

# ANGEWANDTE CHEMIE

88. Jahrgang 1976

Heft 7

Seite 197–234

## Austausch von Untereinheiten zwischen Enzymen aus verschiedenen Organismen *in vitro*: Enzymchimären

Von Guido R. Hartmann<sup>[\*]</sup>

*Professor Feodor Lynen zum 65. Geburtstag gewidmet*

Die Mehrzahl der intrazellulären Enzyme ist aus mehreren gleichen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Je weiter die Organismen, aus denen ein Enzym isoliert wird, phylogenetisch voneinander entfernt sind, um so größer sind die Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Dennoch konnte in zahlreichen Fällen zwischen chemisch derart verschiedenen Untereinheiten spezifische Assoziatbildung oder sogar die Entstehung von Enzymchimären beobachtet werden. Sie lassen sich nicht nur über die Grenze zwischen verwandten Organismen bilden, sondern auch über die tiefe Kluft zwischen kernlosen und kernhaltigen Zellen. Der Austausch von Untereinheiten zwischen Enzymen mit gleichartiger Aktivität, aber verschiedener Herkunft läßt sich mit der Vorstellung verstehen, daß die Enzyme funktionell festgelegte Typen von Raumstrukturen besitzen.

### 1. Einführung

Die Sequenz der Aminosäuren in den Proteinen ist außerordentlich verschieden. Selbst Enzyme gleicher katalytischer Wirkung sind in ihrer Aminosäurezusammensetzung bei verschiedenen Organismen keineswegs gleich. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist Cytochrom c, das aus Pflanzen wie auch aus niederen und höheren Tieren isoliert worden ist und bei dem man Länge und Aminosäuresequenz der Polypeptidkette bestimmt hat. Trotz gleicher biologischer Funktion finden sich deutliche Unterschiede in der Länge der Eiweißkette und ganz erhebliche Variationen in der Folge der Aminosäuren. Die Unterschiede sind dabei um so größer, je weiter die untersuchten Organismen phylogenetisch voneinander entfernt sind<sup>[1]</sup>. Damit ist dem Polymorphismus der Enzyme

noch keine Grenze gesetzt, zeigt doch das Vorkommen von Isoenzymen, daß selbst in einem Organismus mehrere im molekularen Bau verschiedene Formen eines Proteins mit gleicher katalytischer Spezifität auftreten<sup>[2]</sup>.

Die Aminosäuresequenz in der Polypeptidkette determiniert unter natürlichen Bedingungen auch die biologisch aktive Raumstruktur: Enzyme, die auf irgendeine Weise ihre dreidimensionale Struktur ohne Verletzung der Polypeptidkette verloren haben, falten sich spontan, wenn auch verschieden schnell, wieder in ihre ursprüngliche Form zurück<sup>[3]</sup>. Entsprechend der großen Vielfalt von Aminosäuresequenzen in Polypeptidketten sollte daher in der Natur auch eine ebenso große Zahl von Proteinraumstrukturen vorkommen.

Die meisten intrazellulären Enzyme enthalten mehr als eine Polypeptidkette<sup>[4]</sup>. Man unterscheidet die homopolymeren Enzyme, die aus einer sehr oft geradzahligen Anzahl gleicher Untereinheiten bestehen, von den heteropolymeren Enzymen, die aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die isolierten Untereinheiten sind meist, wenn auch nicht immer, inaktiv.

[\*] Prof. Dr. G. R. Hartmann  
Chemisches Laboratorium der Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Biochemie  
Karlstraße 23, 8000 München 2

Der Zusammenhalt zwischen den Untereinheiten im kompletten und aktiven Enzym wird durch hochspezifische Wechselwirkungen vermittelt, die in der Aminosäuresequenz der Untereinheiten festgelegt sind, denn auch aus Untereinheiten bestehende Enzyme renaturieren nach der völligen Auffaltung der Polypeptidketten spontan wieder zur biologisch aktiven Quartärstruktur<sup>[5]</sup>. Die hohe Spezifität der Assoziation zwischen den Untereinheiten eines Enzyms zeigt sich daran, daß sich aus einer Mischung verschiedener dissoziierter polymerer Enzyme bei der Renaturierung die ursprünglichen Aktivitäten der einzelnen im Ansatz vorhandenen Enzyme wieder einstellen<sup>[6]</sup>. Die Analyse normaler und pathologischer Hämoglobine hat gezeigt, daß für die Assoziation zur aktiven Quartärstruktur genau zueinander passende Kontaktflächen der Untereinheiten notwendig sind. Schon sehr geringe Änderungen, wie der Austausch einer einzelnen Aminosäure, können hier stören<sup>[7]</sup>.

Nach diesen Überlegungen sollte man kaum erwarten, daß sich die Untereinheiten oligomerer Enzyme über Speziesgrenzen hinweg miteinander zu katalytisch aktiven Hybridstrukturen vereinigen können. Die meist beträchtlichen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von Proteinen gleicher Funktion aus verschiedenen Organismen sollten eine Assoziation nicht zulassen. Überraschenderweise haben mehrere experimentelle Untersuchungen ergeben, daß sich derartige, nach einem antiken Fabelwesen (vgl. Homer, Ilias, 6. Gesang, Vers 181) als Enzymchimären bezeichnete Assoziate aus speziesverschiedenen Untereinheiten dennoch *in vitro* und sogar *in vivo* bilden und enzymatisch aktiv sein können.

## 2. Hybride homopolymerer Enzyme

### 2.1. Hybride dimerer Enzyme

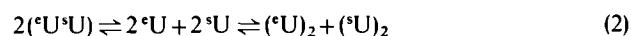
Ein Beispiel für eine intergenerische Hybridbildung (durch Austausch von Untereinheiten) ist schon lange bei der alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) aus Bakterien bekannt. Dieses Enzym liegt unter bestimmten Bedingungen als Dimer aus zwei gleichen Untereinheiten vor. Es wurde sowohl aus *Escherichia coli* wie aus *Serratia marcescens* isoliert. Chemisch sind beide Proteine sehr verschieden. So unterscheiden sich die Muster der Peptide, die beim Abbau mit Trypsin entstehen. Auch reagiert ein Antiserum, das gegen die Phosphatase aus *Escherichia coli* hergestellt worden ist, kaum mit dem Enzym aus *Serratia marcescens*.

