

# ANGEWANDTE CHEMIE

96. Jahrgang 1984  
Heft 6  
Seite 385-454

## Proteinfaltung und Proteinassoziation

Von Rainer Jaenicke\*

*Professor Max F. Perutz zum 70. Geburtstag gewidmet*

Die Biosynthese von Proteinen führt zu linearen Kettenmolekülen mit streng definierter Reihenfolge der Aminosäurebausteine. Diese ist aufgrund des genetischen Codes auf der Ebene der Nucleinsäure durch die Nucleotidsequenz des zugehörigen Gens festgelegt. Denaturierungs-Renaturierungs-Experimente legen die These nahe, die in der Polypeptidkette vorgegebene eindimensionale Information determiniere die dreidimensionale Struktur vollständig. Demnach sollte ein „Faltungscode“ existieren, der das spontane Zustandekommen der thermodynamisch stabilen „nativen“ Struktur bestimmt. Der Prozeß der Faltung (*in vivo* wie *in vitro*) ist trotz der astronomisch großen Zahl möglicher Konformationen ein schneller Vorgang. Der Faltungsmechanismus muß daher kinetisch kontrolliert sein. Die Frage, ob die native Struktur letztlich ein „lokales“ oder das „globale“ Minimum der Energiehyperfläche besetzt, bleibt offen. Oberhalb einer kritischen Molekülgöße liegen Proteine als Molekülassoziate vor. Die Einheitlichkeit der „Quartärstruktur“ setzt eine enge Korrelation von Faltung und Assoziation sowie Spezifität voraus; beides wird durch Rekonstitutionsexperimente *in vitro* bestätigt.

### 1. Einleitung

Proteine sind, wie der Name andeutet, Hauptbestandteil der Zelle. Ihre zentrale Bedeutung röhrt von der Vielfalt ihrer biologischen Funktionen her, die sich in einer entsprechenden Vielfalt von Strukturen widerspiegelt. Die individuellen Strukturen werden durch die spezifische Aufeinanderfolge der Aminosäuren entlang der linearen Polypeptidkette bestimmt, die ihrerseits durch die homologe Nucleotidsequenz der korrespondierenden Nucleinsäure codiert ist. Offenbar bestehen auf dem Weg vom Gen zum funktionellen Produkt seiner Expression zwei informationsübertragende „Codes“: Der „genetische Code“ übersetzt ein gegebenes Polynucleotid in das entsprechende Polypeptid, und der „Code der Proteinfaltung“ legt fest, wie

die eindimensionale Information der Buchstabenfolge des Aminosäure-Alphabets in die dreidimensionale Struktur eines individuellen Strukturproteins oder Enzyms umgesetzt wird. Während der genetische Code als universeller Triplettscode aufgeklärt ist und man die Bedeutung seiner 64 Buchstabenkombinationen versteht, liegt der Code der Proteinfaltung noch völlig im Dunkeln. Gesichert ist, daß die Faltung spontan und autonom, d. h. ohne katalytische oder andere zelluläre Faktoren verläuft. Dies wird durch den Befund bestätigt, daß die Bildung der nativen Struktur von Proteinen *in vivo*, sowohl was das Produkt als auch was die Geschwindigkeit der Faltung angeht, durch Denaturierungs-Renaturierungs-Experimente *in vitro* simuliert werden kann<sup>[1,2]</sup>.

Der folgenden Diskussion wird im wesentlichen diese Methode – von Max F. Perutz als „unboiling an egg“ bezeichnet<sup>[3]</sup> – zugrunde gelegt. Begründet ist dies Vorgehen einerseits dadurch, daß die Einzelschritte bei der Faltung der naszierenden Polypeptidkette bisher nicht direkt unter-

\* Prof. Dr. R. Jaenicke

Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie der Universität  
Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg

sucht werden können; andererseits eröffnet die freie Wahl der Variablen im Rekonstitutionsexperiment im Fall von assoziierten, „oligomeren“ oder „multimeren“ Proteinen die Möglichkeit, die Reaktionsschritte erster und zweiter Ordnung zu entkoppeln. Dadurch ergibt sich ein experimenteller Weg zur Analyse der Beziehung von Proteininfaltung und der (diese voraussetzenden) Assoziation zu „Superstrukturen“.

Im folgenden werden einleitend einige Begriffe definiert, die für die systematische Betrachtung von Proteinen wichtig sind. Es folgt eine Diskussion der Zielsetzungen beim Studium der Faltung und Assoziation; schließlich werden beide Phänomene getrennt und in ihrer Beziehung zueinander behandelt.

### 1.1. Hierarchie der Proteinstruktur

Der Begriff „Proteininfaltung“ wird in zwei unterschiedlichen Bedeutungen verwendet: 1. zur Kennzeichnung der räumlichen Anordnung (Topologie) der Polypeptidkette im nativen Zustand und 2. zur Kennzeichnung des kinetischen Mechanismus beim Übergang von der ungeordneten (naszierenden) Polypeptidkette zum nativen Zustand des biologisch aktiven Moleküls<sup>[4]</sup>.

Wenngleich im vorliegenden Beitrag „Faltung“ grundsätzlich im Sinne der zweiten Definition verwendet wird, sollen hier zum näheren Verständnis kurz die Prinzipien der räumlichen Struktur von Proteinen (im Sinne der ersten Definition) zusammengefaßt werden<sup>[5,6]</sup>.

Wie aus dem Strukturvergleich von ca. hundert Proteinen hervorgeht, deren dreidimensionale Struktur in den vergangenen 25 Jahren aufgeklärt wurde, lassen sich Proteine durch eine Hierarchie struktureller Ebenen charakterisieren<sup>[7-10]</sup>. Grundlage ist die in der „Primärstruktur“ festgelegte spezifische Aminosäuresequenz der Polypeptidkette. „Sekundär“- und „Supersekundärstruktur“ stehen für die regelmäßige Anordnung des Peptid-Rückgrats in Gestalt von Helices und β-Strukturen einerseits und deren energetisch und topologisch bevorzugten Aggregaten („coiled coils“, β-ξ-β-Einheiten, β-Mäander etc.) andererseits. Die „Tertiärstruktur“ beschreibt die Anordnung der Polypeptidkette im Raum; mit zunehmender Kettenlänge des Proteins enthält sie in zunehmendem Maße strukturelle und/oder funktionelle „Domänen“ als räumlich getrennte Bereiche. Durch die stöchiometrisch und geometrisch definierte Assoziation dreidimensional gefalteter Untereinheiten entsteht schließlich die „Quartärstruktur“. Sie ist oberhalb einer kritischen Molekülgröße als allgemeines Strukturprinzip anzusehen und schlägt in biologischen Strukturen die Brücke vom molekularen zum makroskopischen Bereich.

„Faltung“ als Übergang von der eindimensionalen zur dreidimensionalen Struktur umfaßt im gegebenen Begriffs-schema die Bildung der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur; „Assoziation“ bezeichnet das Zustandekommen der nativen Quartärstruktur. Beide Prozesse – Faltung und Assoziation – müssen exakt koordiniert sein, denn die Quartärstruktur wird durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten stabilisiert, und diese Wechselwirkungen setzen die korrekte Bildung der Tangentenflächen zur spezifischen „Erkennung“ voraus. Tatsächlich ist die Spezifität der Assoziation zur nativen Quartärstruktur extrem ausgeprägt (siehe Abschnitt 5.2).

Ob die Faltung in vivo cotranslational oder posttranslational erfolgt, d. h. ob die naszierende Peptidkette bereits am Ribosom oder erst nach Entlassung ins Cytoplasma oder ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums ihre biologisch aktive Form erreicht, ist nicht geklärt<sup>[11]</sup>. Sicher ist, daß Strukturdomänen cotranslational entstehen und daß katalytische Aktivität und antigene Wirkung bereits am Ribosom beobachtet werden; jedoch scheinen sich verschiedene Systeme unterschiedlich zu verhalten<sup>[11-16]</sup>.

Die Frage ist insofern von Bedeutung, als cotranslationale Faltung aufgrund der „vektoriellen“ Protein-Biosynthese schrittweise vom N- zum C-terminalen Ende verlaufen müßte. Dagegen ginge im posttranslationalen Fall die Strukturbildung von der fertig synthetisierten Kette aus. Die Frage liegt nahe, ob der thermodynamisch stabile Zustand des nativen Proteins unter Umständen kinetisch determiniert ist, d. h. ob sich das Produkt der cotranslationalen Faltung von dem der posttranslationalen unterscheidet. Für die These, daß beide Faltungswege zum gleichen Endprodukt führen, d. h. daß die native Struktur tatsächlich ausschließlich durch die Primärstruktur bedingt ist, kann – abgesehen von in-vitro-Rekonstitutionsexperimenten (siehe Abschnitt 3.3) – die chemische Peptidsynthese als Bestätigung dienen: Sowohl bei der Merrifield-Synthese<sup>[17,18]</sup> (die vom C- zum N-Terminus verläuft) als auch bei der semisynthetischen Verknüpfung von Teilesequenzen<sup>[19,20]</sup> scheint die native Struktur zu entstehen.

### 1.2. Ziele

#### 1.2.1. Faltungscode

Angesichts der Wechselbeziehung von Primärstruktur und räumlicher Struktur liegt es nahe, den Versuch zu unternehmen, aus der Fülle der bekannten Strukturen einen „Code“ der Proteininfaltung abzuleiten. Seine praktische Bedeutung ist evident, da man mit seiner Hilfe die dreidimensionale Struktur und die Funktion von Aminosäuresequenzen unbekannter Proteine voraussagen könnte, die durch Klonierung und DNA-Sequenzierung in zunehmendem Maße zugänglich werden. Außerdem sollte er durch chemische Modifikation oder Klonierung gezielte Strukturänderungen von Proteinen („Molekül-Design“) ermöglichen.

Sinnvollerweise wird man in einem ersten Schritt für die Korrelationsanalyse kleine, einkettige Proteine heranziehen und erst in einem zweiten und dritten Schritt Mehr-Domänen-Systeme und mehrketige Systeme. Im letzten Fall werden dabei Strukturprognosen dadurch erschwert, daß Tertiär- und Quartärstruktur durch die gleichen intermolekularen Kräfte stabilisiert werden<sup>[4-8,21-24]</sup>.

#### 1.2.2. Mechanismus und Spezifität

Bei der Bildung der räumlichen Struktur eines Proteins ist die Umgebung (das Lösungsmittel) von zentraler Bedeutung. Die entropisch bedingte Tendenz zum Ausschluß von Wassermolekülen aus hydrophoben Bereichen hat in diesem Zusammenhang drei wichtige Konsequenzen: 1. Tertiär- und Quartärstruktur realisieren einen Zustand dichtester Packung mit unpolaren Seitenketten im Inneren und polaren und ionisierten Seitenketten an der Peripherie des Moleküls. 2. Das Molekülinnere ist (mit Ausnahme

weniger lokalisierte Wassermoleküle) nicht solvatisiert. 3. Assoziation führt zu maximaler struktureller Komplementarität im Bereich der Tangentenflächen zwischen den Untereinheiten. Räumliche Anordnung und intermolekulare Wechselwirkungen in einer gegebenen Quartärstruktur sind daher in hohem Maße spezifisch. Um die Spezifität der Assoziation zu gewährleisten, müssen bei der Bildung der nativen Quartärstruktur Intermediate auftreten, welche die komplementäre Struktur der Untereinheiten „erkennen“ können. Die Analyse derartiger Intermediate eröffnet die Möglichkeit, den komplexen Mechanismus der Quartärstrukturbildung zu analysieren. Mit Hilfe kinetischer Experimente gelingt es dabei, Faltung und Assoziation aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionsordnung zu definieren<sup>[25, 26]</sup>. Die Untersuchung des Reaktionsweges der Assoziation gibt demnach Aufschluß über die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Untereinheiten sowie über deren (sonst unzugängliche) Eigenschaften. Fragen, die hier von Interesse sind, beziehen sich z. B. auf Struktur, Stabilität und katalytische Aktivität „strukturierter“ Monomere oder Dimere einerseits und höher assoziierter nativer Proteine andererseits. Für Enzyme lassen die Ergebnisse Kriterien für die strukturellen Voraussetzungen katalytischer und regulatorischer Funktion erwarten.

### 1.2.3. Analyse komplexer Makrostrukturen

Innerhalb der Hierarchie der Proteinstruktur können die Domänenstruktur einkettiger Proteine oder die Quartärstruktur oligomerer Proteine als Modelle für multimere Systeme höherer Komplexität angesehen werden. Derartige „Makrostrukturen“ sind der hochauflösenden Röntgenstrukturanalyse häufig unzugänglich. Oligomere Systeme bieten hier wesentlich weniger Schwierigkeiten, so daß sie einen Schlüssel zum Verständnis der Strukturprinzipien sowie der Energetik und Kinetik der Assoziation komplexer Systeme liefern können.

Als Beispiel diene Tabakmosaikvirus (TMV;  $M_r \approx 40 \cdot 10^6$ ) (Abb. 1). Das stäbchenförmige Nucleoprotein

stein (Länge  $\approx 300$  nm, Durchmesser  $\approx 18$  nm) besteht aus einer einsträngigen RNA-Spirale (ca. 6400 Nucleotide), die von ca. 2100 Protein-Untereinheiten ( $M_r = 17500$ ) umgeben ist<sup>[27–29]</sup>. Die Strukturaufklärung des kompletten Virions in atomarer Auflösung ist trotz intensiver Bemühungen über mehrere Jahrzehnte hin noch nicht geglückt<sup>[28]</sup>. Sehr wohl gelang jedoch die Analyse der aus 2-17 Proteinuntereinheiten bestehenden RNA-freien Doppelscheiben („double discs“)<sup>[29, 30]</sup>. Sie ergab – abgesehen von der Tertiärstruktur der Protein-Untereinheit – einen Einblick in den Mechanismus der Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkung<sup>[30, 31]</sup>: Nur der Teil der Polypeptidkette, der die RNA nach außen hin abdeckt, erweist sich als strukturiert. Das Loch in der Mitte der Doppelscheibe erscheint wegen des ungeordneten Zustands der Polypeptidkette viel größer als in der Viruspartikel. Mit dem Einbringen der RNA verliert die Kette ihre Flexibilität und „erstarrt“ als Nucleoprotein-Komplex. Das Beispiel belegt nicht nur die Möglichkeit zur strukturellen und mechanistischen Analyse mit Hilfe von oligomeren Intermediaten, sondern illustriert zugleich die molekulare Dynamik der Proteinstruktur, die für die Funktion von grundlegender Bedeutung ist. Was hier nämlich am Beispiel von TMV zutage tritt, gilt grundsätzlich für alle Proteine (Enzyme), insbesondere aber für komplexe Makrostrukturen (Multienzymkomplexe, konjugierte Systeme, z. B. Ribosomen, Phagen oder Strukturelemente in Membranen).

Im Beispiel von TMV erweist sich die Doppelscheibe zumindest *in vitro* als Intermediat der Morphogenese: Die RNA wird als „Haarnadel-Schleife“ in eine Doppelscheibe eingefädelt und in der Folge bidirektional durch Anlagerung weiterer Doppelscheiben (oder Untereinheiten) mit dem „Hüllprotein“ bedeckt<sup>[32, 33]</sup>. Die angedeutete sequenzielle Reaktion hat in thermodynamischer wie kinetischer Hinsicht Modellcharakter<sup>[25]</sup>.

