem.* 19, 517 (1950).
- [17] R. L. M. Syngle, *Analyst (London)* 71, 256 (1946).
- [18] S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 176, 367 (1948).
- [19] S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 178, 53 (1949).

- [20] W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 178, 79 (1949).
- [21] W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 176, 337 (1948).
- [22] S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 192, 663 (1951).
- [23] S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 211, 893, 907 (1954).
- [24] C. H. W. Hirs, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 211, 941 (1954).
- [25] S. Moore, D. H. Spackman u. W. H. Stein, *Anal. Chem.* 30, 1185 (1958).
- [26] D. H. Spackman, W. H. Stein u. S. Moore, *Anal. Chem.* 30, 1190 (1958).
- [27] D. H. Spackman, *Fed. Proc.* 22, 244 (1963).
- [28] D. H. Spackman in C. H. W. Hirs: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1967, Bd. 11, S. 3.
- [29] S. Moore, *J. Biol. Chem.* 243, 6281 (1968).
- [30] K. Samejima, W. Dairman u. S. Udenfriend, *Anal. Biochem.* 42, 222 (1971).
- [31] K. Samejima, W. Dairman, J. Stone u. S. Udenfriend, *Anal. Biochem.* 42, 237 (1971).
- [32] M. Weijele, S. L. De Bernardo, J. P. Tengi u. W. Leimgruber, *J. Amer. Chem. Soc.* 94, 5927 (1972).
- [33] S. Moore in J. Meienhofer: *Chemistry and Biology of Peptides*. Ann Arbor Science Publications, Ann Arbor 1972, S. 629 ff.
- [34] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 195, 669 (1952).
- [35] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 6063 (1954).
- [36] J. M. Manning u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 243, 5591 (1968).
- [37] J. M. Manning, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 7449 (1970).
- [38] E. Schram, J. P. Dustin, S. Moore u. E. J. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 9, 149 (1953).
- [39] J. P. Dustin, C. Czakowska, S. Moore u. E. J. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 9, 256 (1953).
- [40] W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 211, 915 (1954).
- [41] W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 201, 45 (1953).
- [42] H. H. Tallan, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 211, 927 (1954).
- [43] H. H. Tallan, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 206, 825 (1954).
- [44] H. H. Tallan, S. T. Bella, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 217, 703 (1955).
- [45] H. H. Tallan, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 219, 257 (1956).
- [46] H. H. Tallan, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 230, 707 (1958).
- [47] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 219, 623 (1956).
- [48] F. Sanger, *Science* 129, 1340 (1959).
- [49] P. Edman, *Acta Chem. Scand.* 10, 761 (1956).
- [50] C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 235, 625 (1960).
- [51] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 235, 633 (1960).
- [52] D. H. Spackman, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 235, 648 (1960).
- [53] D. G. Smyth, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 237, 1845 (1962).
- [54] D. G. Smyth, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 238, 227 (1963).
- [55] C. B. Anfinsen, R. R. Redfield, W. L. Choate, J. Page u. W. R. Carroll, *J. Biol. Chem.* 207, 201 (1954).
- [56] R. R. Redfield u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 221, 385 (1956).
- [57] J. T. Potts, A. Berger, J. Cooke u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 237, 1851 (1962).
- [58] K. Linderstrom-Lang: *Lane Medical Lectures*. Stanford University Publications 1952, Bd. 6, S. 1 ff.
- [59] H. G. Gundlach, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 234, 1754 (1959).
- [60] A. M. Crestfield, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 238, 2413, 2421 (1963).
- [61] R. L. Heinrikson, *J. Biol. Chem.* 241, 1393 (1966).
- [62] C. H. W. Hirs, M. Halmann u. J. H. Kycia in T. W. Goodwin u. I. Lindberg: *Biological Structure and Function*. Academic Press, New York 1961, S. 41.
- [63] M. F. Perutz, *Science* 140, 863 (1963).
- [64] J. C. Kendrew, *Science* 139, 1259 (1963).