Dissoziert man beide Enzyme mit 6 M Harnstoff in Gegenwart von Thioglykolsäure in ihre Untereinheiten, vereinigt die beiden Lösungen und hebt die Wirkung des Denaturierungsmittels durch Verdünnen auf, so bildet sich bei mehrstündiger Inkubation bei 37°C ein erheblicher Teil der enzymatischen Aktivität zurück. Bei der elektrophoretischen Analyse findet man nicht nur die beiden durch ihre verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit charakterisierten Banden der ursprünglichen Enzyme, sondern auch Protein mit einer elektrophoretischen Beweglichkeit, die zwischen den Werten für die Ausgangsenzyme liegt. Aus den zahlreichen Untersuchungen über Isoenzyme<sup>[2]</sup> weiß man, daß das unter diesen Bedingungen beobachtete Auftreten von Proteinen mit geänderter elektrophoretischer Beweglichkeit die Bildung von Hybriden, d. h. von Assoziaten aus Untereinheiten der beiden ursprünglich eingesetzten Enzyme anzeigen. Levinthal et al.<sup>[8]</sup> schließen daher

mit Recht, daß auch in diesem Experiment, in das zwei speziesverschiedene Enzyme eingesetzt wurden, entsprechend Gleichung (1)



ein Hybrid aus einer Untereinheit <sup>a</sup>U des *Escherichia coli*-Enzyms und einer Untereinheit <sup>b</sup>U des *Serratia marcescens*-Enzyms entstanden ist. Offensichtlich kommt es zwischen den heterologen Untereinheiten zu Protein-Protein-Wechselwirkungen, die denen zwischen den autologen Untereinheiten ähnlich sind<sup>[8]</sup>. Das elektrophoretisch abgetrennte Hybridprotein zeigt Phosphataseaktivität. Diese muß allerdings nicht vom Hybrid selbst verursacht sein. Sie könnte auch von den unter den Bedingungen der Aktivitätsbestimmung im Dissoziationsgleichgewicht (2)



vielleicht vorhandenen monomeren Untereinheiten oder Elternenzymen herrühren. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung zu erwähnen, daß das Gleichgewicht (2) von Fremdmolekülen in beide Richtungen verschoben werden kann<sup>[9]</sup>.

### 2.2. Hybride tetramerer Enzyme

Bei der Reaktion zwischen den Untereinheiten U tetramerer homopolymerer Enzyme aus zwei Organismen a und b können sich mehrere Hybride bilden. Schon von der stöchiometrischen Zusammensetzung her sind drei Hybride (<sup>a</sup>U<sup>b</sup>U<sub>3</sub>; <sup>a</sup>U<sub>2</sub><sup>b</sup>U<sub>2</sub>; <sup>a</sup>U<sub>3</sub><sup>b</sup>U) möglich. Aber auch bei gegebener Zusammensetzung sind verschiedene räumliche Anordnungen im Assoziat (planar oder tetraedrisch) möglich. Da die Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Raumstrukturen bei den Hybriden anders als bei den Elternenzymen liegen können, treten unter Umständen noch weitere Molekülspesies auf<sup>[10]</sup>. Über die Existenz der vielen denkbaren Interspezies-Hybride entscheiden nicht nur die thermodynamischen, sondern auch die kinetischen Faktoren der Bildung und des Zerfalls<sup>[11]</sup>. Daher wird die Zahl der beobachtbaren Hybride von Fall zu Fall verschieden sein.

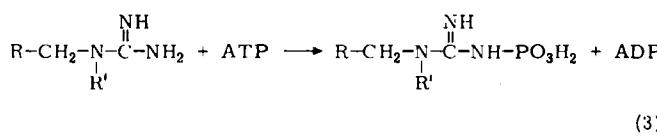
Beispiele für die Chimärenbildung bei Enzymen, die aus vier gleichen Untereinheiten aufgebaut sind, wurden bei der Schiff-Basen bildenden Aldolase (EC 4.1.2.13)<sup>[12-15]</sup>, der L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)<sup>[16-18]</sup> und der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)<sup>[11, 19-23]</sup> beobachtet. Die Bildung von Interspezies-Hybriden wird bei diesen Enzymen dadurch begünstigt, daß sie sich unter relativ milden Bedingungen dissoziieren lassen. Entsprechend beschleunigen Effektoren, welche die Dissoziation der Enzyme in die Untereinheiten fördern, wie ATP im Fall der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase<sup>[22]</sup>, die Hybridbildung sehr.

Es zeigt sich, daß der phylogenetische Abstand der miteinander hybridisierenden Untereinheiten sehr groß sein kann und den Gesamtbereich der Eukaryonten umfaßt (z. B. Rind × Kaninchen<sup>[13]</sup>, Forelle × Kaninchen<sup>[22]</sup>, *Drosophila* × Kaninchen<sup>[14]</sup>, Spulwurm × Kaninchen<sup>[15, 21]</sup>, Hefe × Kaninchen<sup>[19, 20, 23]</sup>). In einer Reihe von Fällen sind die assoziierten Polypeptidketten chemisch so weit voneinander verschieden, daß sie immunologisch nicht mehr kreuzreagieren.

ren. Der Nachweis der Hybridbildung erfolgte in den meisten Fällen durch die von den Ausgangsenzymen verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit der Produkte. Dies weist allerdings nur auf die *Assoziation* der Untereinheiten verschiedener Herkunft hin. Ob und in welchem Umfang die beobachtete enzymatische *Aktivität* auf die Hybride zurückzuführen ist, läßt sich aus den beim intergenerischen Hybrid der alkalischen Phosphatase angeführten Gründen nicht sagen (Abschnitt 2.1).