Je komplizierter die Struktur, desto eher erweisen sich streng programmierte Mechanismen für ihren Zusammenbau („assembly“) oder spezifische „morphopoietische Faktoren“ als erforderlich. Dies gilt insbesondere dann,

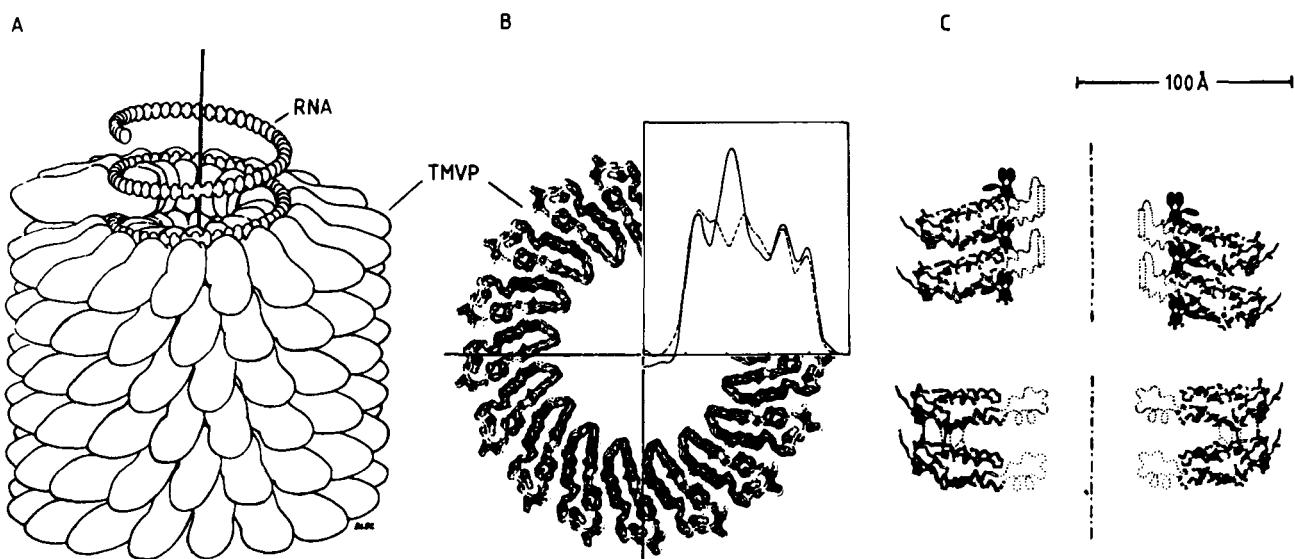


Abb. 1. Tabakmosaikvirus (TMV) als Beispiel einer heterogenen multimeren Quartärstruktur (TMVP = Tabakmosaikvirus-Hüllprotein). A) Ausschnitt von ca. 1/20 der Länge des kompletten Virions [27a]. B) Elektronendichte der Doppelscheibe („double disc“) von TMVP und radiale Dichtevertteilung von TMV (—) und TMVP (— —) [30]. C) Seitenansicht der TMV-Helix (oben) und der Doppelscheibe (unten). Punktiert: Flexible Anteil der Tertiärstruktur [28]. Ausgefüllte Kreise geben die Position der RNA im kompletten Virion an.

wenn kovalente Modifizierungen für die Bildung der Struktur essentiell sind (vgl. Komponenten des Cytoskeletts, Komplementsystem etc.).

## 2. Methoden

Die experimentellen Ergebnisse, die im folgenden diskutiert werden, fußen im wesentlichen auf den üblichen Methoden zur Charakterisierung von Makromolekülen in Lösung (Tabelle 1). Soweit sie sich auf Strukturuntersuchungen *in vitro* beziehen, machen sie sich die Reversibilität

Tabelle 1. Methoden zur Untersuchung von Faltung und Assoziation.

### Gleichgewichtsmessungen

Assoziationszustand	Elektronenmikroskopie, Ultrazentrifugation, (elastische und inelastische) Lichtstreuung, Gelpermeations-Chromatographie, SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (mit und ohne chemische Quervernetzung)
Konformation	Spektroskopie (UV-VIS-Absorption, Fluoreszenz, optische Rotationsdispersion, Circulardichroismus, Kernmagnetische Resonanz), Wasserstoff-Deuterium-(Tritium)-Austausch, Stabilität gegenüber Denaturierung und Proteolyse, Affinität für Liganden (Coenzyme, Substrate etc.) [a], chemische Modifizierung (gruppenspezifische Reaktionen)
Funktion (Aktivität)	Enzymtests, Ligandenbindung (Affinitätschromatographie)
<b>Kinetische Messungen [b]</b>	
Assoziation	Trübung, Lichtstreuung, chemische Quervernetzung, Hybridisierung
Faltung	Spektroskopie (Absorption, Fluoreszenz, Circulardichroismus), Wasserstoff-Deuterium-Austausch, limitierte Proteolyse (Fragment-Analyse durch Gelelektrophorese), Ligandenbindung (Antikörper, allosterische Effekte etc.) [a]
Funktion (Aktivität)	Enzymtests, Ligandenbindung (Coenzyme, Substrate) [a]

[a] Ligandenbindung kann im Sinne eines „induced fit“ zur Verschiebung von Gleichgewichten und zur Stabilisierung von Intermediaten führen und damit Artefakte hervorrufen. [b] Je nach Zeitbereich mittels manueller Mischnung, Stopped-flow, Quench-stopped-flow (Doppelsprungtechnik), Relaxation (T-Sprung, Druck-Sprung, etc.).

der Protein-Denaturierung zunutze: Statt Faltung und Assoziation werden Rückfaltung, Reassoziation und Reaktivierung nach vorausgegangener Störung der nativen Struktur analysiert. Grund für dies Vorgehen ist, daß es bisher nicht möglich ist, die Faltung der naszierenden Kette direkt und mit hinreichender Auflösung zu charakterisieren<sup>[3]</sup>. Hinzu kommt, daß empfindliche Methoden, z. B. die Bindung von Liganden oder spezifischen Antikörpern, in ihren Aussagen dadurch in Frage gestellt werden, daß die Reportermoleküle selbst Strukturänderungen zu induzieren vermögen, die mit der untersuchten Reaktion interferieren<sup>[36]</sup> (siehe auch Abschnitt 5.1.3). Ein Grund, weshalb zur Struktur-Funktions-Analyse nicht die Denaturierung selbst herangezogen wird, wurde bereits einleitend erwähnt: Denaturierung, Dissoziation und Desaktivierung laufen streng parallel (Abb. 2); sie lassen sich kinetisch als Reaktion erster Ordnung nur bedingt separieren. Dagegen kann die Rückreaktion durch Variation der Konzentration dergestalt manipuliert werden, daß bei niedrigen Konzentrationen die bimolekulare Assoziation, bei hohen aber die unimolekulare Faltung die Reaktionsgeschwindigkeit limi-

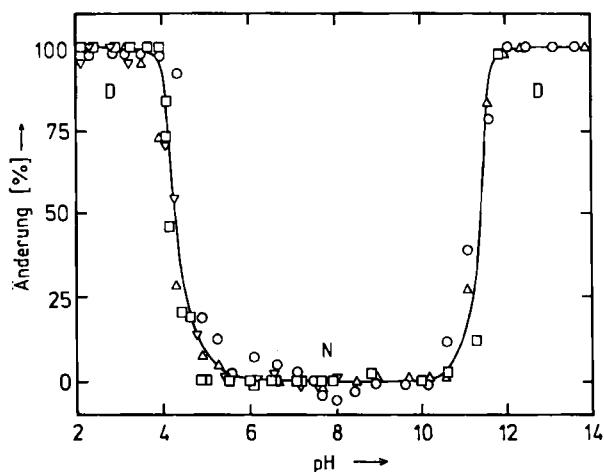


Abb. 2. pH-abhängige Dissoziation, Denaturierung und Desaktivierung von Aldolase aus Kaninchen-Skelettmuskel. N, D = nativer und denaturierter Zustand. □ Sedimentationskoeffizient; Δ Maximum der relativen Fluoreszenzemission ( $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$ ); ▽ Circulardichroismus (281 nm); ○ spezifische Aktivität [26].

tiert. Die kinetische Analyse wird daher, je nach dem Gewicht beider Anteile, Aussagen über den Mechanismus der Faltung und Assoziation liefern<sup>[26, 37]</sup>. Zu ihrer Bestätigung bieten sich zur Bestimmung der Konformation und der Partikelverteilung spektroskopische Techniken (Absorption, Fluoreszenz, Circulardichroismus etc.) und Hybridisierung oder chemische Quervernetzung (z. B. mit Glutaraldehyd<sup>[38]</sup>) an (Abb. 3). Unter Umständen gelingt es, Faltungsintermediate oder Zwischenstufen der Quartärstrukturbildung bei niedrigen Konzentrationen des Denaturierungsmittels oder durch limitierte Proteolyse zu fixieren. Das Auftreten oder Verschwinden derartiger Intermediate kann detaillierten Aufschluß über den Faltungsweg geben,

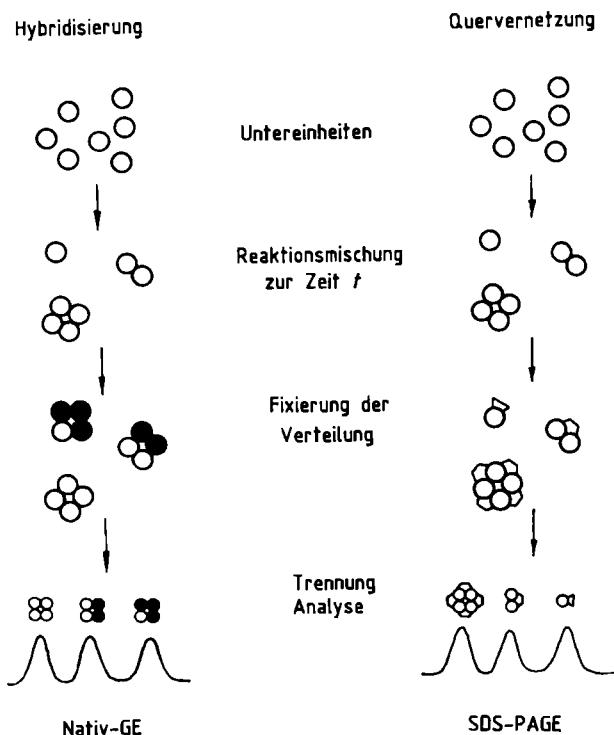


Abb. 3. Hybridisierung und Quervernetzung als Methoden zur Messung der Reassoziation [26, 38, 115]. Nativ-GE = Nativ-Gelelektrophorese; SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

[\*] In einigen speziellen Fällen (Immunglobulin [12], Collagen [34], Tailspike-Protein des Bakteriophagen P22 [35]) gelangen erste Einblicke in die Faltung *in vivo*.

wenn es gelingt, die Reaktion auf definierte Produkte hin zu optimieren<sup>[39-42]</sup>.

Stabilitätsdaten und Assoziationsenthalpien folgen unmittelbar aus calorimetrischen Messungen ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) oder indirekt aus Bestimmungen der Gleichgewichtskonstanten. Übereinstimmung von  $\Delta H_{\text{cal}}$  und  $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$  bestätigt dabei das bei der Anwendung der van't-Hoff-Beziehung vorausgesetzte Zwei-Zustands-Modell<sup>[43-45]</sup>. Wärmekapazitäts-Calorimetrie (DSC) hat sich besonders bei „Entropiegetriebenen“, endothermen Reaktionen bewährt<sup>[46]</sup>. Solvations- und Hochdruckmessungen können im gegebenen Zusammenhang zur Deutung der thermodynamischen Daten beitragen<sup>[23, 47, 48]</sup>.

### 3. Natur des nativen und des entfalteten Zustands

Das Verständnis der Faltung eines Proteins zu seiner aktiven Struktur setzt die Kenntnis des entfalteten (D) und des nativen (N) Zustands und des Weges zwischen beiden voraus. Der „Weg“ ist definiert durch alle Intermediär- und Übergangszustände zwischen Anfangs- und Endzustand.

Die Komplexität des Problems ist evident, wenn man berücksichtigt, daß „der denaturierte Zustand“ eine Summe von heterogenen Konformationen nahezu gleicher Energie darstellt, denen zumindest in frühen Stadien der Faltung unterschiedliche Faltungswege zugehören können. Die quantitative Abschätzung der Zahl unterschiedlicher Konformationen liegt bei einem Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 20 000 in der Größenordnung von zumindest  $10^{80}$ <sup>[5]</sup>. Die Frage nach dem Faltungs-

weg im Sinne der obigen Definition ist demnach irrelevant. Dagegen erscheinen die Beschreibung von N und D und die Charakterisierung geschwindigkeitsbestimmender Schritte, die hinreichend populiert sind, um der Analyse mit einer der zuvor erwähnten Methoden zugänglich zu sein, als sinnvolle Problemstellungen<sup>[49-53]</sup>.

#### 3.1. Nativer Zustand

Detaillierte Strukturmodelle des nativen Zustands beruhen prinzipiell auf der Röntgen-Strukturanalyse von Kristallen. Schematische Darstellungen der „Anatomie“ des Polypeptidgerüsts<sup>[6]</sup> der im folgenden diskutierten Proteine sind in Abbildung 4 zusammengefaßt. Mit Ausnahme peripherer Seitenketten und „Loops“ darf als gesichert gelten, daß die Konformation in Lösung mit derjenigen im Kristall übereinstimmt<sup>[54, 55]</sup>.

Jede der wiedergegebenen Strukturen realisiert eine spezifische Möglichkeit, die hydrophobe Oberfläche auf ein Minimum und die stabilisierenden intramolekularen Wechselwirkungen auf ein Maximum zu bringen. Obgleich Packung und Kompressibilität im Inneren der Moleküle etwa dem Kristallgitter kleiner amphipathischer Moleküle zu ähneln scheinen<sup>[55-57]</sup>, sind die resultierenden Freien Stabilisierungsenthalpien klein im Vergleich zur Summe der strukturstabilisierenden Wasserstoffbrücken, hydrophoben Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und Ionenpaaren ( $\Delta G_{\text{stab}} \approx 40 \text{ kJ/mol}$ ). Offensichtlich halten sich die stabilisierenden und destabilisierenden Beiträge etwa die Waage, mit der Konsequenz, daß  $kT$  ausreicht, die für die Funktion erforderliche konformationelle Flexibilität zu gewährleisten<sup>[58, 59]</sup>. Die Molekülgöße hat keinen

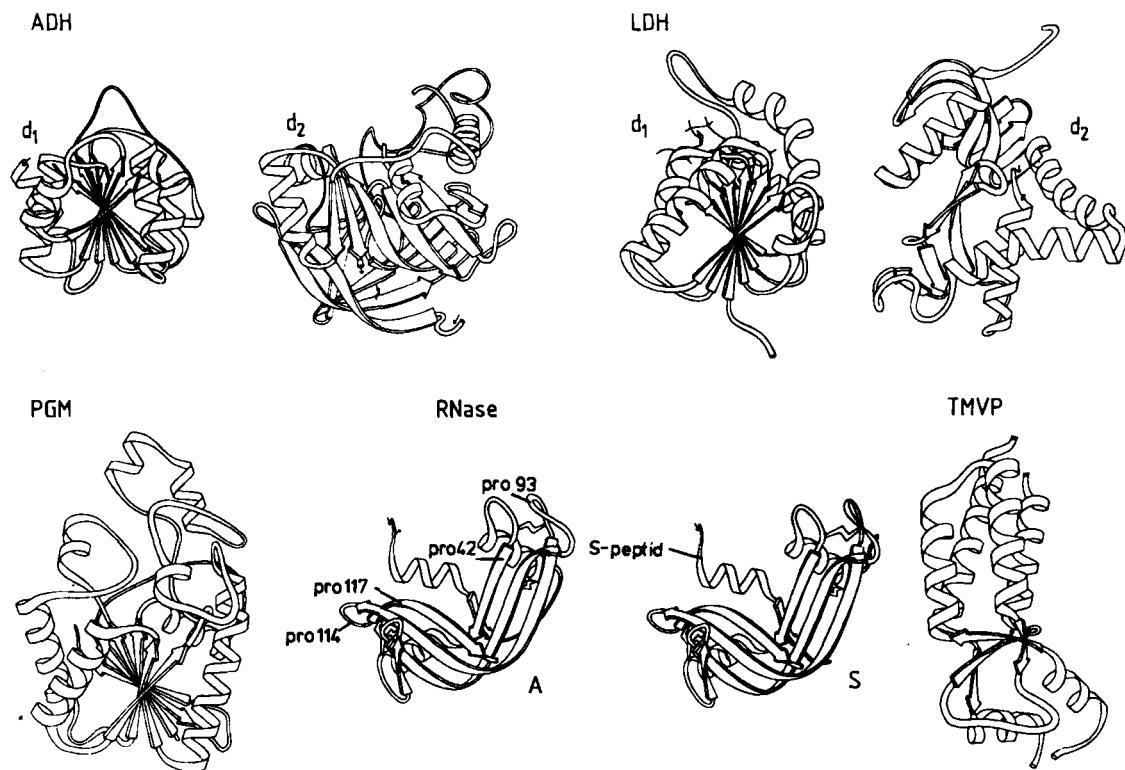


Abb. 4. Tertiärstruktur ausgewählter Proteine: ADH = Leber-Alkohol-Dehydrogenase; LDH = Lactat-Dehydrogenase; PGM = Phosphoglycerat-Mutase; RNase = Ribonuclease (RNase A mit Angabe der Prolinreste des Enzyms aus Rind; RNase S, Subtilisin-gespaltenes Enzym); TMVP = Tabakmosaikvirus-Hülpprotein. d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub> bezeichnet die Strukturdomänen 1 bzw. 2 (nach [6]).

signifikanten Effekt auf die Stabilität; Domänen oder Untereinheiten erleichtern demnach Faltung, Flexibilität und Transport, ohne die Stabilität zu gefährden.

