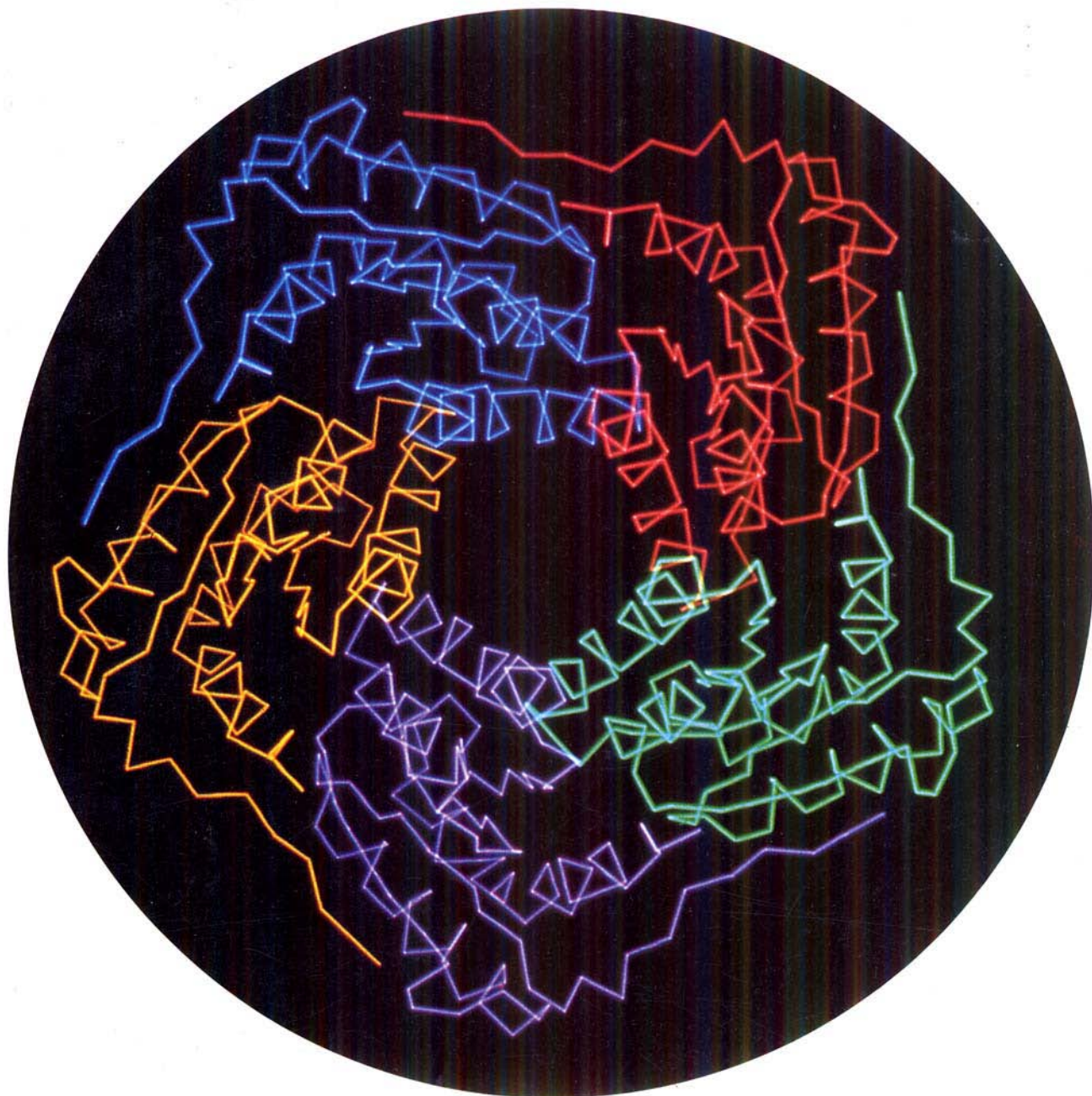


ANGEWANDTE CHEMIE

100. Jahrgang 1988

Heft 1

Seite 79–89



Robert Huber

Beweglichkeit und Starrheit in Proteinen und Protein-Pigment-Komplexen

Beweglichkeit und Starrheit in Proteinen und Protein-Pigment-Komplexen**

Von Robert Huber*

Proteinmoleküle sind starr oder flexibel entsprechend den Erfordernissen für ein optimales Funktionieren. Beweglichkeit großer Teile eines Proteins erscheint besonders interessant und soll in diesem Beitrag diskutiert werden. Wir unterscheiden mehrere Kategorien, wenngleich die Grenzen unscharf sind: Flexibilität von Polypeptidsegmenten, Ordnungs-Fehlordnungs-Übergänge zusammenhängender Bereiche und Bewegung von Domänen. Die Beweglichkeit von Domänen kann relativ frei oder auf bestimmte Moden beschränkt sein. Zur Illustration der Kategorien der Beweglichkeit wurden folgende Beispiele ausgewählt: a) Kleine Proteinase-Inhibitoren: Diese besonders starren Moleküle binden mit einer sterisch komplementären Oberfläche an die zugehörigen Proteinasen, wobei aber die gegenseitige Strukturanpassung eine Rolle spielt. b) Große Proteinase-Inhibitoren: Sie verändern ihre Konformation bei der Interaktion mit Proteasen stark. c) Pankreatische Serin-Proteasen: Ihre enzymatische Aktivität wird durch einen Ordnungs-Fehlordnungs-Übergang der Aktivierungsdomäne reguliert. d) Immunglobuline: Sie zeigen in einigen Teilen des Moleküls uneingeschränkte oder eingeschränkte Knickbewegungen; diese Beweglichkeit ermöglicht die Bindung an Antigene unterschiedlicher räumlicher Anordnung. e) Citrat-Synthase: Das Enzym pendelt zwischen Konformationen, die Substratbindung, enzymatische Kondensation und Produktfreisetzung ermöglichen. f) Riboflavin-Synthase: Dieser Multienzymkomplex katalysiert mit seinen α - und β -Untereinheiten zwei enzymatische Reaktionen; die β -Untereinheiten bilden eine Hülle, die die α -Untereinheiten