### 2.3. Hybride zwischen Enzymen verwandter Aktivität

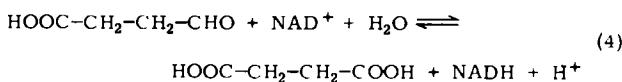
Besonders bemerkenswert ist die Chimärenbildung zwischen den Untereinheiten der Kreatinkinase (EC 2.7.3.2) aus Kaninchennhirn und der L-Arginin kinase (EC 2.7.3.3) der Seegurke. In diesem Fall handelt es sich um zwei Enzyme, die sich nicht nur in ihrer Herkunft, sondern auch, trotz aller Ähnlichkeit der katalysierten Reaktionen, durch das von ihnen umgesetzte Substrat unterscheiden. Beide Enzyme bestehen aus zwei Untereinheiten mit relativen Molekülmassen von ca. 40000. Dissoziert man eine Mischung der beiden Enzyme mit Harnstoff in die Untereinheiten und analysiert nach der Reaktivierung die vorhandenen Proteine, so findet man ein neues Protein, dessen elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit zwischen den Werten der ursprünglichen Enzyme liegt<sup>[24]</sup>. Es handelt sich wohl um das Hybridenzym, denn in dieser Proteinzone wird die Umsetzung sowohl von Kreatin als auch Arginin zu den entsprechenden phosphorylierten Produkten nach Gleichung (3) katalysiert, während die Ausgangs-



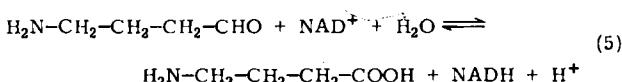
$\text{R} = \text{COO}^\ominus$ ,  $\text{R}' = \text{CH}_3$ : Kreatin  
 $\text{R} = (\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COO}^\ominus$ ,  $\text{R}' = \text{H}$ : Arginin

enzyme nur je eines der beiden Substrate umsetzen. Allerdings muß aus den gleichen Gründen, die bei der Chimäre der Phosphatase angeführt wurden, die Umsetzung beider Substrate in der Proteinzone nicht unbedingt auf das Hybrid selbst zurückzuführen sein.

Hybridisierungen zwischen Untereinheiten von Enzymen verschiedener Spezifität scheinen sogar *in vivo* vorzukommen. So wurden aus einem *Pseudomonas*-Stamm neben einer Dehydrogenase (EC 1.2.1.24), die Bernsteinsäuresemialdehyd mit  $\text{NAD}^+$  nach Gleichung (4) zu Bernsteinsäure umsetzt, und



einer chromatographisch davon verschiedenen Dehydrogenase (EC 1.2.1.19), die 4-Aminobutanal nach Gleichung (5) mit  $\text{NAD}^+$  in  $\gamma$ -Aminobuttersäure überführt, noch zwei weitere



Dehydrogenasen isoliert, von denen jede *beide* Substrate umsetzen kann. Letztere sind aufgrund ihrer relativen Molekülmassen, ihres Aufbaus aus verschiedenen Untereinheiten und ihrer antigenen Eigenschaften Hybride der beiden zuerst ge-

nannten Enzyme<sup>[25]</sup>. Bemerkenswert ist, daß die Untereinheiten der beiden Elternenzyme trotz des beträchtlichen Unterschieds von ca. 20000 zwischen ihren relativen Molekülmassen in den Hybriden mit der gleichen Stöchiometrie assoziieren.

### 3. Hybride heteropolymerer Enzyme

#### 3.1. Hybride von Enzymen mit zwei verschiedenen Untereinheiten

Bei Hybriden homopolymerer Enzyme ist es aus den in Abschnitt 2.1 diskutierten Gründen sehr schwierig nachzuweisen, daß die Enzymaktivität, die in den elektrophoretisch isolierten Proteinen beobachtet wurde, wirklich den Enzymchimären zukommt. Erst dies würde zeigen, daß auch die heterologen Untereinheiten so spezifisch miteinander assoziieren wie die autologen Untereinheiten in den aktiven Elternenzymen. Die Frage läßt sich mit Hybriden von Enzymen, die aus verschiedenen Untereinheiten (etwa  $\alpha$  und  $\beta$ ) aufgebaut sind, viel leichter beantworten. Hier besitzen nämlich die isolierten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  für sich keine oder eine andere biologische Aktivität als der Gesamtkomplex ( $\alpha\beta$ ). Findet man in einer Mischung etwa der Untereinheit  ${}^a\alpha$  aus der Spezies a mit der Untereinheit  ${}^b\beta$  aus der Spezies b die charakteristische Aktivität des kompletten Elternenzym (  $\alpha\beta$  ), dann ist nachgewiesen, daß die Wechselwirkungen zwischen den heterologen Untereinheiten in der Enzymchimäre ( ${}^a\alpha{}^b\beta$ ) denen in den Elternenzymen ( ${}^a\alpha{}^a\beta$  ) und ( ${}^b\alpha{}^b\beta$  ), soweit sie für die Entstehung der katalytischen Aktivität notwendig sind, entsprechen.

Die bakterielle Tryptophansynthase (EC 4.2.1.20) besteht aus zwei verschieden großen Untereinheiten, die sich leicht voneinander trennen lassen. Die isolierten Untereinheiten sind zwar enzymatisch aktiv, vermögen aber im Gegensatz zum kompletten Enzym nicht die Umsetzung von Indol-3-glycerophosphat mit Serin zu Tryptophan und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zu katalysieren. Es ist gelungen, die beiden Untereinheiten aus einer Reihe von Enterobacteriaceen (z. B. *Escherichia coli*, *Salmonella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*) über die Speziesgrenzen hinweg trotz teilweise beträchtlicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz miteinander zu Hybriden zu vereinigen, welche die Aktivität der kompletten Elternenzyme aufweisen<sup>[26-28]</sup>. In einigen Fällen gelang es sogar, Hybride aus Untereinheiten von Enzymen gramnegativer und grampositiver Mikroorganismen<sup>[29, 30]</sup>, ja sogar von Enzymen aus Bakterien und Grünalgen<sup>[31]</sup> zu bilden.

Aktive Enzymhybride konnten auch aus dem aus zwei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) aufgebauten bakteriellen Anthranilatsynthase-Komplex (EC 4.1.3.27) erhalten werden. Allerdings führt nicht jede Kombination einer Untereinheit aus einem Bakterium a mit einer Untereinheit aus einem anderen Bakterium b zu einem aktiven Hybrid [Gleichungen (6a) und (6b)]. Wenn



ist nicht immer auch



In diesen Versuchen waren die Untereinheiten von Enzymen aus so verschiedenen Klassen der Eubakterien wie *Bacillus*,

*Pseudomonas*, *Acinetobacter* oder *Enterobacter* miteinander inkubiert worden<sup>[32–36]</sup>. Daß nicht immer enzymatische Aktivität entsteht, zeigt, daß die biologische Diversifikation doch auch zu Veränderungen an den für die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten wesentlichen Bereichen der Polypeptidketten führen kann.

Selbst aus bakteriellen Proteinkomplexen, in denen eine Untereinheit die gesamte Reaktion katalysiert, während die andere Untereinheit nur die Bindungsstelle eines allosterischen Effektors trägt, lassen sich *in vitro* Chimären gewinnen, die ähnlich den Elternenzymen allosterisch reguliert werden können. Dies wird durch die Bildung von zwei aktiven Hybriden der Aspartat-Transcarbamylase (EC 2.1.3.2) mit allosterischer Kontrolle aus den isolierten Untereinheiten von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* bewiesen<sup>[37]</sup>.