Wie das Beispiel der NAD-abhängigen Dehydrogenasen zeigt<sup>[60]</sup>, kann einerseits eine gegebene Tertiärstruktur ohne drastische Änderungen den Austausch einer großen Zahl von Aminosäuren tolerieren („Entartung des Faltungscodes“). Andererseits scheint nur eine begrenzte Zahl von Aminosäuresequenzen zu existieren, die in einer gegebenen Umgebung eine wohldefinierte, stabile Tertiärstruktur zu bilden vermögen. Beide Befunde sind verantwortlich für die überraschend kleine Zahl von „Faltungs-Topologien“, die uns aus der großen Zahl bekannter Strukturen entgegentritt. Dabei muß man sich vergegenwärtigen, daß – abgesehen von der großen Zahl von möglichen Konformeren ( $10^{80}$  für  $n = 170$ ) – die 20 natürlichen Aminosäuren für die angenommene Kettenlänge  $20^n \approx 10^{220}$  unterschiedliche Sequenzen bereithalten<sup>[\*]</sup>. Offensichtlich gibt es in großer Zahl „nicht-codierende Sequenzen“, die zu keiner definierten, stabilen Struktur führen.

### 3.2. Entfalteter Zustand

Der native Zustand setzt eine bestimmte „quasi-physiologische“ Umgebung voraus. Ändert man diese durch Variation des pH-Wertes, des Druckes oder der Temperatur oder durch Zusatz von solubilisierenden Agentien wie Harnstoff, Guanidin·HCl oder Detergentien, so tritt „Denaturierung“ ein. Diese führt im Grenzfall zum vollständig entfalteten Protein im Zustand des statistischen Knäuels<sup>[61]</sup>. Im nativen Zustand ist aufgrund der Festlegung der Peptidbindung in der *trans*-Konfiguration<sup>[62]</sup> und der Beschränkung der Rotation um die N–C<sub>α</sub>- und C<sub>α</sub>–C-Bindungen<sup>[63]</sup> die freie Drehbarkeit auf etwa ein Viertel des Ramachandranschen Phasenraumes beschränkt<sup>[\*\*]</sup>.

Ein Teil dieser Beschränkung bleibt selbst bei maximaler Solubilisierung des Proteins in 6 M Guanidin·HCl infolge der teilweise erheblichen van-der-Waals-Radien und der chemischen Natur der Seitenketten unverändert erhalten, so daß der entfaltete Zustand nur bedingt als ideales statistisches Fadenknäuel<sup>[64, 65]</sup> beschrieben werden kann.

Circulardichroismus- oder Fluoreszenz-Spektroskopie können zur Messung der Entfaltung herangezogen werden. Es zeigt sich, daß Denaturierung im sauren Bereich oder bei hohen hydrostatischen Drücken Dissoziation und Desaktivierung bei weitgehender Erhaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur bewirken kann. Bei geschickter Wahl der experimentellen Bedingungen können demnach Entfaltung und Dissoziation „entkoppelt“ werden; entsprechende Rekonstitutionsexperimente ermöglichen dann die getrennte Untersuchung von Faltung einerseits und Assoziation andererseits.

### 3.3. Rekonstitution

Die Denaturierung verläuft bei kleinen, einkettigen Proteinen reversibel im Sinne des Gleichgewichts



Das Produkt der Renaturierung ist der native Ausgangszustand (Abb. 5A); der Übergang läßt sich thermodynamisch mit dem Zwei-Zustands-Modell beschreiben ( $\Delta H_{\text{cal}} \approx \Delta H_{\text{van't Hoff}}$ )<sup>[43]</sup>.

Mehr-Domänen-Proteine und Proteine mit Quartärstruktur verhalten sich meistens komplizierter<sup>[26, 66]</sup>: Die Renaturierungsausbeute ist herabgesetzt, und die Profile von Denaturierung und Renaturierung stimmen nicht überein (Abb. 5B). Ursache der Störung ist die Bildung

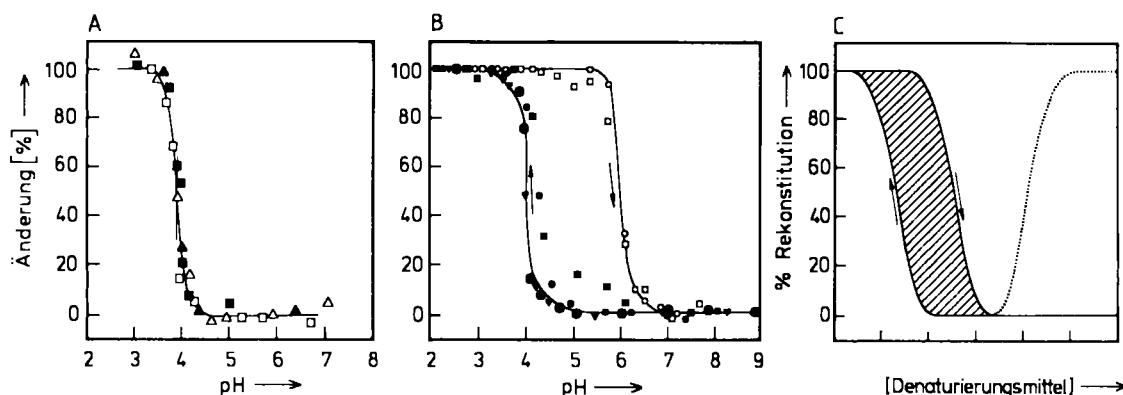


Abb. 5. Denaturierung-Renaturierung monomerer und oligomerer Proteine [25, 26]. Offene Symbole: Denaturierung (Desaktivierung), geschlossene Symbole: Renaturierung (Reaktivierung). A) Staphylococcal-Nuclease □, ■ spezifische Viskosität; Δ, ▲ Circulardichroismus Θ (220 nm). B) Lactat-Dehydrogenase aus Schweine-Skelettmuskel. ● Sedimentationskoeffizient  $s_{20,w}$ ; ○, ● spezifische Aktivität, □, ■ Maximum der relativen Fluoreszenzemission; ▽ Circulardichroismus Θ (192 nm). C) Konkurrenz von Rekonstitution und Aggregation bei der Reassoziation oligomerer Proteine. Schraffiert: Bereich der Aggregation zwischen Denaturierung (↑) und Renaturierung (↓). Die punktierte Kurve gibt die Reaktivierungsausbeute in Abwesenheit des Denaturierungsmittels an (nach Inkubation bei der gegebenen Konzentration an Denaturierungsmittel [26]).

[\*] Eine Abschätzung der Anzahl Atome im Weltall ergibt  $10^{79}$  [5, 49].

[\*\*] Bei Peptidbindungen vor Prolinresten (X-Pro) unterscheiden sich *trans*- und *cis*-Konfiguration energetisch nur geringfügig. Im denaturierten Zustand liegen im Gleichgewicht 80% *trans* und 20% *cis* vor; die Aktivierungsenergie der *cis-trans*-Isomerisierung beträgt ca. 85 kJ/mol [10].

„falscher Aggregate“ aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen von Gruppen, die beim N→D-Übergang zugänglich werden (Abb. 5C)<sup>[66–69]</sup>. Im Fall oligomerer Proteine wird aus der inversen Konzentrationsabhängigkeit

von Rekonstitution und Aggregation (Abb. 6) deutlich, daß beide Reaktionen kinetisch miteinander konkurrieren:



Bei hohen Konzentrationen läuft die Aggregation der Faltung den Rang ab, so daß im Grenzfall vollständige Aggregation und damit „irreversible Denaturierung“ beobachtet wird<sup>[69]</sup>. Diese kann nur durch Resolubilisierung (z. B. in 6 M Guanidin) und anschließende Renaturierung unter optimalen Rekonstitutionsbedingungen rückgängig gemacht

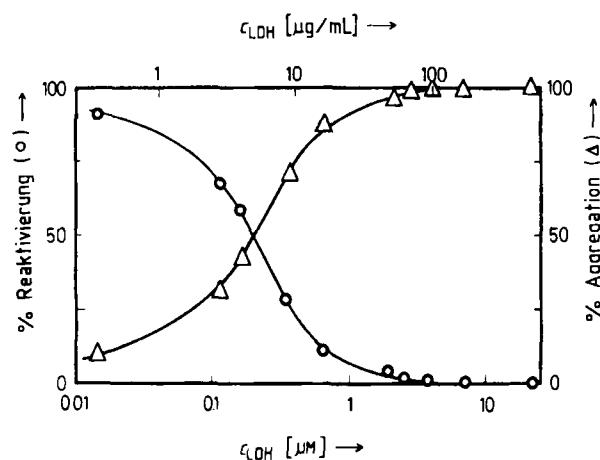
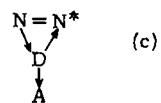


Abb. 6. Kinetische Konkurrenz von Rekonstitution (O) und Aggregation (Δ) am Beispiel von Lactat-Dehydrogenase aus Schweine-Skelettmuskel [69].

werden<sup>[69][1]</sup>. Das Endprodukt der Rekonstitution  $N^*$  erweist sich (nach Abtrennung von A) in allen untersuchten Fällen als ununterscheidbar vom nativen Ausgangszustand N (Tabelle 2), so daß der vollständige Denaturierungs-Renaturierungs-Cyclus mit Gl. (c) zu beschreiben ist.



Die mit allen verfügbaren physikalisch-chemischen und enzymologischen Methoden gesicherte Übereinstimmung von N und  $N^*$ <sup>[66, 71]</sup> ist aus zwei Gründen bedeutsam: 1. Die „Reversibilität“ der Denaturierung im Sinne von Gl. (c) bestätigt die Vorstellung, daß der native Zustand thermodynamisch stabil und strukturell eindeutig definiert ist. 2. Der Befund, daß die Renaturierung zum nativen Zustand zurückführt ( $N^* = N$ ), bestätigt, daß Rekonstitutionsexperimente (D →  $N^*$ ) als Modell für die in-vivo-Faltung und in-vivo-Assoziation angesehen werden können. Dies gilt nicht nur für Energetik und Struktur, sondern auch für die Kinetik<sup>[1]</sup>.

#### 4. Faltung

Ausgangspunkt sei der Faltungsmechanismus eines einkettigen Ein-Domänen-Proteins<sup>[49–53]</sup>. Wie aus Renaturierungsversuchen an Ribonuclease hervorgeht, bildet sich die native Struktur (trotz der außerordentlich großen Zahl von Anordnungsmöglichkeiten bei einer Kette von 124 Aminosäuren) mit einer Halbwertszeit von ca. 10 s. Wäre die Faltung ein stochastischer Prozeß, bei dem die Kette statistisch alle möglichen Konformationen bis zur Erreichung des Energieminimums durchprobiert, so sollte der Zeitbedarf um etwa 60 Größenordnungen höher liegen<sup>[72]</sup>. Die außerordentliche Beschleunigung kann durch „kinetische Kontrolle“ in der Weise erklärt werden, daß der thermodynamisch stabile Zustand als der „kinetisch zugängliche Zustand minimaler Energie“ betrachtet wird<sup>[11]</sup>. Eine plausible Möglichkeit, die Zahl der Intermediärzustände drastisch zu reduzieren, wäre die Festlegung eines eindeutigen Faltungsweges mit definierten Intermediaten<sup>[53]</sup>.

Tabelle 2. Vergleich nativer, denaturierter und rekonstituierter Enzyme [66, 94, 111] [a].

	ALD			LDH-M <sub>4</sub>			s-MDH			m-MDH			ODH		
	N	D <sub>s</sub>	N*	N	D <sub>s</sub>	N*	N	D <sub>G</sub>	N*	N	D <sub>s</sub>	N*	N	D <sub>G</sub>	N*
$s_{20,w}^0 [S]$	7.8	2.1	7.6	7.6	1.9	7.6	3.73	1.1	3.70	3.5	2.4	3.5	3.20	1.2	3.2
$M \cdot 10^{-3}$	160	40	160	140	36.5	140	67.0	69.0	68.5	35.4	70.0	45.5	44.0		
spez. Akt. [Einh./mg]	10.4	0	10.0	639	0	655	550	0	540	1040	0	1100	750	0	750
$\lambda_{max}$ [nm]	319	339	319	339	336	339	332	350	332	300	302	300	327	352	
$F_{rel}$ [%]	100	130	103	100	34	104	100	58	100	100	230	100	100	44	
$\Theta_{208} \cdot 10^{-3}$	-14.1	-7.1	-13.7	-11.4	-10.8	-12.3	-9.8	-6.5	-9.8				-6.4	-3.5	
$\Theta_{222} \cdot 10^{-3}$	-14.9	-8.5	-14.3	-15.4	-11.5	-16.0	-11.4	-0.3	-11.0				-9.6	-0.8	
$K_M (K_D)_{NADH}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]				(7.4)		(8.0)	30		30	77		76	50		
$K_{M, Substrat}$ [mmol/L]				0.24		0.24	0.05		0.05	0.04		0.04	1.2		1.2

[a] Enzyme: ALD = Aldolase aus Kaninchen-Skelettmuskel; LDH-M<sub>4</sub> = Lactat-Dehydrogenase aus Schweine-Skelettmuskel; s-MDH, m-MDH = cytoplasmatische bzw. mitochondriale Malat-Dehydrogenase vom Schwein; ODH = Octopin-Dehydrogenase (Isoenzym A + B) aus *Pecten jacobaeus*. N, D,  $N^*$  bezeichnen den nativen, denaturierten bzw. renaturierten Zustand. D<sub>s</sub>: Denaturierung in 1 M Glycin/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2; D<sub>G</sub>: Denaturierung in 6 M Guanidin-HCl.  $s_{20,w}^0$  = Sedimentationskonstante,  $M$  = Molekulargewicht,  $\lambda_{max}$  = Maximum der Fluoreszenzemission ( $\lambda_{exc} = 280$  nm),  $F_{rel}$  = rel. Fluoreszenz,  $\Theta_{208}$ ,  $\Theta_{222}$  (in grad · cm<sup>2</sup> · dmol<sup>-1</sup>) = Molare Elastizität (mrw = 113) bei 208 bzw. 222 nm.  $K_M (K_D)_{NADH}$  = Michaelis-Konstante (Dissoziationskonstante) für NADH als Coenzym;  $K_{M, Substrat}$  = Michaelis-Konstante für Pyruvat (LDH, ODH) und Oxalacetat (MDH).

[\*] Rekonstitution nach vorheriger Denaturierung (Aggregation) kann zur Reinigung von Proteinen angewendet werden, da auf diesem Wege unter Umständen die Abtrennung von Proteasen oder die Solubilisierung unlöslicher zellulärer Proteinfractionen gelingt [69, 70].

[\*] Die Faltung von Proteinen mit einem mittleren Molekulargewicht  $M \approx 100000$  benötigt Sekunden bis Minuten. Betrachtet man *Escherichia coli* als Beispiel, so folgt für die obere Grenze der Transkription, Translation, Faltung und Assoziation *in vivo* die Generationszeit des Bakteriums von ca. 20 min.

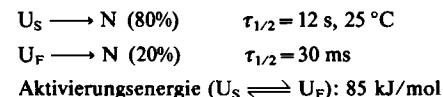
#### 4.1. Modelle

„Hierarchische Modelle“ zur Beschreibung einer sequenziellen Faltung, die von extrem schnell entstehenden instabilen Mikrodomänen über „Embryos“ zu zunehmend größeren Substrukturen führen, berücksichtigen zunächst nur Nahwechselwirkungen innerhalb der sich faltenden Kette. Dementsprechend gelangen sie zu Helices oder verdrillten  $\beta$ -Strukturen („ $\beta$ -hair pins“) als Intermediärprodukte, die sich erst im zweiten Schritt durch Fernwechselwirkungen zur nativen Tertiärstruktur falten<sup>[73-75]</sup>. Als frühe Intermediate sind Vorgleichgewichte anzunehmen, die grundsätzlich auf der Seite der niedrigeren Stufe innerhalb der Hierarchie liegen. Als „Nuclei“ kommen in Frage:  $\alpha$ -Helices, hydrophobe Cluster, antiparallele  $\beta$ -Strukturen ( $\beta$ -hair pins) und „ $\beta$ -bends“<sup>[74-78]</sup>. Auf ausführlichere Darstellungen topologischer und statistisch-mechanischer Theorien sei hier nur verwiesen<sup>[4, 53, 75]</sup>.

Keines der bisher entwickelten Modelle der Proteinfaltung kann mehr als heuristischen Wert beanspruchen. Experimente liegen lediglich für Phasenumwandlungen von Modellpeptiden vor. Sie bestätigen die hohe Geschwindigkeit von Elementarprozessen wie z. B. der Helixbildung ( $\approx 10^{-6}$  s); für die Bildungsgeschwindigkeit von hydrophoben Clustern ( $\approx 10^{-3}$  s) und  $\beta$ -Strukturen ( $< 1$  s) liegen bestenfalls Abschätzungen vor<sup>[10, 74]</sup>.