- [65] G. Kartha, J. Bello u. D. Harker, *Nature* 213, 862 (1967).
- [66] H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson u. F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 242, 3984 (1967).
- [67] F. M. Richards, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 29, 322, 329 (1955).
- [68] F. M. Richards u. P. J. Vithayathil, *J. Biol. Chem.* 234, 1459 (1959).
- [69] D. M. Brown u. A. R. Todd in E. Chargaff u. J. N. Davidson: *The Nucleic Acids: Chemistry and Biology*. Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 409.
- [70] F. M. Richards u. H. G. Wyckoff in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, 3. Aufl., Bd. 4, S. 647ff.
- [71] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 501 (1969).
- [72] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 246, 1922 (1971).
- [73] R. Hirschmann, R. F. Nutt, D. F. Veber, R. A. Vitali, S. L. Varga, T. A. Jacob, F. W. Holly u. R. G. Denkewalter, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 507 (1969).
- [74] F. H. White, *J. Biol. Chem.* 235, 383 (1960).
- [75] R. F. Goldberger, C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 238, 628 (1963).
- [76] C. B. Anfinsen: *Ics Prix Nobel en 1972*. Stockholm 1973; *Angew. Chem.* 85, 1065 (1973).
- [77] C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 221, 405 (1956).
- [78] M. C. Lin, *J. Biol. Chem.* 245, 6726 (1970).
- [79] M. C. Lin, B. Gutte, S. Moore u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 245, 5169 (1970).
- [80] M. C. Lin, B. Gutte, D. G. Caldi, S. Moore u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247, 4768 (1972).
- [81] C. B. Anfinsen, S. E. G. Aqvist, J. P. Cooke u. B. Jonsson, *J. Biol. Chem.* 234, 1118 (1959).
- [82] J. J. Beintema u. M. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* 147, 612 (1967).
- [83] R. L. Jackson u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 245, 637 (1970).
- [84] J. J. Phelan u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 245, 654 (1970).
- [85] M. Laskowski, Sr., in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, 3. Aufl., Bd. 4, S. 289ff.
- [86] O. T. Avery, C. M. MacLeod u. M. McCarty, *J. Exp. Med.* 79, 137 (1944).
- [87] M. McCarty u. O. T. Avery, *J. Exp. Med.* 83, 89 (1946).
- [88] M. McCarty, *J. Gen. Physiol.* 29, 123 (1946).
- [89] M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* 33, 349 (1950).
- [90] U. Lindberg, *Biochemistry* 6, 335 (1967).
- [91] P. A. Price, T.-Y. Liu, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 244, 917 (1969).
- [92] J. Salnikow, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 245, 5685 (1970).
- [93] J. Salnikow, T.-H. Liao, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 248, 1480 (1973).
- [94] T.-H. Liao, J. Salnikow, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 248, 1489 (1973).
- [95] E. Gross u. B. Witkop, *J. Biol. Chem.* 257, 1856 (1962).
- [96] B. J. Catley, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 244, 933 (1969).
- [97] T. E. Hugli u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 246, 7191 (1971).
- [98] J. F. Riordan, M. Sokolovsky u. B. L. Vallee, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 4104 (1966).
- [99] P. A. Price, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 244, 924 (1969).
- [100] J. Salnikow u. D. Murphy, *J. Biol. Chem.* 248, 1499 (1973).
- [101] P. A. Price, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 244, 929 (1969).
- [102] K. Takahashi, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 242, 4682 (1967).
- [103] T.-Y. Liu, W. H. Stein, S. Moore u. S. D. Elliott, *J. Biol. Chem.* 240, 1143 (1965).
- [104] T.-Y. Liu, *J. Biol. Chem.* 242, 4029 (1967).
- [105] T. G. Rajagopalan, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 241, 4295 (1966).
- [106] G. R. Stark, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 235, 3177 (1960).
- [107] F. Wöhler, *Poggendorfs Ann.* 12, 253 (1828).
- [108] A. Cerami u. J. M. Manning, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1180 (1971).

## Antikörperstruktur und molekulare Immunologie (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Gerald M. Edelman<sup>[\*]</sup>

Einige Wissenschaften sind wegen ihrer Allgemeingültigkeit interessant, andere wegen ihrer Fähigkeit, Voraussagen zu treffen. Die Immunologie dagegen ist besonders fesselnd, weil sie ungewöhnliche Ideen hervorbringt, von denen einige in anderen Wissensgebieten kaum gefunden worden wären. In der Tat glauben viele Immunologen, daß die Immunologie deswegen auf andere Zweige von Biologie und Medizin einen großen Einfluß haben wird. Bei einer so ehrenvollen Gelegenheit wie dieser fühle ich mich auch dadurch bevorzugt, daß ich über einige grundlegende Ideen der Immunologie und besonders über ihre Beziehung zur Struktur der Antikörper sprechen darf.

[\*] Prof. Dr. G. M. Edelman  
The Rockefeller University  
New York, N. Y. 10021 (USA)

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

Die Arbeit über die Struktur der Antikörper hat die Immunologie in ähnlicher Weise mit der Molekularbiologie verbündet wie die früheren Untersuchungen an Hapten-Antigenen die Immunologie mit der Chemie verknüpften. Diese Strukturuntersuchungen kann man als wesentliches Projekt der molekularen Immunologie ansehen, deren Aufgabe es ist, die Eigenschaften des Immunsystems anhand seiner molekularen Struktur zu erklären. In diesem Vortrag möchte ich einige der Folgerungen aus der Strukturanalyse von Antikörpern diskutieren. Statt das Thema erschöpfend zu behandeln, was schon weitgehend getan worden ist<sup>[1–4]</sup>, werde ich einige Gedanken hervorheben, die sich aus den Ergebnissen der Strukturanalyse entwickelt haben. Im Zusammenhang damit möchte ich dann das verwandte, aber weniger gut erforschte Thema der Oberflächen-Antikörper von Lymphoidzellen erörtern und einige neuere Experimente beschreiben, die meine Kollegen und ich zum Verständnis der molekularen Mechanismen, durch welche die