Den Beispielen aus dem Reich der Prokaryonten lassen sich Enzymchimären aus heteropolymeren Enzymen zur Seite stellen, die in Eukaryonten vorkommen. So können die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten des Hämoglobins aus so verschiedenen Vertebraten wie Elefant, Esel, Maus und Frosch miteinander zu Hybriden assoziieren<sup>[38]</sup>, die, soweit geprüft, die charakteristische protonenabhängige Sauerstoffaufnahme des kompletten Tetramers zeigen<sup>[39]</sup>.

### 3.2. Hybride von Enzymen mit mehreren verschiedenen Untereinheiten

#### 3.2.1. Hybride der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Eine über besonders weite Bereiche sich erstreckende, genaue Paßform und damit sehr enge und spezifische Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten dürfen wir bei solchen Proteinen erwarten, die aus mehreren verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut sind und die unter biologischen Milieubedingungen nicht dissoziieren.

Ein Beispiel hierfür ist die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6). Dieses Enzym katalysiert die Synthese von RNA aus Ribonucleosidtriphosphaten, gesteuert durch eine als Matrize wirkende DNA. Das Enzym wird aus Bakterien in der Regel als Komplex aus vier verschiedenen Proteinuntereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\sigma$  mit der stöchiometrischen Zusammensetzung  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  isoliert. Nur die Untereinheit  $\sigma$  läßt sich in einigen Fällen schon ohne aggressivere Maßnahmen durch Ionenaustauschchromatographie vom Gesamtkomplex abtrennen. Der Restkomplex mit der stöchiometrischen Zusammensetzung  $\alpha_2\beta\beta'$  ist dagegen so stabil, daß er nur in Netzmitteln wie Dodecylsulfat oder in 6 M Harnstoff dissoziert. Keine der isolierten Untereinheiten zeigt irgendeine enzymatische Aktivität. Aus diesem Grund kann auch nicht geprüft werden, ob sich die Funktion einer einzelnen Untereinheit im katalysierenden Gesamtkomplex von Bakterienart zu Bakterienart ändert. Daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase keineswegs in allen Organismen proteinchemisch gleich oder auch nur ähnlich ist, erkennt man aus dem Vergleich der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* mit dem Enzym aus einigen Bakteriophagen oder aus Mitochondrien, das nur eine einzige Polypeptidkette enthält<sup>[40–43]</sup>. Aber auch schon bei Bakterien sind zwischen den Untereinheiten aus verschiedenen Spezies deutliche Unterschiede in der Größe (Tabelle 1) und in der Ladung zu beobachten<sup>[44, 45]</sup>. Ebenso sind die bakteriellen RNA-Polymerasen auch in ihren antigenen Eigenschaften sehr verschieden. So reagiert weder das Enzym aus *Escherichia coli* mit

dem Antikörper gegen das Enzym aus *Micrococcus luteus*, noch das *Micrococcus*-Enzym mit dem Antikörper gegen das *Coli*-Enzym<sup>[45a]</sup>.

Tabelle 1. Relative Molekülmassen der Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* und *Micrococcus luteus* [45].

Untereinheit	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>
kleinste Untereinheit ( $\alpha$ )	39000	44000
mittelgroße Untereinheit ( $\sigma$ )	95000	80000
zweitgrößte Untereinheit ( $\beta$ )	155000	146000
größte Untereinheit ( $\beta'$ )	165000	151000

Dennoch erlaubt der Vergleich der physikalischen Daten keinen Vergleich der Funktionen der Untereinheiten. In solchen Fällen kann nur der gegenseitige Austausch der Untereinheiten die funktionelle Äquivalenz beweisen. Ein solcher Austausch wurde bei zwei Bakterien, die aufgrund der Zusammensetzung ihrer DNA und aller anderen taxonomischen Kriterien sehr verschieden sind, nämlich dem gramnegativen *Escherichia coli* und dem grampositiven *Micrococcus luteus*, eingehend untersucht. Es gelang, in der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta'$  und  $\sigma$  durch die ähnlichen, aber nicht gleich großen Untereinheiten des *Micrococcus*-Enzyms zu ersetzen; mit diesen Enzymchimären konnte eine DNA-abhängige RNA-Synthese beobachtet werden. In gleicher Weise führte der Ersatz der kleinsten und der zweitgrößten Untereinheit in der *Micrococcus-luteus*-Polymerase durch Untereinheiten des *Escherichia-coli*-Enzyms zu aktiven Enzymchimären (Tabelle 2)<sup>[45, 46]</sup>. – Versuche, aktive Hybride zu erhalten, die neben der größten Untereinheit aus *Escherichia coli* die zweitgrößte aus *Micrococcus luteus* enthalten, schlugen bisher fehl.

Tabelle 2. Austausch der Untereinheiten der RNA-Polymerasen aus *Escherichia coli* und *Micrococcus luteus* [45, 46]. +: Bildung einer katalytisch aktiven Chimäre; -: keine Enzymaktivität nachweisbar.

Untereinheit ausgetauscht	in der <i>E.-coli</i> -RNA-Polymerase	in der <i>M.-luteus</i> -RNA-Polymerase
kleinste Untereinheit ( $\alpha$ )	+	+
mittelgroße Untereinheit ( $\sigma$ )	+	-
zweitgrößte Untereinheit ( $\beta$ )	-	+
größte Untereinheit ( $\beta'$ )	+	-

Die entstandenen Chimären sind, bezogen auf die Menge des eingesetzten Proteins, unterschiedlich aktiv. Ob die in manchen Fällen geringe Aktivität auf eine ungünstige Lage des Assoziationsgleichgewichts zwischen den Untereinheiten zurückzuführen ist oder ob der gebildete Hybridkomplex eine geringe spezifische Aktivität besitzt, ist noch nicht entschieden. Hier wie bei allen anderen Beispielen intergenerischer Enzymhybride steht die genaue, vor allem auch physikalisch-chemische Charakterisierung noch aus.