#### 4.2. Ribonuclease

Während die Mehrzahl der theoretischen Studien zur Proteinfaltung sich (seiner geringen Größe wegen) auf den Trypsin-Inhibitor (BPTI,  $M_r = 6500$ ) beziehen, ist Ribonuclease (RNase,  $M_r = 13\,700$ ) das experimentell am genauesten untersuchte System. Das Enzym hat mit 124 Aminosäuren die typische Größe einer Faltungsdomäne. Es enthält alle Strukturelemente globulärer Proteine und wird durch vier Cystinbrücken stabilisiert. Seine Gleichgewichts-Entfaltung gehorcht thermodynamisch dem Zwei-Zustands-Modell  $U \rightleftharpoons N$  (Abb. 5A). Im Gegensatz dazu ist die Kinetik des  $U \rightarrow N$ -Übergangs komplex und erfordert wenigstens drei Spezies zu ihrer Beschreibung. Das entsprechende Minimalschema (d) läßt sich spektroskopisch mit Hilfe von Stopped-flow-Experimenten quantifizieren<sup>[79, 80]</sup>:



Die relativen Anteile der sich schnell und der sich langsam faltenden Spezies ändern sich nicht bei hohen Temperaturen oder hohen Konzentrationen an Denaturierungsmittel. Dies bedeutet, daß  $U_S$  und  $U_F$  entfaltete Ketten sind, die im denaturierten Zustand in einem 80:20-Gleichgewicht vorliegen. Sie können sich aufgrund der Gültigkeit des Zwei-Zustands-Modells nur entropisch, nicht aber energetisch unterscheiden.

Die Befunde zur Einstellung des  $U_S \rightleftharpoons U_F$ -Gleichgewichts im entfalteten Zustand entsprechen den typischen Merkmalen der *cis-trans*-Isomerisierung von X-Prolin-Pep-

tidbindungen<sup>[81-84]</sup> (vgl. I\*) auf Seite 390). Die genaue Analyse zeigt, daß  $U_S$  keine homogene Spezies ist, sondern eine Mischung von zumindest zwei Komponenten mit unterschiedlicher Zahl oder Position der nicht-nativen X-Pro-Zustände<sup>[85]</sup>.

Wie anfangs betont, gilt Gl. (d) bestenfalls im Gleichgewichtsübergang. Unter nativen Bedingungen reicht zur Beschreibung des  $U_S \rightarrow N$ -Übergangs das einfache kinetische Schema nicht aus<sup>[81, 84-86]</sup>. Stattdessen ergibt sich für die langsame Faltung ein sequenzieller Prozeß mit wenigstens zwei Intermediaten:



$I_1$ , das sich schnell im Vergleich zur X-Prolin-Isomerisierung im entfalteten Zustand bildet, hat eine offene Konformation mit ausgeprägter Sekundärstruktur<sup>[87]</sup>. Diese entsteht also wie erwartet (siehe Abschnitt 4.1) in einem frühen Stadium der Faltung<sup>[1]</sup>.  $I_N$  ist ein nativ-ähnliches Intermediat (mit mindestens einem „falschen Prolin“); es hat ein hydrophobes Inneres („core“), ist weniger stabil als  $N$ , zeigt aber bereits normale Bindung von Cytidin-2'-monophosphat (2'-CMP) und hohe katalytische Aktivität<sup>[85, 88]</sup>.

Wie die Gl. (e) bestätigenden Befunde zeigen, wird die Faltung von Ribonuclease durch nicht-native Prolin-Isomere in der Kette nicht blockiert. Vielmehr bildet sich in schneller Reaktion die Sekundärstruktur, und bereits auf der „nativ-ähnlichen“ Vorstufe  $I_N$  (die noch falsche Prolin-Isomere enthält) entsteht das aktive Zentrum. Die genaue Beschreibung des Faltungsweges im Sinne der sequenziellen Bildung definierter Wechselwirkungen entlang der Polypeptidkette ist bisher nicht gelungen. Limitierte Proteolyse und Untersuchungen an Homologen mit definiertem Austausch von Aminosäuren lassen hier Einblicke erwarten. Erste Ergebnisse zeigen, daß das C-terminale Ende der Polypeptidkette in einem frühen Faltungsschritt unzugänglich wird<sup>[42]</sup>.

Die Hypothese, nicht-native Prolin-Isomere bestimmten grundsätzlich die Faltung, wird durch die Unterscheidung „essentieller“ und „nicht-essentieller“ Prolinreste eingeschränkt<sup>[89, 90]</sup>. Sie beruht auf Energieabschätzungen, nach denen nicht-native Prolinreste, je nach den Faltungsbedingungen und der Position in der Polypeptidkette, den nativen Zustand verschieden stark destabilisieren können. Die Verminderung der Stabilisierungsenergie variiert von etwa 5 bis 85 kJ/mol. Bemerkenswerterweise ergibt die Untersuchung homologer Ribonucleasen mit unterschiedlichem Prolingehalt unverändertes Faltungsverhalten und unveränderte Stabilität: Offensichtlich enthält RNase nicht-essentielle Prolinreste, und der Faltungsweg wird, trotz zum Teil erheblicher Unterschiede in der Primärstruktur, im Verlauf der Evolution konserviert<sup>[90]</sup>.

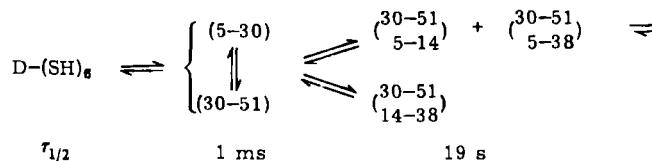
Die Ergebnisse bestätigen insgesamt das hierarchische Modell der Proteinfaltung: Die am Ribosom synthetisierte all-*trans*-Polypeptidkette bildet auf einer frühen Stufe der Faltung Sekundärstrukturelemente; diese können als „Mikrodomänen“ oder „Embryos“ angesehen werden, die im weiteren Verlauf der Faltung durch Fernwechselwir-

[\*] Ob  $I_1$  und  $N$  die gleiche Sekundärstruktur aufweisen oder ob eine intramolekulare Umstrukturierung stattfindet [73], ist bisher nicht geklärt. Einige Indizien sprechen für weitgehende Übereinstimmung.

kungen über zunehmend „nativ-ähnliche“ Intermediate ( $I_1$ ,  $I_N$ ) zum nativen Zustand N gelangen. Die Beschleunigung der Faltung durch strukturstabilisierende Zusätze läßt sich als Verschiebung der Vorgleichgewichte auf  $I_1$  hin deuten. Der Weg von  $I_1$  nach N wird durch inkorrekte Prolin-Isomere nicht blockiert. Die  $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung zu den in  $\beta$ -bends liegenden  $cis$ -Prolinresten kann nach der Faltung zum nativ-ähnlichen  $I_N$  ablaufen. Die Flexibilität dieser (grundsätzlich peripheren) Positionen ermöglicht dem naszierenden Molekül die endgültige Bildung der kompakten nativen Struktur.

Die hier diskutierten Ergebnisse wurden an Ribonucleasen mit unmodifizierten Disulfidbrücken gewonnen. Wie Anfinsen et al. gezeigt haben<sup>[91]</sup>, kann auch das reduzierte Enzym durch Reoxidation vollständig reaktiviert werden. Die Verbrückung findet dabei zwischen weit voneinander entfernten Cysteinresten statt, so daß anzunehmen ist, daß die Verbrückung in vivo posttranslational erfolgt. Das Redox-Gleichgewicht liegt sowohl in der Zelle als auch im Blutplasma auf der Seite des oxidierten, d. h. aktiven Enzyms<sup>[92]</sup>.

Beim Trypsin-Inhibitor (BPTI), der mit sechs Cysteinresten insgesamt 15 Kombinationen seiner drei Disulfidbrücken zuläßt, wurde durch Reduktions-Reoxidations-Versuche gezeigt, daß auf dem Faltungsweg primär gebildete falsche Verknüpfungen in Vorgleichgewichten bis hin zum nativen Endprodukt korrigiert werden [Gl. (f)]<sup>[49]</sup>.

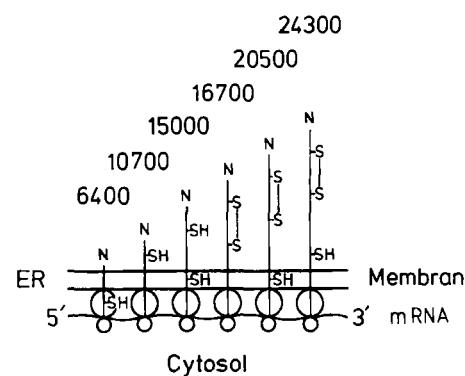


Die Zahlen kennzeichnen die Verknüpfungspunkte der Cysteinreste entlang der Kette. D-(SH)<sub>6</sub> bedeutet das denaturierte, reduzierte Protein.

#### 4.3. Proteine mit Domänenstruktur

Mehr-Domänen-Proteine scheinen sich cotranslational zu falten. So konnte für die Ketten des Immunglobulin-Moleküls, die aus mehreren Domänen bestehen, durch in-vivo-Translations-Experimente gezeigt werden, daß Domänenfaltung und Disulfid-Verbrückung mit der Synthese der einzelnen Domänen synchron verlaufen<sup>[12]</sup> (Abb. 7). Ein derartiger Mechanismus vektorieller Faltung aufeinanderfolgender Abschnitte der Polypeptidkette („folding by parts“<sup>[11,93]</sup>) vermeidet das Problem falscher Wechselwirkungen zwischen den Domänen, das bei der in-vitro-Faltung zu ähnlicher Konkurrenz führen kann, wie sie in Abschnitt 3.3 als „falsche Aggregation“ im Verlauf der Assoziation diskutiert wurde. Die einkettige Octopin-Dehydrogenase (als NAD-abhängige Oxidoreduktase ein typisches Mehr-Domänen-Protein) zeigt aus dem zuvor erwähnten Grund nur etwa 70% Reaktivierungsausbeute<sup>[94]!95</sup>. Im Gegensatz zur Desaktivierung, die bei niedrigen Guanidin-Konzentrationen einphasig und hoch-kooperativ verläuft,

[\*] Daß Prolin-Isomerisierung im entfalteten Zustand nicht die Ursache der inkompletten Reaktivierung ist, folgt daraus, daß die Ausbeute im Zeitbereich 5 s bis 24 h von der Denaturierungsdauer unabhängig ist.

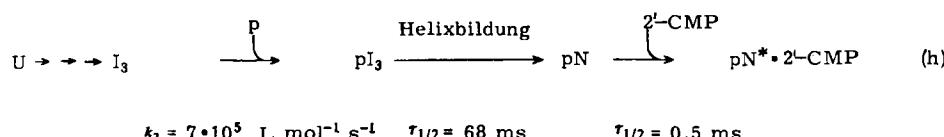


#### 4.4. Fragmente

Faltungsstudien an Proteinfragmenten sind zur Beantwortung einer Anzahl von Fragen geeignet: Welches ist die minimale Länge der Polypeptidkette für eine bestimmte Enzymfunktion? Sind getrennte Domänen oder andere Substrukturen imstande, zu funktionsfähigen Proteinen zusammenzutreten? Welche Bedeutung haben bestimmte Bereiche der Polypeptidkette für die Assoziation oder für eine komplexe Reaktionssequenz? Können Fragmente zur Analyse des Weges der Faltung oder der Assoziation dienen? Auf welcher Stufe der Synthese finden Faltung, Processing oder Konjugation<sup>[\*]</sup> statt?

Methodisch kann die Manipulation sowohl auf der Ebene des Gens als auch der Translation oder aber am fertig synthetisierten Protein ansetzen. Als Beispiele seien genannt: Die Faltungsstudien an Mutanten des „Tail-spike-Proteins“ des Bakteriophagen P22<sup>[31]</sup>, die in-vitro-Translation der Genprodukte des manipulierten Strukturgens von Aminoacyl-tRNA-Synthetase(ala), die zum Nachweis der linearen („modularen“) Anordnung der Einzelaktivitäten auf der Polypeptidkette führt<sup>[98]</sup>; die cotranslationale Cystin-Verbrückung naszierender Polypeptidketten<sup>[12]</sup> (siehe Abb. 7) und die kinetische Analyse von Umlagerung oder Faltung durch limitierte Proteolyse<sup>[41, 42]</sup>.

Im Zusammenhang mit der Korrelation von Faltung und Assoziation ist die Rekonstitution von Proteinfragmenten in zweierlei Weise als Modellreaktion anzusehen: Zum einen können geschickt gewählte Fragmente Intermediate der Rekonstitution zugänglich machen (siehe Abschnitt 5.3). Zum anderen kann der wechselseitige Einfluß von Untereinheiten bei der Assoziation mit Hilfe der Rekonstitution von Fragmenten simuliert werden. Hier kann wiederum Ribonuclease als Beispiel dienen. Die Protease Subtilisin spaltet RNase spezifisch in inaktives S-Peptid (Aminosäuren 1–20) und inaktives S-Protein (Aminosäuren 21–124)<sup>[99]</sup>. Rekonstitution der beiden Fragmente führt zu einem stabilen Komplex mit voller enzymatischer Aktivität. Das Peptidfragment ist unter Standard-Faltungsbedingungen ungeordnet; seine  $\alpha$ -Helix-Struktur wird erst im Komplex stabilisiert<sup>[100–102]</sup>. Die kinetische Analyse der Assoziation von S-Protein und S-Peptid zeigt, daß das S-Peptid an ein frühes strukturiertes Intermediat bindet, wobei die Bindung allein nicht ausreicht, die Helix des S-Peptids zu stabilisieren. Erst die endgültige Faltung des S-Proteins führt zur Fixierung des S-Peptids in seiner spezifischen Konformation. Die späten Schritte auf dem Faltungsweg lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (h):



$U, I_3, N, N^*$  = entfalteter Zustand, Intermediat bzw. native Zustände des S-Proteins;  $p$  = S-Peptid;  
 $k_2$  = Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

[\*] Processing bzw. Konjugation bezeichnen die kovalente Modifikation der Polypeptide durch partielle Proteolyse bzw. Anknüpfung von Nicht-Protein-Komponenten (Kohlenhydraten, Lipiden, Cofaktoren etc.).

Das Endprodukt  $pN^*$ , das Eigenschaften des nativen Enzyms zeigt, setzt zu seiner Rekombination Strukturierung von  $U$  zu  $I_3$  voraus. Dieses Ergebnis illustriert in der unimolekularen Reaktionsfolge *Faltung*  $\rightarrow$  *Assoziation*  $\rightarrow$  *Funktion* modellmäßig den für oligomere Systeme typischen Zusammenhang.

#### 5. Assoziation oligomerer Proteine

Das in Abschnitt 4 beschriebene Modell unterscheidet sich von der Faltung und Assoziation oligomerer Proteine in zweierlei Hinsicht. 1. Die Bildung der nativen Quartärstruktur bezieht sich auf Polypeptidketten vergleichbarer Größe zumindest von der Dimension von Domänen, d. h. die Assoziation setzt für beide Assoziationspartner ein gewisses Maß an Strukturierung voraus. 2. Die Untereinheiten oligomerer Proteine zeigen – im Gegensatz zu Fragmenten oder Ein-Domänen-Systemen – die als „falsche Aggregation“ diskutierte Konkurrenz intramolekularer und intermolekularer Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 3.3). Sie bedingt, daß der Assoziation oligomerer Systeme die Bildung „strukturierter Monomere“ vorausgehen muß (vgl. Abb. 6). Spezifität der Assoziation ist nur gewährleistet, wenn sich die definierten komplementären Oberflächenstrukturen vor der Assoziation der Untereinheiten bilden.

##### 5.1. Faltung und Assoziation

Möglichkeit und Ausmaß der in-vitro-Rekonstitution hängen vom Grad der Denaturierung und den relativen Geschwindigkeiten von Faltung und Assoziation ab. Die enge Kopplung von Dissoziation, Denaturierung und Desaktivierung (siehe Abb. 2) bewirkt, daß sich durch Messungen im Dissoziationsbereich nicht klären läßt, ob im Übergang auftretende Intermediate aktiv sind, oder zumindest teilweise ihre nativen Eigenschaften aufrecht erhalten. Der einzige Weg zur Aufklärung der Beziehung von Faltung und Assoziation ist die kinetische Analyse der Rekonstitution unter verschiedenen Faltungsbedingungen bzw. ausgehend von unterschiedlichen Zuständen der Entfaltung oder Dissoziation<sup>[37, 68, 91]</sup>.

###### 5.1.1. Rekonstitution strukturierter Intermediate

Wie am Verschwinden der Amplituden der zugehörigen Faltungs- oder Assoziationsreaktionen leicht zu erkennen ist, gelingt es durch geschickte Wahl der Lösungsbedin-

gungen oder durch kovalente Modifizierung der Proteine, Oligomere ohne drastische Veränderung der nativen Struktur in ihre Untereinheiten oder in Intermediate der Asso-

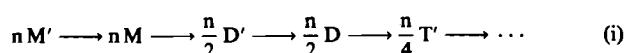
ziation zu zerlegen. Beispielsweise kann Temperaturvariation das Dissoziationsgleichgewicht so verschieben, daß definierte Assoziate oder „strukturierte Monomere“ resultieren (vgl. Intermediärprodukte der „endothermen Polymerisation“ von Tabakmosaikvirus-Protein<sup>[32]</sup>, „Kälte-Inaktivierung“ von Enzymen<sup>[55]</sup> und andere „Entropiegetriebene Prozesse“<sup>[103]</sup>). Auch die Anwendung hoher hydrostatischer Drücke (ca. 1 kbar) kann zu Dissoziation, Denaturierung und Desaktivierung von oligomeren Proteinen führen<sup>[48, 55]</sup>. Die vollständige Rekonstituierbarkeit nach Druck-Relaxation<sup>[104–106]</sup> ist dadurch zu erklären, daß hydrophobe Kontaktflächen, die für den Zusammenhalt der Untereinheiten verantwortlich sind, im Verlauf der Hochdruck-Dissoziation reversibel ins Innere der Monomere transferiert werden<sup>[106]</sup>. Treibende Kraft dürfte die Exposition von Ladungen sein, die im assoziierten Zustand Ionenpaare bilden; sie bewirken im Gefolge der Dissoziation Elektrostriktion, die (nach dem Braun-Le Chatelier-Prinzip) mit zunehmendem Druck das Gleichgewicht zur Dissoziation hin verschiebt.

Am schonendsten sollte die Dissoziation aufgrund des Ostwaldschen Verdünnungsgesetzes durch Erniedrigung der Proteinkonzentration gelingen. Beispiele, die dies bestätigen, gibt es in großer Zahl, doch sind Messungen meist durch die extrem hohen Assoziationskonstanten erschwert; überdies ist die aufschlußreichere Rückreaktion experimentell nicht zugänglich, und das Ergebnis ermöglicht bestenfalls die Charakterisierung der Dissoziationsprodukte. Eine interessante Variante in diesem Zusammenhang ist die Untersuchung matrixgebundener Enzyme, die zunehmend technologische Bedeutung gewinnen<sup>[107]</sup>. Hier gelingt im Falle von Oligomeren bei niedriger Besetzungsdichte die Anknüpfung jeweils nur einer Untereinheit, die durch Denaturierung-Renaturierung leicht von ihren Assoziationspartnern befreit und als Monomer charakterisiert werden kann<sup>[108]</sup>. Das Verfahren ergab in mehreren Fällen eine mit anderen Methoden nicht beobachtete Ähnlichkeit der isolierten Untereinheit mit dem nativen Assoziat, die vermuten läßt, daß die Matrix den Verband der nativen Quartärstruktur zu simulieren vermag.

Quasi-native Intermediate der Assoziation sind bei mittleren Konzentrationen der Denaturierungsmittel<sup>[39]</sup> oder als metastabile Produkte der Rekonstitution<sup>[109]</sup> oder der limitierten Proteolyse zugänglich<sup>[110]</sup>. Sie sind aufschlußreich für die Beantwortung der Frage des Zusammenhangs von Quartärstruktur und biologischer Funktion (siehe Abschnitt 5.3).

### 5.1.2. Mechanismus der Rekonstitution

Kinetische Analysen der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktivierung, Renaturierung und Reassoziation oligomerer Proteine haben gezeigt, daß die in-vitro-Rekonstitution als Sequenz (unimolekularer) Isomerisierungsreaktionen und (bimolekularer) Assoziationschritte gemäß



beschrieben werden kann.

Das Schema ist entsprechend den üblicherweise angewandten („quasi-physiologischen“) Bedingungen in drei-

erlei Hinsicht vereinfacht: 1. Wegen der Stabilität der nativen Quartärstruktur werden Rückreaktionen vernachlässigt. 2. Die der Bildung von M' grundsätzlich vorausgehenden schnellen Faltungsschritte [vgl. Gl. (g)] bleiben (als nicht geschwindigkeitsbestimmende Reaktionen) unberücksichtigt. 3. Im Falle des Tetramer-Schemas werden Trimere (als insignifikanter Anteil) nicht berücksichtigt. Mit diesen Einschränkungen ergibt sich als Weg zur Aufklärung des Mechanismus der Rekonstitution die Feststellung der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte und die Charakterisierung der in meßbaren Konzentrationen auftretenden Intermediate.

Durch konzentrationsabhängige Messungen der Reaktivierung (im Fall von Enzymen) und der Wiedergewinnung der nativen Konformation lassen sich die kinetischen Konstanten bestimmen. Ihre Zuordnung zu den einzelnen Assoziationschritten durch chemische Quervernetzung oder Hybridisierung bestätigt das allgemeine Schema. Sigmoidale und konzentrationsabhängige Rekonstitutionsprofile geben dabei die Überlagerung von Faltung und Assoziation im Sinne der konsekutiven uni-bimolekularen Reaktion unmittelbar zu erkennen<sup>[37]</sup>.

Bei nativen *Dimeren* vereinfacht sich (mit der Beschränkung auf M und D) das kinetische Schema von Gl. (i) in der Weise, daß der bimolekulare Schritt eindeutig dem  $2M \rightarrow D'$ -Übergang zuzuordnen ist. Freilich kann statt des uni-bimolekularen hier grundsätzlich auch ein rein unimolekularer Mechanismus resultieren, wenn statt der Bildung des „strukturierten Monomers“ die Umstrukturierung des Dimers ( $D' \rightarrow D$ ) die Geschwindigkeit bestimmt. Zwei nahe verwandte Enzyme, cytoplasmatische (s-MDH) und mitochondriale Malat-Dehydrogenase (m-MDH), illustrieren die beiden Alternativen<sup>[94, 111]</sup>. Beide Enzyme werden im Cytosol als Produkte zweier (kern-codierter) Gene synthetisiert und anschließend unterschiedlich kompartimentiert. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen Untereinheiten vergleichbarer Größe, aber stark divergierender Primärstruktur. Ihre Quartärstruktur ist hinreichend stabil ( $K_{ass} > 10^9$  L/mol), um Rekonstitutionsexperimente bis zu kleinsten Konzentrationen zu ermöglichen.

Bei der Denaturierung in 6 M Guanidin-HCl und anschließenden Renaturierung durch Verdünnen verhalten sich beide Enzyme im Hinblick auf die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte völlig unterschiedlich (Abb. 8). Lediglich die schnellen ersten Schritte der Reaktion ( $M \rightarrow M'$ ) sind vergleichbar. s-MDH, obgleich chemisch einheitlich, zeigt zwei separierbare langsame Reaktionen erster Ordnung, aber keine Konzentrationsabhängigkeit, m-MDH dagegen das typische Bild einer uni-bimolekularen Reaktion. Das Produkt der Rekonstitution ist in beiden Fällen der native Ausgangszustand ( $N^* = N$ ) (Tabelle 2).

Die kinetische Analyse der Reaktivierung, zusammen mit parallelen Quervernetzungs-Experimenten, ermöglicht für s-MDH folgende Deutung der Ergebnisse: Die Hauptamplitude (ca. 70%) repräsentiert mit einer Halbwertszeit von ca. 9 min die geschwindigkeitsbestimmende Faltung zum „strukturierten Monomer“, das in diffusionskontrollierter Reaktion ( $k_2 > 10^6$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) zum aktiven Dimer assoziiert; der Rest führt von „falscher Dimerisierung“ und anschließender Isomerisierung ( $D' \rightarrow D$ ) her.

Die Parallelität von Reaktivierung und Dimerisierung für beide Reaktionen zeigt, daß weder das Monomer noch

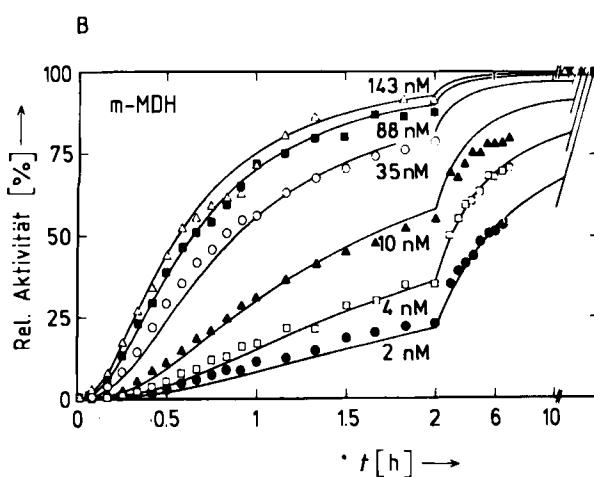
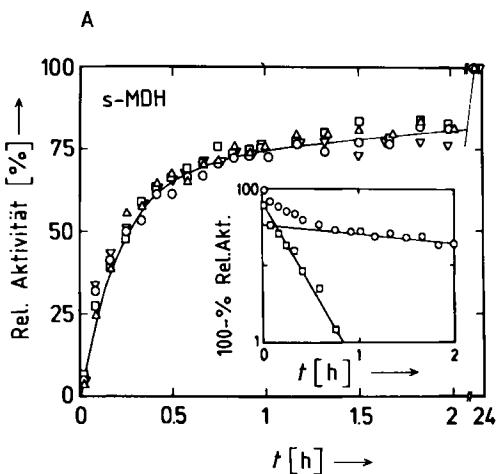
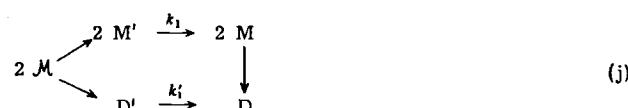
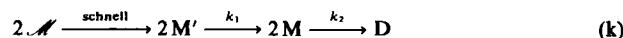


Abb. 8. Kinetik der Rekonstitution dimerer Malat-Dehydrogenase (MDH) vom Schwein nach Denaturierung in 6 M Guanidin-HCl oder 1.0 M Glycin/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.3; Reaktivierung durch Verdünnen: 0.1 M Natriumphosphat, pH 7.6 (experimentelle Details siehe [94, 111]). A) Cytoplasmatische MDH (s-MDH). Rekonstitution bei  $c_{MDH}$  [ $\mu$ g/mL] = 1.3 (○), 3.7 (△), 6.4 (□), 12.9 (▽). Profil errechnet nach Gl. (j) mit  $k_1 = 13 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (68%) und  $k'_1 = 7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (32%). Eingefügtes kleines Diagramm: Linearisierung zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung; Überlagerung zweier Exponentenfunktionen für  $c_{MDH}$  = 1.3  $\mu$ g/mL. B) Mitochondriale MDH (m-MDH). Rekonstitution bei  $c_{MDH}$  [ $\mu$ g/mL] = 0.07 (●), 0.14 (□), 0.35 (▲), 1.2 (○), 3.1 (■), 5.0 (△). Profile errechnet nach Gl. (k) mit  $k_1 = 6.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [111].



gefaltete Assoziationsintermediate signifikante enzymatische Aktivität besitzen können (Abb. 8A). Im Gegensatz zum verzweigten Faltungsweg von s-MDH [Gl. (j)] gehorcht die Rekonstitution von m-MDH der einfachen Konsekutivreaktion (Abb. 8B) gemäß Gl. (k).



Die Gesamtreaktion hängt dabei nicht vom Denaturierungsmodus (Säure, Harnstoff, Guanidin) ab, d. h. die unterschiedlichen Ausgangszustände führen über ein gemeinsames strukturiertes Zwischenprodukt (M'), dessen Faltung und Assoziation sich aufgrund von Fluoreszenz- und Aktivitätsdaten durch ein und dasselbe Konstantenpaar,  $k_1$  und  $k_2$ , vollständig beschreiben lässt<sup>[94, 111]</sup>.

Geht man von Dimeren zu Tetrameren über, so ergibt sich eine Anzahl neuer Fragen: Gibt es Intermediate der Assoziation? Sind sie katalytisch aktiv? Lassen sie sich stabilisieren? Ist die Dimerisierung von M oder D geschwindigkeitsbestimmend?

Zu ihrer Beantwortung betrachten wir als repräsentatives Beispiel das glykolytische Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH), für das detaillierte Untersuchungen vorliegen<sup>[26, 37–41, 66, 68–71, 94, 104–106, 112]</sup>. Die beiden Isoenzyme LDH-H<sub>4</sub> und LDH-M<sub>4</sub> aus dem Herz- bzw. Skelettmuskel bestätigen das kinetische Schema (i). Für LDH-M<sub>4</sub> ergibt sich aus konzentrationsabhängigen Messungen der Reaktivierungskinetik der uni-bimolekulare Mechanismus (l) mit  $k_1 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , in vollständiger Analogie zum Mechanismus der dimeren m-MDH (Abb. 9; vgl. Abb. 8B).

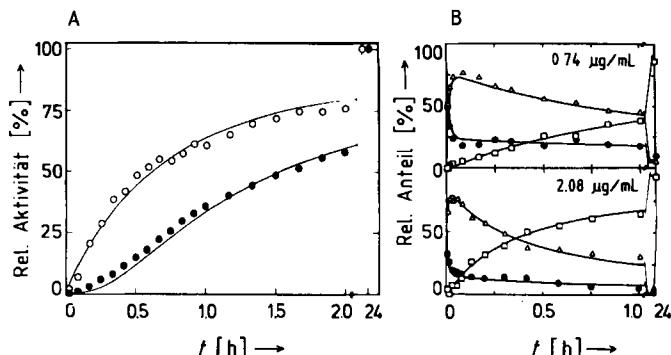
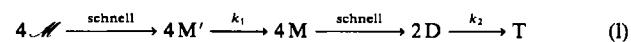
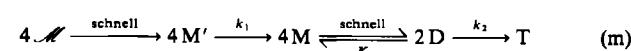


Abb. 9. Kinetik der Rekonstitution tetramerer Lactat-Dehydrogenase aus Schweine-Skelettmuskel. 0.1 M Natriumphosphat, pH 7.6, 20°C. A) Reaktivierung nach Denaturierung in 6 M Guanidin-HCl ( $c_{LDH} = 1.7 \mu\text{g/mL}$ ). Aktivitätsmessung im Standardtest (●) (Profil errechnet nach Gl. (l)) mit  $k_1 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und in Anwesenheit von 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (○) (Profil errechnet mit den gleichen Konstanten  $k_1$ ,  $k_2$  unter der Annahme von 50% Dimeren-Aktivität). B) Reassoziation „strukturierter Monomere“ nach Dissoziation und Desaktivierung in 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Bestimmung des Anteils an Monomeren (●), Dimeren (△) und Tetrameren (□) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Quervernetzung mit 1% Glutaraldehyd (Profile errechnet nach  $4 M \xrightleftharpoons{k} 2 D \xrightarrow{k_2} T$  mit  $K = 3.3 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1}$  und  $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  unter der Annahme inaktiver Monomere und Dimere); die Reaktivierung verläuft synchron mit der Tetramerusbildung [38, 113].

Wie aus Quervernetzungsexperimenten hervorgeht (Abb. 9), dominiert zu Anfang der Rekonstitution die Dimerbildung. Die zugehörige Abnahme der Monomer-Konzentration gehorcht einer Reaktion erster Ordnung mit  $k_1 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , in exakter Übereinstimmung mit der durch Computersimulation der Zeit- und Konzentrationsprofile gewonnenen obigen Konstante. Die systematische Abweichung in Abbildung 9 folgt daraus, daß die Dimerisierung von M eine schnelle Gleichgewichtsreaktion mit  $K = 3 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1}$  und einer Geschwindigkeit nahe der einer diffusionskontrollierten Reaktion ist<sup>[38, 113]</sup>. Das vollständige kinetische Schema wird demnach durch (m) wiedergegeben:



Wie bei den monomeren und dimeren Proteinen gehen dem langsamen M' → M-Übergang schnelle Faltungsreaktionen voraus; M' weist bereits > 80% der nativen Elliptizität auf. Schließt man durch Zugabe stabilisierender Ionen<sup>[114]</sup> zum Denaturierungsmedium (z. B. 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH ≈ 2) die vollständige Entfaltung aus, so gelingt es, „strukturierte Monomere“ (M) zu erzeugen, die nach rein zweiter Ordnung mit  $k_2 = 3.0 \cdot 10^4$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> assoziieren und damit unabhängig die zweite kinetische Konstante des uni-bimolekularen Schemas [Gl. (I)] verifizieren<sup>[113]</sup>.