Die verschiedenen Untereinheiten müssen in beiden Bakterien im Verlauf der Katalyse der RNA-Synthese jeweils ähnliche Funktionen wahrnehmen. Andernfalls wäre die Beobachtung nicht zu verstehen, daß jede Untereinheit mindestens in einem der beiden Enzyme durch eine entsprechende Untereinheit aus dem anderen Bakterium ersetzt werden kann. Außerdem kann jede Untereinheit nur eine einzige Untereinheit in der Polymerase des anderen Bakteriums ersetzen. Damit ist eine

eindeutige funktionelle Zuordnung der Untereinheiten aus beiden Bakterien gegeben. Bei der divergierenden Entwicklung der beiden Bakterienstämme kann somit kein Übergang von funktionellen Aufgaben bei der RNA-Synthese von einer Polymerase-Untereinheit auf eine andere erfolgt sein.

Die Austauschbarkeit der Untereinheiten zwischen verschiedenen Arten von Bakterien ist ein starkes Indiz dafür, daß nicht nur die Funktion, sondern auch die für die gegenseitige spezifische Assoziation erforderliche Paßform der Untereinheiten sehr ähnlich ist. Andernfalls wäre die Bildung funktions tüchtiger Enzymchimären kaum zu verstehen. Die Ähnlichkeit der einander entsprechenden Untereinheiten aus verschiedenen Bakterien ist so groß, daß sich sogar Mutationen in den Untereinheiten über die taxonomischen Grenzen hinweg auswirken können. So bewirkt z. B. eine Mutation im Gen der  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*, daß dieses Enzym durch das Antibioticum Rifampicin nicht mehr gehemmt wird<sup>[47]</sup>. Baut man diese mutierte Untereinheit in die rifampicin-empfindliche RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus* ein, so ist die gebildete Enzymchimäre resistent gegenüber dem Antibioticum<sup>[45]</sup>.

Hybridisierungen des Restkomplexes  $\alpha_2\beta\beta'$  mit der Untereinheit  $\sigma$  gelangen zwischen so verschiedenen Bakterien wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Micrococcus luteus*<sup>[45, 46, 48 – 52]</sup>. Der Erfolg läßt sich leicht am Entstehen der für das komplett Enzym  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  charakteristischen enzymatischen Aktivität erkennen. Sogar in den Chloroplasten der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ein Protein entdeckt, das auf den Restkomplex  $\alpha_2\beta\beta'$  der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* wie dessen  $\sigma$ -Untereinheit wirkt<sup>[53]</sup>.

Wenn die Untereinheit  $\sigma$  eines Bakteriums a mit dem heterologen Restkomplex eines anderen Bakteriums b reagiert, dann bildet nicht immer auch die Untereinheit  $\sigma$  des Bakteriums b mit dem Restkomplex aus a eine aktive Enzymchimäre. Man kann diese Beobachtung dazu benutzen, mit Hybriden zu prüfen, welche Untereinheit im Restkomplex  $\alpha_2\beta\beta'$  für die Wirkung von  $\sigma$  besonders wichtig ist. Demnach ist in *Escherichia coli* für die Wirkung von  $\sigma$  die Untereinheit  $\beta'$  wesentlich<sup>[45]</sup>, denn nur, wenn ein RNA-Polymerase-Hybrid die  $\beta'$ -Untereinheit aus *Escherichia coli* enthält, kann  $\sigma$  aus *Escherichia coli* den Restkomplex  $\alpha_2\beta\beta'$  zur aktiven Polymerase ergänzen<sup>[45]</sup>. Alle diese Ergebnisse stützen die Vorstellung von einer prinzipiell gleichartigen Organisation des RNA-Synthesystems bei Bakterien.

### 3.2.2. Hybride bakterieller Ribosomen

Ähnliche Beobachtungen wie mit der RNA-Polymerase wurden mit Ribosomen aus Bakterien gemacht. Ribosomen katalysieren die Synthese von Proteinen aus aktivierten Aminosäuren an der mRNA unter Beteiligung mehrerer „löslicher“ Proteine. Ribosomen bestehen aus einer größeren und einer kleineren Untereinheit, die sich ihrerseits aus RNA und 34 bzw. 20 Polypeptiden zusammensetzen. Schon 1966 wurde beobachtet, daß sich die beiden Ribosomenuntereinheiten aus grampositivem *Bacillus subtilis* und grammnegativem *Escherichia coli* kreuzweise hybridisieren lassen<sup>[54]</sup>. Die funktionelle Äquivalenz der Untereinheiten und ihre für die katalytisch aktiven Wechselwirkungen notwendigen Kontaktflächen müssen also bei der Evolution der Ribosomenstruktur erhalten geblieben

sein. Die funktionelle Verwandtschaft reicht sogar bis zu den einzelnen Proteinen, denn es ist bei der Rekonstitution der kleineren Ribosomen-Untereinheit aus den isolierten Proteinen und der RNA gelungen, nahezu jedes ribosomale *Escherichia coli*-Protein durch ein äquivalentes Protein aus *Bacillus stearothermophilus* zu ersetzen, obwohl einige der *Bacillus stearothermophilus*-Proteine nach Aminosäurezusammensetzung, Verhalten in der Elektrophorese und immunchemischen Kriterien ganz verschieden von den entsprechenden *Escherichia coli*-Proteinen sind<sup>[55]</sup>.

Einige ribosomale Proteine sind für speziesspezifische Besonderheiten verantwortlich, die sich beispielsweise bei der Proteinsynthese an der RNA des Bakteriophagen R 17 bemerkbar machen. Solche Besonderheiten treten auch in den Chimären beim Einbau dieser Proteine in heterologe Ribosomen auf<sup>[56, 57]</sup>. Im übrigen lassen sich nicht nur ribosomale Proteine, sondern auch ribosomale RNA zwischen den Ribosomen verschiedener Bakterien austauschen<sup>[58]</sup>.

### 3.2.3. Hybridisierungen mit „löslichen“ Proteinfaktoren

An der Proteinsynthese sind außer den Ribosomen noch „lösliche“ Proteinfaktoren beteiligt, die auf die an den Ribosomen ablaufenden Vorgänge wirken. „Lösliche“ Proteine aus verschiedenen Bakterien waren trotz eindeutiger immunchemischer Unterschiede an heterologen Ribosomen wirksam<sup>[59 – 62]</sup>. Diese Feststellung gilt übrigens nicht nur für das Proteinsynthesesystem aus Prokaryonten, sondern auch für das aus Eukaryonten<sup>[63, 64]</sup>. In Verbindung mit dem Nachweis von Chimären der RNA-Polymerase und der Ribosomen legen alle diese Versuche nahe, daß bei den Prokaryonten das gesamte Transkriptions- und Translationssystem trotz der nachgewiesenen Unterschiede zwischen den Komponenten aus verschiedenen Bakterien funktionell gleichartig aufgebaut ist.