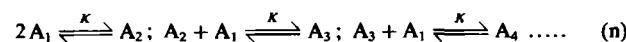
Der hier für ein tetrameres Enzym diskutierte Rekonstitutionsmechanismus wird durch eine Vielzahl experimenteller Befunde bestätigt. 1. Die Rekonstitution des bei mittleren Guanidin-Konzentrationen erhaltenen dimeren Intermediats ergibt exakt die gleichen kinetischen Daten wie der Monomer → Tetramer-Übergang, d. h. die Reaktion 2D → T als gemeinsamer Schritt der Rekonstitution muß geschwindigkeitsbestimmend sein<sup>[39]</sup>. 2. Limitierte Proteolyse mit Thermolysin während der Rekonstitution führt intermediär zu metastabilen „Dimeren“<sup>[40]</sup>. Setzt man Thermolysin zu verschiedenen Rekonstitutionszeiten zu, so ergibt sich wiederum der Dimer → Tetramer-Übergang als geschwindigkeitsbestimmender Schritt sowohl der Reassoziation als auch der Reaktivierung. 3. Isoenzym-Hybridisierung zu verschiedenen Rekonstitutionszeiten ermöglicht die Berechnung aller zu einem bestimmten Zeitpunkt an der Reaktion beteiligten Spezies (M, D, T); das Ergebnis bestätigt den Mechanismus (I)<sup>[115]</sup>.

Wie vergleichende Untersuchungen an anderen tetrameren Enzymen gezeigt haben, läßt sich der konsekutive uni-bimolekulare Mechanismus als kinetisches Modell für die Bildung der nativen Quartärstruktur verallgemeinern<sup>[25, 26, 66, 71, 94]</sup>.

Gehen wir von tetrameren zu *multimeren* Systemen über, so ergibt sich aus der Rekonstitution komplexer biologischer Strukturen (Phagen, Viren, Ribosomen, Multienzymkomplexe etc.), daß autonome Faltung und Assoziation grundsätzlich möglich sind. An neuen Aspekten kommen ins Spiel: Kooperative Erscheinungen; genetisch oder zellulär regulierte Reaktionssequenzen; „morphopoietische Faktoren“ zur Regelung der korrekten Reaktionsfolge sowie der Geometrie und Stöchiometrie der nativen Quartärstruktur.

Drei Beispiele mögen die verschiedenen Ebenen der Komplexität illustrieren.

1. *Homogene Multimere*, z. B. Tabakmosaikvirus-Protein, zeigen für die verschiedenen Assoziate unterschiedliche kinetische Mechanismen. Dabei ist der pH-Wert mit extrem hoher Kooperativität strukturbestimmend<sup>[32, 117, 118]</sup>. Langsame Nucleationsschritte, die bei Assoziationsexperimenten Nicht-Gleichgewichts-Zustände bedingen können, scheinen Einfluß auf den Assoziationsmodus zu haben<sup>[119]</sup>. Allerdings läßt sich die „Polymerisation“ in erster Näherung als Florysche Kondensationspolymerisation [Gl. (n)] mit einer Gleichgewichtskonstante beschreiben<sup>[120]</sup>.

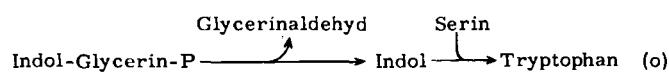


Der endotherme Charakter der Reaktion gilt dabei unter allen Bedingungen, unter denen Assoziation begünstigt ist. Die entsprechende Entropiezunahme beruht auf der Frei-

setzung von Wassermolekülen im Verlauf der Polymerisation<sup>[47]</sup>.

2. *Heterogene Multimere*, z. B. Multienzymkomplexe, ermöglichen eine Antwort auf die Frage, ob gefaltete Polypeptidketten als Matrize für die Faltung und Assoziation anderer Komponenten eines multimeren Systems dienen.

Wie für monomere oder oligomere Multi-Domänen-Proteine, bei denen Unabhängigkeit der Domänenfaltung erwiesen ist<sup>[121–123]</sup>, scheint auch für Multienzymkomplexe zu gelten, daß weder externe Faktoren noch strukturierte Komponenten des Komplexes für Faltung oder Assoziation erforderlich sind. Das einfachste Beispiel ist der tetramere Tryptophan-Synthase-Bienzym-Komplex aus *E. coli*, dessen beide Komponenten ( $\alpha$  und  $\beta_2$ ) die Reaktionsfolge (o) katalysieren. Im Komplex ( $\alpha_2\beta_2$ ) wird durch Festhalten („channeling“) des gemeinsamen Zwischenprodukts Indol der katalytische Effekt um zwei Größenordnungen gesteigert.



Die  $\alpha$ -Untereinheit ist als Monomer aktiv; ihre Reaktivierung folgt daher einem Zeitgesetz erster Ordnung. Daselbe gilt (aufgrund diffusionskontrollierter Assoziation der strukturierten Monomere) für das  $\beta_2$ -Dimer. Beide Einzelenzyme sind in ihrer Reaktivierung voneinander unabhängig. Die Gewinnung der nativen Quartärstruktur gehorcht einem uni-bimolekularen Mechanismus mit der erhöhten Gesamtaktivität des Komplexes auf der Stufe des Tetramers<sup>[121, 124, 125]</sup>.

Ungleich komplizierter ist die Rekonstitution von Aspartat-Transcarbamoylase aus *E. coli*. Das Enzym – ein Dodecamer aus zwei „katalytischen“ Trimeren (C) und drei „regulatorischen“ Dimeren (R) – reguliert allosterisch die Pyrimidin-Biosynthese. Seine Stabilität und konformationelle Flexibilität beruht auf spezifischen „Bindungsdomenen“ sowohl innerhalb der C-Trimere und R-Dimere als auch zwischen C und R; ihnen verdankt das Enzym die praktisch vollständige Rekonstitution nach Denaturierung. Faltung und Assoziation finden im Konzentrationsbereich von einigen mg/mL innerhalb weniger Sekunden statt. Die Befunde lassen sich durch einen Mechanismus erklären, der als ersten Schritt die unabhängige Faltung und Assoziation der Untereinheiten zu C und R enthält; die trimeren bzw. dimeren Intermediate werden anschließend in grundsätzlich heterologer Weise zu  $c_6r_6$  ( $\cong C_2R_3$ ) zusammengefügt. Da allein bei der Rekombination von  $c_3$  und  $r_2$  (ohne Berücksichtigung der homologen Assoziation) zehn kinetische Gleichungen angenommen werden müssen, liegt es auf der Hand, daß der endgültige Beweis des Mechanismus noch in weiter Ferne liegt<sup>[126, 127]</sup>.

3. *Riesenmoleküle*. Der Multienzymkomplex Pyruvat-Dehydrogenase ist das Bindeglied zwischen Glykolyse, Citratzyklus und Fettsäuresynthese. Der Komplex vereinigt in sich drei Aktivitäten: Decarboxylase (E1), Acyl-Transferase (E2) und Lipoamid-Dehydrogenase (E3), die als E2-„Core“ mit peripheren E1- und E3-Einheiten organisiert sind. Die Komplexe aus verschiedenen Organismen unterscheiden sich im Hinblick auf Quartärstruktur, Größe und Reaktivierbarkeit. Im Falle des Enzyms aus *Bacillus*

*Bacillus stearothermophilus* haben wir mit  $M_r \approx 10^7$  den größten bisher bekannten Multienzymkomplex vor uns. Seine Komponenten lassen sich zum Teil in nativer Form separieren oder (nach Denaturierung) reaktivieren. Gemeinsame Denaturierung/Renaturierung des Komplexes führt zu partieller Rekonstitution<sup>[128]</sup>. Diese gehorcht einem Zeitgesetz erster Ordnung, entsprechend einer geschwindigkeitsbestimmenden Isomerisierungsreaktion und schneller Assoziation. Die getrennte Reaktivierung der Komponenten E2 und E3 läuft der Gesamt-Rekonstitution voraus; Zugabe aktiver E2-Core-Partikeln führt aber zu keiner Beschleunigung (Abb. 10). Die beobachtete Isomerisierungsreaktion

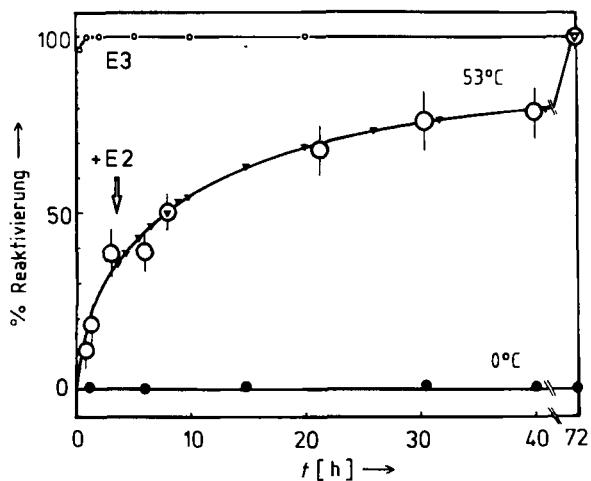
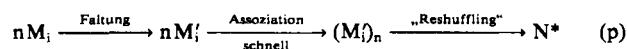


Abb. 10. Rekonstitution des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes aus *Bacillus stearothermophilus* und seiner Einzelkomponenten E2 (Lipoat-Acyltransferase) und E3 (Lipoamid-Dehydrogenase). Denaturierung in 1.0 M Glycin/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.3; Renaturierung in 0.2 M Natriumphosphat, pH 7.0. ◯ illustriert die im Bereich von 40–160 µg/mL konzentrationsunabhängige Reaktivierung des Komplexes. Zugabe von E2 bei ↓ (▼) ändert die Kinetik nicht; die Reaktivierung von E3 (○) läuft der des Komplexes voraus. Rekonstitutionsexperimente bei 0°C (●) und 53°C (übrige Symbole).

dürfte nach (p) dem „Reshuffling“, d. h. der intramolekularen Umlagerung des Komplexes zuzuordnen sein:



Wie das Beispiel der Pyruvat-Dehydrogenase zeigt, verlaufen Faltung und Assoziation selbst bei höchst komplexen Multienzymsystemen spontan. Weder äußere Faktoren noch eine bestimmte Reaktionsfolge erweisen sich als notwendig. Diese Schlußfolgerung kann zumindest für konjugierte Proteine nicht verallgemeinert werden: Systeme von der Komplexität des Ribosoms oder bestimmter Phagen und Viren erfordern für den Zusammenbau definierte „Programme“<sup>[129–131]</sup>.

### 5.1.3. Ligandeneffekte

Spezifische Liganden, z. B. Cofaktoren, Substrate oder Komponenten des Lösungsmittels, können die native Struktur von Enzymen stabilisieren; in vielen Fällen haben sie funktionelle Bedeutung für die katalytische Aktivität. Im Zusammenhang mit dem Mechanismus von Faltung und Assoziation stellt sich die Frage, ob und auf welcher

Stufe Liganden die Bildung der Struktur von Proteinen beeinflussen.

Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar: 1. Durch Bindung eines Liganden an ein Intermediat der Faltung oder Assoziation kann die Aktivierungsenergie eines geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes verändert werden. 2. Durch Komplexbildung, z. B. mit dem nativen Zustand, kann die Freie Energie dieses Zustands gegenüber den entsprechenden Minima nicht-nativer Konformationen erniedrigt werden, so daß das Gleichgewicht zu N verschoben wird. Dies bedeutet, daß die Bindung eines Effektormoleküls oder Ions die Faltungsgeschwindigkeit sowohl durch die Beeinflussung geschwindigkeitsbestimmender Reaktionsschritte als auch durch die Stabilisierung von Intermediaten oder dem Endprodukt der Faltung verändern kann.

Bei den ausführlich untersuchten Dehydrogenasen wurde vielfach das Coenzym NAD als „Nucleationsmittel“ angesehen, das Faltung und Assoziation beschleunigt<sup>[67]</sup>. Genaue Untersuchungen zeigten jedoch, daß seine Wirkung auf die Kinetik bestenfalls gering ist<sup>[66, 71, 111, 132]</sup>, wie zu erwarten bei der Komplexität der an der Bindung des NAD-Moleküls beteiligten Bindungsdomänen<sup>[60]</sup>. Für die Ausbeute kann die Verschiebung des Gleichgewichts aufgrund der Bildung des Holoenzymes durchaus signifikant sein.

Ein Beispiel in diesem Sinne ist die Wirkung von Zink-Ionen auf die Rekonstitution von Leber-Alkohol-Dehydrogenase (LADH)<sup>[133, 134]</sup>. Das dimere Enzym braucht zu seiner katalytischen Funktion und zur Stabilisierung seiner Struktur Zink-Ionen. In Abwesenheit des Liganden ist weder Reassoziation noch Reaktivierung zu beobachten. Stattdessen wird eine (durch Fluoreszenz leicht nachweisbare) partielle Rückfaltung beobachtet, die in Abwesenheit von Zn<sup>2+</sup> irreversibel zu falschen Aggregaten führt. Zugabe von Zn<sup>2+</sup> bewirkt Reaktivierung. Diese hängt von der Enzymkonzentration ab und beweist damit, daß Assoziation zum Dimer Voraussetzung für die katalytische Funktion ist. Faltung und Assoziation können unabhängig voneinander analysiert werden, wenn man Zn<sup>2+</sup> erst nach der Faltung zusetzt (Abb. 11). Unter dieser Bedingung limitiert

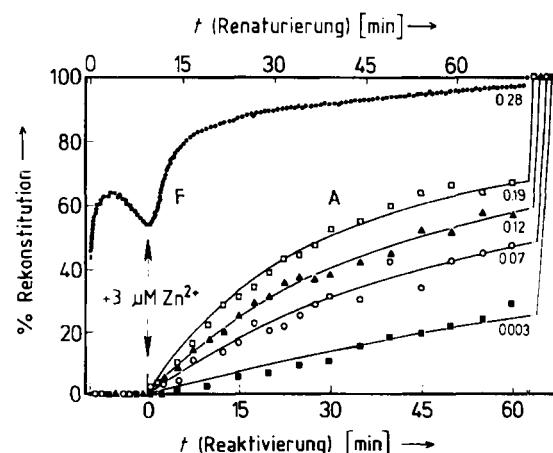
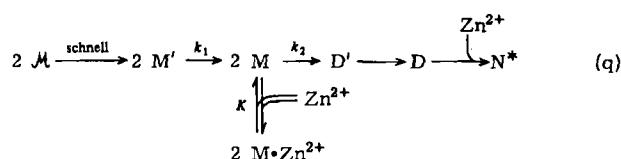


Abb. 11. Einfluß der Zn<sup>2+</sup>- und der Enzymkonzentration auf die Rekonstitution von Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (LADH). Denaturierung und Abtrennung von Zn<sup>2+</sup> in 6 M Guanidin-HCl durch Gelchromatographie; Renaturierung in 0.1 M Natriumphosphat, pH 7.6, c<sub>LADH</sub> = 10 µg/mL, 25°C. F = Wiederherstellung der nativen Fluoreszenz ( $\lambda_{exc} = 275$  nm,  $\lambda_{em} = 330$  nm). A = Reaktivierung bei den angegebenen Enzymkonzentrationen [µM]. Profile errechnet nach Gl. (q) mit  $k_1 = 7 \cdot 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>,  $k_2 = 1.6 \cdot 10^3$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> und  $K = 0.17$  µL mol<sup>-1</sup> [134].

nicht mehr die Bildung „strukturierter Monomere“ ( $M' \rightarrow M$ ) die Reaktivierung, sondern ihre Dimerisierung; entsprechend gehen die sigmoiden Profile in solche rein zweiter Ordnung über. Das kinetische Schema (q) beschreibt das gesamte Geschehen.



Es erklärt sowohl das Erlöschen der Reaktivierbarkeit bei  $Zn^{2+}$ -Überschuß (Abfangen inaktiver Monomere) als auch die stabilisierende Wirkung des Liganden (Verschiebung des Gleichgewichts zu  $D \rightarrow N^*$ ). Das Schwermetall-Ion hat demnach eine dreifache Funktion: Als Lewis-Säure im katalytischen Mechanismus, als Ligand eines Intermediats und als stabilisierendes Gegenion in der dreidimensionalen Struktur der gefalteten Polypeptidkette.

## 5.2. Spezifität

Der faszinierendste Aspekt im Zusammenhang mit der Wirkung von Liganden auf die Bildung der nativen Quartärstruktur ist das Problem der Spezifität der Assoziation, d. h. die Frage der wechselseitigen Beeinflussung von Proteinen bei der Bildung ihrer dreidimensionalen Struktur. Die in-vivo-Faltung eines naszierenden Polypeptids findet in Gegenwart hoher Konzentrationen an anderen Proteinen einschließlich anderer naszierender Ketten statt, die im gleichen Gen-Abschnitt codiert sind. Daraus ergibt sich die Frage, ob unter Umständen „Chimären“, d. h. Hybride verschiedener Proteine, zumindest als Intermediate der Assoziation auftreten. Frühere negative Befunde ließen die unterschiedliche Rekonstitutionsgeschwindigkeit verschiedener Proteine außer acht und sind deshalb nicht schlüssig<sup>[135]</sup>.

Im Falle der tetrameren Lactat-Dehydrogenasen (LDH-H<sub>4</sub> und LDH-M<sub>4</sub>) haben wir ein System vor uns, bei dem die Kombination der beiden unterschiedlichen Ketten fünf physiologisch verschiedene Isoenzyme – H<sub>4</sub>, M<sub>4</sub> und die drei Hybride H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub> und HM<sub>3</sub> – bedingt; vergleichbare Hybridisierung findet sich auch bei anderen Enzymen. Auf der anderen Seite zeigen die Rekonstitutions-Experimente an Pyruvat-Dehydrogenase (Abb. 10), daß die Komponenten des Multienzymkomplexes in ihrer Faltung und Assoziation unabhängig voneinander sind.

Um das Problem im Hinblick auf mögliche kinetische Intermediate und hybride Endprodukte zu klären, verwendet man zweckmäßig zwei nahe verwandte Enzyme, deren Hybride sich (neben ihrer möglichen Bifunktionalität) in charakteristischen physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden.

Untersuchungen des Gleichgewichts wie der Kinetik gemeinsamer Rekonstitution an einem derartigen Paar, LDH-H<sub>4</sub> und m-MDH (mitochondriale Malat-Dehydrogenase)<sup>[60]</sup>, ließen weder den Austausch von Untereinheiten im nativen Zustand noch die Bildung (intermediärer) Hybride LDH·MDH oder (LDH)<sub>2</sub>·(MDH)<sub>2</sub> erkennen<sup>[136]</sup>. Al-

lerdings sind die Experimente insofern nicht völlig eindeutig, als unter den Bedingungen synchroner Reaktivierung im Verlauf der Rekonstitution schnell gebildete LDH-Dimere mit MDH-Monomeren hybridisieren müßten (siehe Abschnitt 5.1.2). Um dieses Problem zu umgehen und Monomer-Monomer-Wechselwirkungen zu ermöglichen, müßte man zwei im nativen Zustand *dimere* Enzyme verwenden. LDH aus *Limulus* (D-LDH) und m-MDH sind ein derartiges Paar. Beide Enzyme gehorchen dem gleichen uni-bimolekularen Rekonstitutionsmechanismus mit vergleichbaren Zeitkonstanten. Die Ergebnisse bleiben die gleichen: Weder synchrone noch asynchrone Messungen der Reaktivierungskinetik zeigen einen Einfluß der beiden Enzyme aufeinander (Abb. 12); chromatographisch wie elektrophoretisch sind weder aktive noch inaktive Hybride nachweisbar; schließlich erweist sich die Reaktivierungsausbeute als unabhängig von der An- oder Abwesenheit des jeweils „fremden“ Enzyms<sup>[136]</sup>. Das heißt: Auch im Fall dimerer Rekonstitutionspartner lassen sich weder hybride Endprodukte noch metastabile hybride Intermediate nachweisen<sup>[137]</sup>. Offensichtlich ist die Assoziation oligomerer Enzyme in hohem Maße spezifisch.

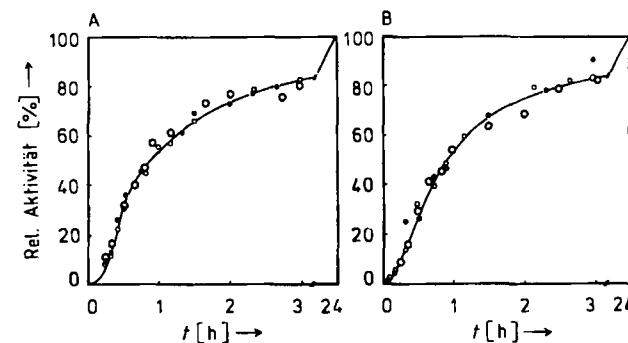


Abb. 12. Spezifität der Assoziation zweier dimerer Dehydrogenasen. Synchron Rekonstitution von D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) aus *Limulus polyphemus* und mitochondriale Malat-Dehydrogenase (m-MDH) vom Schwein [137]. A) Reaktivierung von 2 µg/mL D-LDH in Anwesenheit von 0.2 (●), 0.5 (○) und 1.0 (○) µg/mL m-MDH. Profil: Reaktivierung von D-LDH in Abwesenheit von m-MDH, errechnet nach Gl. (k) mit  $k_1 = 6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 1.5 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . B) Reaktivierung von 2 µg/mL m-MDH in Anwesenheit von 0.2 (●), 0.5 (○) und 0.9 (○) µg/mL D-LDH. Profil: Reaktivierung von m-MDH in Abwesenheit von D-LDH mit den in Abbildung 8 angegebenen Konstanten.

Die entsprechende „Erkennung“ von Untereinheiten ist eine Folge feinabgestimmter Wechselwirkungen und Strukturanpassungen. Sie setzt voraus, daß die Untereinheiten erst im „strukturierten Zustand“, d. h. nach Bildung der korrekten komplementären Tangentenflächen, kollieren<sup>[138]</sup>. In vivo dürfte diese Bedingung im Falle großer Protein-Untereinheiten durch cotranslationale Faltung der naszierenden Kette realisiert sein. Dabei müssen die intermediär auftretenden Faltungsprodukte in ihrer Komplementarität hinreichend definiert sein, so daß auch im heterogenen System des Cytoplasmas keine Kompartimentierung der Faltung und Assoziation erforderlich ist.

Ergänzend sei erwähnt, daß auf der Ebene der „Koaleszenz“ von Strukturdomenen ein ähnliches Maß an Spezifität besteht wie auf der Ebene der Assoziation von Untereinheiten. In völliger Entsprechung zur Faltung und Assoziation intakter Polypeptidketten können auch Domänen oder andere proteolytische Fragmente von Untereinheiten

zur quasi-nativen („genickten“) Tertiär- und Quartärstruktur rekonstituieren<sup>[93, 97, 110, 121, 122]</sup>.

### 5.3. Struktur-Funktions-Beziehung

Die Beobachtung, daß die Integrität der Kette keine notwendige Voraussetzung für die native Struktur eines Proteins ist, führt zurück zur Unterscheidung essentieller und nicht-essentieller Teile einer Sequenz, die aus der Betrachtung homologer einkettiger Proteine folgte. Hier ist abschließend die Frage nach der funktionellen Bedeutung der Assoziatstruktur zu stellen: Ist die Quartärstruktur notwendige Voraussetzung für die katalytische Funktion, oder sind kinetische Intermediate oder Gleichgewichtsintermediate auf dem Weg der Faltung und Assoziation bereits katalytisch wirksam? Eine Antwort ist von tetrameren Systemen zu erwarten, bei denen zumindest das dimere Intermediat der Analyse zugänglich ist.

Ergebnisse von Gleichgewichtsuntersuchungen der Denaturierung an einer großen Zahl von oligomeren Enzymen weisen darauf hin, daß volle enzymatische Aktivität und allosterische Regulation die native Quartärstruktur voraussetzen. Allerdings gibt es Befunde, die Aktivität und Allosterie auch auf der Monomer-Stufe nachzuweisen scheinen (Matrix-gebundene Untereinheiten; Allosterie, z. B. von  $\alpha$ -Amylase, Ribonuclease). Die Kinetik der Rekonstitution beweist für den Fall, daß geschwindigkeitsbestimmende Schritte zweiter Ordnung auftreten, daß Assoziation notwendige Voraussetzung der Aktivität ist. Freilich verrät dies Ergebnis für einen Assoziationsgrad  $> 2$  nichts über die tatsächlich aktive Spezies.

Die Zuordnung von Aktivität und Assoziationsgrad kann durch chemische Quervernetzung getroffen werden, die z. B. bei LDH unter Standardbedingungen eindeutig die Tetramerisierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu erkennen gibt (Abschnitt 5.1.2, Abb. 9). Die Rekonstitution, ausgehend von Intermediaten der Dissoziation, bestätigt als unabhängige Methode den Befund<sup>[37–40]</sup>.

Die Hoffnung, die Frage durch den Vergleich homologer Enzyme gleicher Funktion, aber unterschiedlicher Quartärstruktur zu beantworten, trügt: Phosphoglycerat-Mutase, die in verschiedenen Organismen tetramer, dimer oder monomer vorkommt, zeigt auf verschiedenen Stufen der Quartärstruktur völlig verschiedenes Rekonstitutionsverhalten<sup>[116]</sup>.

Eine Methode, die im gegebenen Zusammenhang Erfolg verspricht, ist die limitierte Proteolyse. Viele oligomere Enzyme erweisen sich aufgrund der Nicht-Äquivalenz der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten als „Dimeren von Dimeren“, „Dimere von Trimeren“ etc. Tetramere LDH wird z. B. durch einen N-terminalen „Arm“ von 20 Aminosäuren als dimeres Dimer stabilisiert. Spaltet man im Verlauf der Rekonstitution den „Arm“ proteolytisch ab, bevor signifikante Tetramerbildung beginnt, so sollte es gelingen, proteolytische Dimere zu erzeugen, die hinreichend stabil sind, um der Charakterisierung zugänglich zu sein.

Das Ergebnis ist in vielerlei Hinsicht bemerkenswert (Tabelle 3). Die tatsächlich in präparativen Mengen isolierbaren „Dimere“ sind unter Standard-Testbedingungen enzymatisch inaktiv und nach Denaturierung wieder zu „Dimeren“ rekonstituierbar. Die Tatsache, daß „Dimere“

Tabelle 3. Eigenschaften nativer Lactat-Dehydrogenase (LDH-M<sub>4</sub>) im Vergleich zu proteolytischen „Dimeren“ als Zwischenprodukten der Rekonstitution [a].

	nativ	„dimer“
Molekulargewicht ( $M_r \cdot 10^{-3}$ )		
Sedimentationsgleichgewicht	140 ± 4	65 ± 3
Gelpermeations-Chromatographie	140	70
SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese	35	34 (60%) 18 (20%) 12 (20%)
Sedimentationskoeffizient $s_{20,w}$ (S) [b]	7.6 ± 0.3	3.4 ± 0.2
N-Terminus	acetyliert	Leu, Val
rel. Fluoreszenz bei 340 nm [ $\lambda_{exc} = 280$ nm]	100	55 ± 5
Elliptizität $\Theta_{208\text{nm}} \cdot 10^{-3}$ [Grad · cm <sup>2</sup> · dmol <sup>-1</sup> ]	-12.0	-11.5
Absorption $A_{280\text{nm}}^{2.1\%}$ [cm <sup>2</sup> · mg <sup>-1</sup> ]	1.4	2.0
spez. Aktivität [Einh./mg]		
Standardtest	550 ± 70	2 ± 2
In Anwesenheit von 2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	445 ± 65	106 ± 15

[a] Limitierte Proteolyse mit Thermolysin nach 1 min Rekonstitution. Experimentelle Details siehe [40, 109, 110]. [b] Sedimentationsanalyse bei  $c_{LDH} = 0.2$  mg/mL; Analyse des „Dimers“ mittels Aktivitäts-Transport [139] in Anwesenheit von 1.0–2.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

und nicht Tetramere zurückgewonnen werden, erlaubt den Schluß, daß das „Dimer“ keine intakten Monomere als Untereinheiten enthält. Stattdessen erweisen sich die „Dimer“-Bausteine in hohem Ausmaß als fragmentiert („genickt“) (Tabelle 3). Daß sie trotzdem reassoziieren, beweist, daß die Domänen von LDH hinreichende Strukturinformation aufweisen, um auch ohne den Zusammenhalt einer durchgängigen Polypeptidkette die für die native Tertiärstruktur verantwortlichen intramolekularen Kontaktte zu bilden<sup>[110]</sup>. Ähnlich verhalten sich  $\beta$ -Galactosidase, Lysozym, Penicillinase, Tryptophan-Synthase und andere Enzyme<sup>[140–144]</sup>. Die „Dimere“ sind proteolytisch und thermisch labiler als das native Tetramer. Daß sie präparativ durch NAD-spezifische Affinitäts-Chromatographie isoliert werden können, beweist die Erhaltung des aktiven Zentrums. Die gegenüber dem Tetramer herabgesetzte Affinität steht in Übereinstimmung mit der erhöhten konformationellen Flexibilität und Labilität des Moleküls. Diese Deutung wird durch den Effekt strukturstabilisierender Ionen bestätigt<sup>[114]</sup>: Läßt man im enzymatischen Test ca. 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> einwirken, so werden bis zu 50% der nativen spezifischen Aktivität induziert, ohne daß sich am dimeren Zustand etwas ändert<sup>[94, 110]</sup>.

Die erwähnte katalytische Aktivität von dimerer LDH beschränkt sich nicht auf das proteolytische Dimer, sie wird vielmehr auch beim dimeren Intermediat der Rekonstitution beobachtet, wenn die Aktivität in Gegenwart von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemessen wird. Aufgrund der intrinsischen Aktivität des dimeren Intermediats läuft unter diesen Bedingungen die Wiedergewinnung der Aktivität der Tetramerisierung voraus<sup>[109]</sup>.

Angesichts der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit des Dimers und Tetramers ist es nicht überraschend, daß die Rekonstitution des Fragments mit  $M_r \approx 34000$  sich in das kinetische Schema (I) einfügt. Die Rekonstitution, die mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Test nun als Reaktivierung verfolgt werden kann, erweist sich als unabhängig von der Enzymkonzentration und läßt sich quantitativ durch dieselbe Geschwindigkeitskonstante ( $k_1$ ) erster Ordnung beschreiben, die für die Faltung der intakten Polypeptidkette bei der Rekonstitution zum Tetramer resultiert. Mit dem Index p

für die proteolytisch modifizierte Polypeptidkette ergibt sich das Schema (r):



Die im Vergleich zum Tetramer unveränderte kinetische Konstante ( $k_1 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) beweist, daß der N-terminale Arm auf die geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschritte der monomeren Kette keinen Einfluß hat. Seine Bedeutung besteht in der Verklammerung der Dimere zum aktiven Tetramer<sup>[109]</sup>.

Die tetramere Quartärstruktur kombiniert die optimale Stabilität in bezug auf die äußeren physikalischen Parameter und den Turnover mit der strukturellen Flexibilität, die für die Katalyse notwendig ist<sup>[145]</sup>.

## 6. Schlußbemerkungen

Beim Verständnis der Elementarprozesse der Proteinfaltung stehen wir erst am Anfang. Dementsprechend liegt die Entschlüsselung des „Faltungscodes“, eines der eingangs erwähnten Motive systematischer Faltungsexperimente und Energieberechnungen, noch in weiter Ferne. Klärung gefunden haben in den vergangenen Jahren die Mechanismen der Faltung und Assoziation *in vitro*: Das Zustandekommen der dreidimensionalen Struktur von oligomeren Proteinen erweist sich als sequenzieller Prozeß mit wohldefinierten unimolekularen und bimolekularen Schritten. Faltungsexperimente an kleinen einkettigen Molekülen geben zu erkennen, daß Intermediate in messbaren Konzentrationen vorliegen. Entsprechendes sollte auch für die frühen Schritte der Rekonstitution von Multi-Domänen-Proteinen und Molekülassoziaten gelten. Kinetische Methoden ermöglichen nicht nur die quantitative Bestimmung der Partikelverteilung während der konsekutiven Faltung und Assoziation, sondern auch die Analyse von strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Intermediate. Mit Faltung und Assoziation konkurrierende oder diese modifizierende Nebenreaktionen beruhen einerseits auf der „falschen Aggregation“ von Untereinheiten und andererseits auf deren co- oder posttranslationaler chemischer Modifizierung. Die hier diskutierten *in-vitro*-Experimente unterscheiden sich in bezug auf den entfalteten Zustand grundsätzlich von der Faltung der naszierenden Kette. Der entfaltete Zustand mag *in vivo* aufgrund cotranslationaler Faltung nicht vorkommen, zumindest nicht für Polypeptidketten oberhalb einer bestimmten Größe. Bei diesen tritt Domänenfaltung an die Stelle der Faltung des Gesamt moleküls; sie verhindert inkorrekte intramolekulare Wechselwirkungen und bedingt dadurch die ungewöhnlich schnelle Bildung der nativen dreidimensionalen Struktur, wie sie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet wird.

Die in diesem Beitrag referierten eigenen Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Den Herren Drs. P. Bartholmes, R. Rudolph und F. X. Schmid danke ich für Diskussionen und Kooperation. Für experimentelle Hilfe danke ich allen zitierten Mitarbeitern sowie Frau Ingrid Fuchs und den Angehörigen der Mechanischen Werkstatt

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III, den Herren R. Knott, G. Wiesener und K. Zweckerl.