Auch in anderen komplexen Biosynthesesystemen hat man ein Zusammenwirken von Proteinen sehr verschiedener Herkunft aufzeigen können. So kann z. B. im Multienzymsystem der Fettsäuresynthese von *Escherichia coli* das Acylcarrierprotein durch das analoge Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* oder aus den Chloroplasten des Mesoderms der Avocadobirne ersetzt werden<sup>[65]</sup>. Im Bereich der Vertebraten ist das für die Muskelkontraktion notwendige Vielkomponentensystem zu nennen. In ihm kann z. B. die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Troponin-Untereinheit des Kaninchens durch ein entsprechendes Protein aus einer Krabbe ersetzt werden<sup>[66]</sup>.

## 4. Hybride zwischen Proteinen aus Pro- und Eukaryonten

Zwischen den zellkernlosen Prokaryonten und den zellkernhaltigen Eukaryonten scheint in der Natur eine tiefe Kluft zu bestehen<sup>[67]</sup>. Damit stellt sich die Frage, wie weit Protein-Untereinheiten ihre Funktion und vielleicht sogar ihre Fähigkeit zum funktionellen Zusammenwirken über die Grenze zwischen den Prokaryonten und Eukaryonten bewahrt haben. Assoziationsbildung wurde zwischen den Untereinheiten der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* und Kaninchen oder Schwein beobachtet<sup>[23]</sup>. Gleichermaßen wurde für die Untereinheiten der Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) aus *Bacillus stearothermophilus* und Huhn berichtet<sup>[23]</sup>. Auch an Ribosomen liegen erste Untersuchungen vor.

Die Ribosomen-Untereinheiten von Eukaryonten sind deutlich größer als die entsprechenden Untereinheiten aus Bakterien. Dennoch kann die kleine Ribosomen-Untereinheit der Krabbe *Artemia salina*, eines Eukaryonten, mit der großen Ribosomen-Untereinheit aus *Escherichia coli* zu einer wenn auch begrenzten funktionellen Wechselwirkung (nämlich nur in der Katalyse der von Polyuridylsäure abhängigen Dipeptidsynthese) zusammenwirken. Die physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen diesen phylogenetisch derart verschiedenen Untereinheiten sind sehr schwach. Zum Nachweis der Assoziation wurde während der Dipeptidsynthese Glutaraldehyd als Vernetzungsreagens zugegeben; die so durch kovalente Verbrückung stabilisierten Hybridribosomen ließen sich durch ihre Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge nachweisen<sup>[68]</sup>. In einem anderen Fall konnte das Zusammenwirken der kleinen eukaryotischen Ribosomen-Untereinheit aus *Chlorella* mit der großen Untereinheit aus Bakterien durch die risosomenabhängige Synthese von Guanosintetra- und -pentaphosphat nachgewiesen werden<sup>[69]</sup>.

Schließlich gelang es, zwei saure ribosomale Proteine aus eukaryotischen Ribosomen der Hefe abzutrennen und durch zwei ribosomale Proteine aus *Escherichia coli* funktionell zu ersetzen<sup>[70]</sup>. In diesem Fall besteht allerdings eine immunologisch nachweisbare Verwandtschaft<sup>[71]</sup>.

## 5. Schlußfolgerungen

Den zahlreichen Beispielen für Enzymchimären, die sich *in vitro* bilden können, lassen sich andere zur Seite stellen, die *in vivo*, etwa bei der Kreuzung genetisch verwandter Hefen<sup>[72]</sup> oder nach der Fusion somatischer Zellen so verschiedener Herkunft wie Hamster, Maus, Mensch oder Ratte<sup>[73]</sup>, entdeckt wurden. Selbst hybride Immunglobuline, die aus Polypeptidketten von Maus und Mensch aufgebaut sind, wurden beobachtet<sup>[74]</sup>. Der Austausch von Untereinheiten zwischen Proteinen aus verschiedenen Organismen ist somit kein Sonderfall. Ihm kommt vielmehr im Gesamtbereich des Lebendigen allgemeine Bedeutung zu.

Wie kann man verstehen, daß Untereinheiten sehr verschiedener Herkunft, die in ihrer Länge, ihrer Aminosäurezusammensetzung und -sequenz sowie in ihren antigenen Eigenschaften sehr verschieden sind, sich in oligomeren Enzymen gegenseitig ersetzen können? Untersuchungen, besonders am Hämoglobin<sup>[75]</sup>, haben gezeigt, daß für ein Zusammenwirken verschiedener Polypeptidketten in einem Aggregat genau zueinander passende Kontaktflächen Voraussetzung sind. Demnach muß man vermuten, daß Untereinheiten in oligomeren Enzymen die für die gegenseitigen Wechselwirkungen notwendigen Bereiche wie auch ihre für die katalysierte Gesamtreaktion notwendige Funktion über die Speziesgrenzen bewahren.

Erste Hinweise hierfür brachten vergleichende immunchemische Untersuchungen<sup>[75]</sup>. Sehr stark wird diese Vermutung durch röntgenstrukturanalytische Untersuchungen gestützt. So besitzen beispielsweise das Pottwal-Myoglobin und das Hämoglobin einer Insektenlarve, die sich in mehr als 80 % der Aminosäuresequenz unterscheiden, nahezu übereinstimmende Raumstrukturen<sup>[76, 77]</sup>. Eine gute Stütze ist auch die Beobachtung, daß die Raumstruktur der aus vier gleichen Untereinheiten aufgebauten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase eines Bakteriums nahezu identisch ist mit der des gleichen Enzyms aus Hummer, obwohl sich auch diese beiden Enzyme

beträchtlich in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden<sup>[78]</sup>. Andere funktionell verwandte, aber phylogenetisch verschiedene Proteine besitzen ebenfalls sehr ähnliche Strukturbereiche<sup>[79]</sup>. Für die Funktion ist offenbar die Raumstruktur wichtiger als die Aminosäuresequenz. Man kann hiernach Enzyme nicht nur nach ihrer Funktion, sondern auch nach ihrer dreidimensionalen Gestalt klassifizieren.

Die Ursache dafür, daß Proteine mit verschiedener Aminosäurezusammensetzung sehr ähnlich gefaltet sein können, liegt darin, daß viele Aminosäuren ähnlichen Einfluß auf die Raumstruktur haben. So üben beispielsweise Threonin und Serin oder Valin, Leucin und Isoleucin ähnliche Wirkungen auf die Faltung einer Polypeptidkette aus<sup>[80]</sup>. Sie können sich daher in vielen Fällen ohne große Änderung der Faltung gegenseitig ersetzen. Die evolutionsbedingten Veränderungen in der Aminosäuresequenz von speziesverschiedenen Proteinen gleicher Funktion sind offenbar nur dadurch eingegrenzt, daß sich der für die Funktion wesentliche Teil der Raumstruktur nicht ändern darf. Damit wird auch die Existenz von Enzymchimären verständlich. Wenn sich nämlich die Faltung der Polypeptidketten im Verlauf der Evolution so wenig geändert hat, dann passen auch Untereinheiten von Enzymen gleicher katalytischer Wirksamkeit über Speziesgrenzen hinweg räumlich zueinander. Die Paßform wird so gut konserviert, daß es zur Assoziatbildung und in vielen Fällen auch zu einer katalytisch aktiven Kooperation kommen kann.

*Die in diesem Aufsatz erwähnten Untersuchungen unseres Laboratoriums wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.*

Eingegangen am 11. September 1975 [A 103]

- [1] M. O. Dayhoff: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Vol. 5. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. 1972.
- [2] C. L. Markert: *Isozymes*. Vol. 1. Academic Press, New York 1975.
- [3] C. B. Anfinsen u. H. A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* 29, 205 (1975).
- [4] D. W. Darnall u. I. Klotz, *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 651 (1975).
- [5] J. W. Teipel u. D. E. Koshland, jr., *Biochemistry* 10, 792 (1971).
- [6] R. A. Cook u. D. E. Koshland, jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 247 (1969).
- [7] H. Morimoto, H. Lehmann u. M. F. Perutz, *Nature* 232, 408 (1971).
- [8] C. Levinthal, E. R. Signer u. K. Fetherolf, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 1230 (1962).
- [9] S. M. Constantinides u. W. C. Deal, jr., *J. Biol. Chem.* 244, 5695 (1969).
- [10] A. J. Cornish-Bowden u. D. E. Koshland, jr., *J. Biol. Chem.* 246, 3092 (1971).
- [11] H. H. Osborne u. M. R. Hollaway, *Biochem. J.* 143, 651 (1974).
- [12] E. Penhoet, M. Kochman, R. Valentine u. W. J. Rutter, *Biochemistry* 6, 2940 (1967).
- [13] U. Rensing, A. Schmid, P. Christen u. F. Leuthardt, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 1001 (1967).
- [14] O. Brenner-Holzach u. F. Leuthardt, *Helv. Chim. Acta* 52, 1273 (1967).
- [15] M. Kochman u. D. Kwiatkowska, *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 856 (1972).
- [16] S. N. Salthe, O. P. Chilson u. N. O. Kaplan, *Nature* 207, 723 (1965).
- [17] C. L. Markert u. E. J. Massaro, *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 417 (1966).
- [18] G. F. Sensabaugh, jr. u. N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* 247, 585 (1972).
- [19] K. Kirschner u. I. Schuster in H. Sund: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*. Springer, Berlin 1970, S. 225f.
- [20] G. L. M. Spotorno u. M. R. Hollaway, *Nature* 226, 756 (1970).
- [21] M. Kochman, J. Golebiowska, T. Baranowski, J. R. Dedman, D. W. Fodge u. B. G. Harris, *FEBS Lett.* 41, 104 (1974).
- [22] H. G. Lebherz, B. Savage u. E. Abacherli, *Nature New Biol.* 245, 269 (1973).
- [23] K. Suzuki u. J. I. Harris, *J. Biochem.* 77, 587 (1975).
- [24] D. C. Watts, *Nature New Biol.* 237, 51 (1972).
- [25] M. S. Rosemblatt, D. M. Callewaert u. T. T. Chen, *Biochemistry* 13, 4176 (1974).
- [26] E. Balbinder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 770 (1964).
- [27] T. M. Murphy u. S. E. Mills, *J. Bacteriol.* 97, 1310 (1969).
- [28] V. Rocha, I. P. Crawford u. S. E. Mills, *J. Bacteriol.* 111, 163 (1972).