Eingegangen am 10. Februar 1984 [A 490]

- [1] M. L. Anson, *Adv. Protein Chem.* 2 (1945) 361.
- [2] C. B. Anfinsen, H. A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* 29 (1975) 205.
- [3] M. F. Perutz, *Discovery* 1940, abgedruckt in [4], S. 14.
- [4] R. Jaenicke: *Protein Folding*, Elsevier, Amsterdam 1980.
- [5] R. E. Dickerson, I. Geis: *The Structure and Action of Proteins*, Harper & Row, New York 1969; *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1971.
- [6] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 168.
- [7] K. U. Linderstrom-Lang, J. A. Schellman in P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck: *The Enzymes*, 2. Aufl., Vol. 1, Academic Press, New York 1959, S. 443.
- [8] J. D. Bernal, *Discuss. Faraday Soc.* 25 (1958) 7.
- [9] M. G. Rossmann, P. Argos, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 497.
- [10] G. E. Schulz, R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure*, Springer, Berlin 1979.
- [11] D. B. Wetlauffer, S. Ristow, *Annu. Rev. Biochem.* 42 (1973) 135.
- [12] L. W. Bergmann, W. M. Kuehl, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8869.
- [13] A. Rich in A. Rich, N. Davidson: *Structural Chemistry and Molecular Biology*, Freeman, San Francisco 1968, S. 223; J. Hamlin, I. Zabin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 412.
- [14] F. Celada, A. Ullmann, J. Monod, *Biochemistry* 13 (1974) 5543; F. Celada, A. V. Fowler, I. Zabin, *ibid.* 17 (1978) 5156.
- [15] H. Tanuchi, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5459; A. W. Burgess, H. A. Scheraga, *J. Theor. Biol.* 53 (1975) 403.
- [16] C. Ghelis, J. Yon: *Protein Folding*, Academic Press, New York 1982, S. 11-21.
- [17] a) H. Neurath, R. L. Hill: *The Proteins*, 3. Aufl., Academic Press, New York; b) B. W. Erickson, R. B. Merrifield in [17a], Vol. 2, 1976, S. 257.
- [18] S. Mojsov, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 20 (1981) 2950.
- [19] F. M. Finn, K. Hofmann in [17a], Vol. 2, 1976, S. 105.
- [20] B. Gutte, M. C. Lin, D. G. Caldi, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4763; H.-G. Gattner, W. Danko, V. K. Naithani in D. Brandenburg, A. Wollmer: *Insulin*, de Gruyter, Berlin 1980, S. 99.
- [21] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14 (1959) 1.
- [22] I. M. Klotz, D. W. Darnall, N. R. Langermann in [17a], Vol. 1, 1975, S. 293.
- [23] F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 151.
- [24] S. Wodak, J. Janin, *J. Mol. Biol.* 124 (1978) 323; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1736; J. Janin, S. J. Wodak, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 42 (1983) 21.
- [25] R. Jaenicke, *Biophys. Struct. Mech.* 8 (1982) 231.
- [26] R. Jaenicke, R. Rudolph, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [27] a) R. E. Franklin, A. Klug, K. C. Holmes, *Ciba Found. Symp. Nature Viruses* 1957, 5; D. L. D. Caspar, *Adv. Protein Chem.* 18 (1963) 37; P. J. G. Butler, *J. Gen. Virol.* 65 (1984) 253; b) A. Klug, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 565.
- [28] K. C. Holmes, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 4; K. C. Holmes, *Ciba Found. Symp.* 93 (1982) 116; K. C. Holmes in D. B. Davies, W. Saenger, S. S. Danyluk: *Structural Molecular Biology*, Plenum, New York 1982, S. 475.
- [29] L. Hirth, K. E. Richards, *Adv. Virus Res.* 26 (1981) 145.
- [30] J. N. Champness, A. C. Bloomer, G. Bricogne, P. J. G. Butler, A. Klug, *Nature* 259 (1976) 20.
- [31] A. C. H. Durham, J. T. Finch, A. Klug, *Nature (New Biol.)* 229 (1971) 37; A. C. H. Durham, A. Klug, *ibid.* 229 (1971) 42; P. J. G. Butler, A. Klug, *ibid.* 229 (1971) 47.
- [32] J. J. Steckert, T. M. Schuster, *Nature* 299 (1982) 32.
- [33] G. Lebeurier, A. Nicolaieff, K. E. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 149.
- [34] J. Engel, H.-P. Bächinger, P. Bruckner, R. Timpl in [4], S. 345; P. Bruckner, E. F. Eikenberry, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
- [35] D. H. Smith, P. B. Berget, J. King, *Genetics* 96 (1981) 331; D. P. Goldenberg, J. King, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 633; D. H. Smith, J. King, *ibid.* 145 (1981) 653; D. P. Goldenberg, J. King, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3403; 80 (1983) 7060; D. Goldenberg, D. H. Smith, J. King, *Biopolymers* 22 (1983) 125.
- [36] M. J. Crumpton in R. Jaenicke, E. Helmreich: *Protein-Protein Interactions*, Springer, Berlin 1972, S. 395.
- [37] R. Jaenicke, *Naturwissenschaften* 65 (1978) 569.
- [38] R. Hermann, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Nature* 277 (1979) 243; R. Hermann, R. Jaenicke, R. Rudolph, *Biochemistry* 20 (1981) 5195; R. Hermann, R. Jaenicke, G. Kretsch, *Naturwissenschaften* 70 (1983) 517.
- [39] R. Jaenicke, W. Vogel, R. Rudolph, *Eur. J. Biochem.* 114 (1981) 525.
- [40] R. Girg, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 119 (1981) 301.
- [41] G. Zettlmeißl, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Arch. Biochem. Biophys.* 224 (1983) 161.

- [42] F. X. Schmid, H. Blaschek, *Biochemistry*, im Druck.
- [43] P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 665.
- [44] P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* 33 (1979) 167; 35 (1982) 1.
- [45] W. Pfeil, *Mol. Cell Biochem.* 40 (1981) 3.
- [46] J. M. Sturtevant in A. Weissberger, B. W. Rossiter: *Physical Methods of Chemistry, Vol. 1, Pt. 5*, Wiley-Interscience, New York 1971, S. 347; J. M. Sturtevant, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 3 (1974) 35; H.-J. Hinz, *ibid.* 12 (1983) 285; H.-J. Hinz in A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts: *Topics in Molecular Pharmacology*, Elsevier, Amsterdam 1983, S. 71.
- [47] R. Jaenicke, M. A. Lauffer, *Biochemistry* 8 (1969) 3077, 3083.
- [48] R. Jaenicke, *Naturwissenschaften* 70 (1983) 332.
- [49] T. E. Creighton, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33 (1978) 231.
- [50] R. L. Baldwin, T. E. Creighton in [4], S. 217.
- [51] K. A. Thomas, A. N. Schechter in R. F. Goldberger: *Biological Regulation and Development*, Vol. 2, Plenum, New York 1980, S. 43.
- [52] R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 453.
- [53] P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 459.
- [54] a) S. N. Timasheff, G. D. Fasman: *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, Dekker, New York 1969; b) J. A. Rupley in [54a], S. 694.
- [55] R. Jaenicke, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10 (1981) 1.
- [56] A. Hvist, *J. Theor. Biol.* 50 (1975) 245; *Biochim. Biophys. Acta* 537 (1978) 374.
- [57] A. Hvist, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12 (1983) 1.
- [58] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Tsernoglou, *Nature* 280 (1979) 558; D. Beece, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. C. Marden, L. Reinisch, A. H. Reynolds, L. B. Sorensen, K. T. Yue, *Biochemistry* 19 (1980) 5147.
- [59] a) H. Sund, C. Veeger: *Mobility and Recognition in Cell Biology*, de Gruyter, Berlin 1983; b) R. Huber, W. S. Bennet Jr. in [59a], S. 21.
- [60] a) P. D. Boyer: *The Enzymes*, 3. Aufl., Academic Press, New York; b) M. G. Rossmann, A. Liljas, C.-I. Brändén, L. J. Banaszak in [60a], Vol. 11, 1975, S. 61.
- [61] C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 122; 24 (1970) 1.
- [62] G. N. Ramachandran, A. K. Mitra, *J. Mol. Biol.* 107 (1976) 85.
- [63] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 283.
- [64] P. J. Flory: *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, NY 1953.
- [65] P. J. Flory: *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience, New York 1969.
- [66] R. Jaenicke, R. Rudolph, *FEBS Symp.* 49 (1977) 351.
- [67] J. W. Teipel, D. E. Koshland Jr., *Biochemistry* 10 (1971) 792.
- [68] R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 46 (1974) 149.
- [69] G. Zettlmeißl, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Biochemistry* 18 (1979) 5567; R. Rudolph, G. Zettlmeißl, R. Jaenicke, *ibid.* 18 (1979) 5572.
- [70] P. Bartholmes, H. Böker, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 102 (1979) 167; I. Biket, T. M. Roberts, M. T. Bladon, R. Green, E. Amann, D. M. Livingston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5572.
- [71] R. Jaenicke, R. Rudolph in [4], S. 525.
- [72] C. Levinthal, *J. Chim. Phys.* 65 (1968) 44.
- [73] V. Lim in [4], S. 149.
- [74] O. B. Ptitsyn, A. V. Finkelstein in [4], S. 101.
- [75] N. Gö, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12 (1983) 183.
- [76] D. B. Wetlauffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 697.
- [77] M. Karplus, D. L. Weaver, *Biopolymers* 18 (1979) 1421.
- [78] G. D. Rose, *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 447.
- [79] J. R. Garel, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 3347.
- [80] J. R. Garel, B. T. Nall, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1853; P. J. Hagermann, R. L. Baldwin, *Biochemistry* 15 (1976) 1462.
- [81] B. T. Nall, J. R. Garel, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 317.
- [82] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* 14 (1975) 4953.
- [83] F. X. Schmid, R. L. Baldwin, *FEBS Symp.* 52 (1979) 173; *J. Mol. Biol.* 133 (1979) 285; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4764.
- [84] K. Kuwajima, F. X. Schmid, *Adv. Biophys.*, im Druck.
- [85] F. X. Schmid, *Eur. J. Biochem.* 114 (1981) 105; 128 (1982) 77; F. X. Schmid, H. Blaschek, *ibid.* 114 (1981) 111.
- [86] H. Cook, F. X. Schmid, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 6157.
- [87] F. X. Schmid, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* 135 (1979) 199.
- [88] F. X. Schmid, *Biochemistry* 22 (1983) 4690.
- [89] M. Levitt, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 251.
- [90] H. Krebs, F. X. Schmid, R. Jaenicke, *J. Mol. Biol.* 169 (1983) 619.
- [91] C. B. Anfinsen, *Harvey Lect.* 61 (1966) 95; C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47 (1961) 1309.
- [92] R. Rudolph, I. Fuchs, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364 (1983) 813.
- [93] D. B. Wetlauffer, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 61; H. Neurath in [4], S. 501.
- [94] R. Jaenicke, R. Rudolph in H. Sund, V. Ullrich: *Biological Oxidations*, Springer, Berlin 1983, S. 62.
- [95] G. N. Cohen, A. Dautry-Varsat in H. Bisswanger, E. Schmincke-Ott: *Multifunctional Proteins*, Wiley, New York 1980, S. 49.
- [96] A. Dautry-Varsat, J. R. Garel, *Biochemistry* 20 (1981) 1396.
- [97] K. Müller, J. R. Garel, *Biochemistry* 23 (1984) 651, 654.
- [98] M. Jasion, L. Regan, P. Schimmel, *Nature* 306 (1983) 441; S. J. Wakil, J. K. Stoops, V. C. Yoshi, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 537.
- [99] F. M. Richards, H. W. Wyckoff in [60a], Vol. 4, 1971, S. 647.
- [100] A. Labhardt, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* 135 (1979) 245.
- [101] A. M. Labhardt, J. A. Ridge, R. N. Lindquist, R. L. Baldwin, *Biochemistry* 22 (1983) 321.
- [102] A. Bierzynski, P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2470.
- [103] M. A. Lauffer: *Entropy-driven Processes*, Springer, Berlin 1975.
- [104] B. C. Schade, R. Rudolph, H.-D. Lüdemann, R. Jaenicke, *Biochemistry* 19 (1980) 1121; B. C. Schade, H.-D. Lüdemann, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Biophys. Chem.* 11 (1980) 257.
- [105] K. Müller, H.-D. Lüdemann, R. Jaenicke, *Biochemistry* 20 (1981) 5411; *Biophys. Chem.* 14 (1981) 101.
- [106] K. Müller, H.-D. Lüdemann, R. Jaenicke, *Biophys. Chem.* 16 (1982) 1.
- [107] a) K. Mosbach: *Methods Enzymol.* 44 (1976); b) W. W.-C. Chan in [107a], S. 491; H. R. Horton, H. E. Swaisgood in [107a], S. 516.
- [108] W. W.-C. Chan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41 (1970) 1198.
- [109] R. Girg, R. Rudolph, R. Jaenicke, *FEBS Lett.* 163 (1983) 132.
- [110] R. Girg, R. Jaenicke, R. Rudolph, *Biochem. Int.* 7 (1983) 433.
- [111] R. Jaenicke, R. Rudolph, I. Heider, *Biochemistry* 18 (1979) 1271.
- [112] S. Anderson, G. Weber, *Arch. Biochem. Biophys.* 116 (1966) 207.
- [113] G. Zettlmeißl, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Biochemistry* 21 (1982) 3946.
- [114] P. H. von Hippel, T. Schleicher in [54a], S. 417.
- [115] R. Hermann, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 1259.
- [116] R. Hermann, R. Rudolph, R. Jaenicke, N. C. Price, A. Scobie, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11014.
- [117] D. Vogel, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 41 (1974) 607.
- [118] A. C. Bloomer, I. N. Champness, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *Nature* 276 (1978) 362.
- [119] T. M. Schuster, R. B. Scheele, L. H. Khairallah, *J. Mol. Biol.* 127 (1979) 461; S. J. Shirc, J. J. Steckert, T. M. Schuster, *ibid.* 127 (1979) 487.
- [120] J. M. Sturtevant, G. Velicelebi, R. Jaenicke, M. A. Lauffer, *Biochemistry* 20 (1981) 3792.
- [121] M. E. Goldberg, C. R. Zetina in [4], S. 469.
- [122] E. A. Carrey, R. H. Pain, *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1977) 689; B. Adams, R. J. Burgess, E. A. Carrey, I. R. Mackintosh, C. Mitchinson, R. M. Thomas, R. H. Pain in [4], S. 447.
- [123] T. E. Creighton, R. H. Pain, *J. Mol. Biol.* 137 (1982) 1.
- [124] C. Groha, P. Bartholmes, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 92 (1978) 437; T. Seifert, P. Bartholmes, R. Jaenicke, *Biophys. Chem.* 15 (1982) 1.
- [125] A. N. Lane, C. H. Paul, K. Kirschner, *EMBO J.* 3 (1984) 279.
- [126] M. Bothwell, H. K. Schachman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3221.
- [127] M. Bothwell, H. K. Schachman, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 1962, 1971.
- [128] R. Jaenicke, R. N. Perham, *Biochemistry* 21 (1982) 3378.
- [129] M. Nomura, W. A. Held in M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel: *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1974, S. 193.
- [130] K. N. Nierhaus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 97 (1982) 81.
- [131] E. Kellenberger, *Ciba Found. Symp.* 1966, 192.
- [132] R. Jaenicke, H. Krebs, R. Rudolph, C. Woenckhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1966.
- [133] J. Gerschitz, R. Rudolph, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 87 (1978) 591.
- [134] R. Rudolph, J. Gerschitz, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* 87 (1978) 601.
- [135] R. A. Cook, D. E. Koshland Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969) 247.
- [136] R. Jaenicke, R. Rudolph, I. Heider, *Biochem. Int.* 2 (1981) 23.
- [137] M. Gerl, Diplomarbeit, Universität Regensburg 1983.
- [138] R. Jaenicke in [59a], S. 67.
- [139] R. Cohen, M. Mire, *Eur. J. Biochem.* 23 (1971) 267.
- [140] M. E. Goldberg, *J. Mol. Biol.* 46 (1969) 441.
- [141] R. Arnon, M. Sela, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 (1969) 163.
- [142] R. P. Taylor, A. Silver, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 4650.
- [143] J. M. Teale, D. C. Benjamin, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 4609; 252 (1977) 4521.
- [144] B. Robson, R. H. Pain, *Biochem. J.* 155 (1976) 325, 331.
- [145] H. Gut freund: *Enzymes: Physical Principles*, Wiley-Interscience, London 1972.