- [29] S. O. Hoch, J. Biol. Chem. 248, 2992 (1973).  
 [30] S. O. Hoch u. I. P. Crawford, J. Bacteriol. 116, 685 (1973).  
 [31] K. Sakaguchi, Biochem. Biophys. Acta 220, 580 (1970).  
 [32] J. Ito, Nature 223, 57 (1969).  
 [33] S. F. Queener u. J. C. Gunsalus, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1225 (1970).  
 [34] F. Rohr u. W. L. Betsch, Biochem. Biophys. Acta 285, 243 (1972).  
 [35] N. Patel, W. M. Holmes u. J. F. Kane, J. Bacteriol. 114, 600 (1973).  
 [36] R. V. Savula u. I. P. Crawford, J. Biol. Chem. 248, 3573 (1973).  
 [37] G. A. O'Donovan, H. Holoubek u. J. C. Gerhart, Nature New Biol. 238, 264 (1973).  
 [38] A. E. Herner u. A. Riggs, Nature 198, 35 (1963).  
 [39] A. Riggs u. A. E. Herner, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1664 (1962).  
 [40] M. Chamberlin, J. McGrath u. L. Waskell, Nature 228, 227 (1970).  
 [41] J. J. Dunn, F. A. Bautz u. E. K. F. Bautz, Nature New Biol. 230, 94 (1971).  
 [42] H. C. Towle, J. F. Jolly u. J. A. Boezi, J. Biol. Chem. 250, 1723 (1975).  
 [43] H. Küntzel u. K. P. Schäfer, Nature New Biol. 231, 265 (1971).  
 [44] M. J. Chamberlin in P. D. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Vol. 10. Academic Press, New York 1974, S. 333ff.  
 [45] U. I. Lill, E. M. Behrendt u. G. R. Hartmann, Eur. J. Biochem. 52, 411 (1975).  
 [45a] C. Leib u. G. R. Hartmann, unveröffentlicht.  
 [46] U. I. Lill, E. M. Behrendt u. G. R. Hartmann, unveröffentlicht.  
 [47] A. Heil u. W. Zillig, FEBS Lett. 11, 165 (1970).  
 [48] H. R. Whiteley u. H. E. Hemphill, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 647 (1970).  
 [49] V. G. Nikiforov, FEBS Lett. 16, 74 (1971).  
 [50] R. G. Shorestein u. R. Losick, J. Biol. Chem. 248, 6170 (1973).  
 [51] B. Rexer, V. R. Srinivasan u. W. Zillig, Eur. J. Biochem. 53, 271 (1975).  
 [52] E. Domingo, C. Escarmis u. R. C. Warner, J. Biol. Chem. 250, 2866 (1975).  
 [53] S. J. Surzycki, persönliche Mitteilung (1975).  
 [54] M. Takeda u. F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 1875 (1966).  
 [55] K. Higo, W. Held, L. Kahan u. M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 944 (1973).  
 [56] W. A. Held, W. R. Gette u. M. Nomura, Biochemistry 13, 2115 (1974).  
 [57] M. L. Goldberg u. J. Argetsinger-Stevitz, Biochemistry 13, 2123 (1974).  
 [58] M. Nomura, P. Traub u. H. Bechmann, Nature 219, 793 (1968).  
 [59] J. Lucas-Lenard u. F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1562 (1966).  
 [60] J. Gordon, M. Schweiger, I. Krisko u. C. A. Williams, J. Bacteriol. 109, 1 (1969).  
 [61] I. Ciferri, B. Parisi, A. Perani u. M. Grandi, J. Mol. Biol. 37, 529 (1968).  
 [62] B. Parisi, G. Milanesi, J. L. van Etten, A. Perani u. O. Ciferri, J. Mol. Biol. 28, 295 (1967).  
 [63] L. Felicetti u. F. Lipmann, Arch. Biochem. Biophys. 125, 548 (1968).  
 [64] I. Krisko, J. Gordon u. F. Lipmann, J. Biol. Chem. 244, 6117 (1969).  
 [65] R. D. Simoni, R. S. Cridle u. P. K. Stumpf, J. Biol. Chem. 242, 573 (1967).  
 [66] W. Lehman, Nature 255, 424 (1975).  
 [67] R. Y. Stanier, M. Doudoroff u. E. A. Adelberg: The Microbial World. 2. Aufl. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1963, S. 65ff.  
 [68] H. A. Klein u. S. Ochoa, J. Biol. Chem. 247, 8122 (1972).  
 [69] J. Si, N.-H. Chua, Y. Ogawa u. F. Lipmann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 611 (1974).  
 [70] D. Richter u. W. Möller in D. Richter: Lipmann Symposium: Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology. de Gruyter, Berlin 1974, S. 524.  
 [71] G. Stöffler, I. G. Wool, A. Lin u. K. H. Rak, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4723 (1974).  
 [72] L. W. Fleming u. J. D. Duerksen, J. Bacteriol. 93, 142 (1967).  
 [73] F. H. Ruddle, Adv. Hum. Genet. 3, 173 (1973).  
 [74] J. Schwaber u. E. P. Cohen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2203 (1974).  
 [75] C. A. Wright: Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals. Academic Press, New York 1974.  
 [76] G. Buse, S. Braig u. G. Braunitzer, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 1686 (1969).  
 [77] R. Huber, O. Epp u. H. Formanek, J. Mol. Biol. 42, 591 (1969).  
 [78] M. F. Perutz u. H. Raidl, Nature 255, 256 (1975).  
 [79] M. Bühlner, G. C. Ford, D. Moras, K. W. Olson u. M. Rossmann, J. Mol. Biol. 90, 25 (1974).  
 [80] R. E. Dickerson u. I. Geis: Struktur und Funktion der Proteine. Verlag Chemie, Weinheim 1971.

## Zur Biosynthese der Purpurnembran von Halobakterien

Von Manfred Sumper, Heribert Reitmeier und Dieter Oesterhelt<sup>[\*]</sup>

Professor Feodor Lynen zum 65. Geburtstag gewidmet

Halobakterien sind extrem spezialisierte Organismen. Sie leben nur in gesättigten Kochsalzlösungen. In der Zellmembran dieser Bakterien sind inselförmige Membranbereiche nachweisbar, die sich durch Membranfraktionierung isolieren lassen. Diese Bereiche bestehen aus einer Lipidmatrix, in die Bacteriorhodopsinmoleküle in hexagonal-kristalliner Anordnung eingelagert sind. Bacteriorhodopsin ist ein tiefpurpurfarbener Retinal-Protein-Komplex („Purpurnembran“). Die Purpurnembran funktioniert als Licht-Energie-Wandler. – Wie kann ein solcher differenzierter Membranbereich entstehen? Bei in-vivo-Versuchen zur Biosynthese der Purpurnembran erwies sich eine andere Zellmembranfraktion, die Braune Membran, als biosynthetische Vorstufe. Bacterioopsin (das retinal-freie Protein) wird zunächst in die Braune Membran eingebaut und kann erst nach Reaktion mit Retinal in einer energieabhängigen Reaktion „zur Purpurnembran auskristallisieren“. Diese Reaktion ist umkehrbar. Ablösen des Retinals durch Retinaloximbildung löst die Purpurnembranbereiche wieder auf. Rekonstitution des Bacteriorhodopsins durch Retinalzugabe führt zu erneuter Bildung der Purpurnembran.

### 1. Einleitung

Die Untersuchung biologischer Membransysteme hat in den letzten zehn Jahren zu einem weitgehend akzeptierten Modell der Membranstruktur geführt, das unter dem Namen Flüssig-Mosaik-Modell bekannt wurde<sup>[1]</sup>. Im Prinzip beschreibt dieses Modell eine Membran als Lösung von orientier-

ten Proteinmolekülen in einer zweidimensionalen Lipidmatrix. Diese Vorstellung lässt eine weitgehend freie Diffusion nicht nur der Lipidmoleküle, sondern auch der Membranproteine in der Ebene der Membran erwarten.

Diesem Normalfall stehen Spezialfälle gegenüber, bei denen das Membranprotein einen zweidimensionalen Kristallverband bildet. Ein solcher Fall ist in der Zellmembran von Halobakterien verwirklicht. Dort bildet Bacteriorhodopsin, der Retinal-Protein-Komplex, ein kristallines Gitter, das in der intakten Zelle nachweisbar ist<sup>[2, 3]</sup>. Diese kristallinen Berei-

[\*] M. Sumper, H. Reitmeier und D. Oesterhelt  
Institut für Biochemie der Universität  
Röntgenring 11, 8700 Würzburg