einschließt; die Diffusionswege der enzymatischen Intermediate sind deshalb eingeschränkt; beim Aufbau des β -Capsids lagert sich das N-terminale Segment um. Im Gegensatz zu den genannten Beispielen vermitteln die Strukturen von Protein-Pigment-Komplexen der Primärprozesse der Photosynthese den Eindruck der Starrheit. Diese großen Proteinkomplexe dienen als Matrices, um die Pigmente in der geeigneten Konformation und relativen Anordnung zu fixieren. Bewegung würde zur Desaktivierung des angeregten Zustands der Pigmente beitragen und die Effizienz der Lichtenergie- und Elektronenübertragung beeinträchtigen.

1. Einleitung

Molekulare Flexibilität ist ein unscharf definierter, aber bildhafter Begriff, der auf Schwingungen, Fehlordnungen oder Strukturanpassungen bezogen wird. Dabei handelt es sich um recht unterschiedliche physikalische Erscheinungen, die durch die chemische Natur, die dreidimensionale Anordnung der Atome im Molekül und die Kraftfelder, in denen sich die Atome bewegen, bestimmt sind.

Viele physikalische und chemische Eigenschaften der Moleküle werden von ihren dynamischen Eigenschaften bestimmt, die deshalb mit einer Reihe theoretischer und experimenteller Methoden intensiv untersucht werden. Dadurch wurde bei vielen kleinen Molekülen ein detailliertes Verständnis von Struktur und Dynamik erreicht. Bei Proteinen stoßen die theoretischen Ansätze, d.h. die Versuche, Flexibilität durch Analyse der Normalschwingungen oder durch Berechnung der Moleküldynamik zu verstehen, auf grundsätzliche und rechnerische Probleme, die auf die große Zahl von Atomen und Schwingungsfreiheitsgraden, die ungenaue Kenntnis der Potentiale, in denen sich die Atome bewegen, und die Ungültigkeit der har-

monischen Näherung zurückzuführen sind. Zudem darf der Einfluß des Lösungsmittels nicht vernachlässigt werden, was erheblich zur Komplexität des Systems beiträgt. Trotz der dadurch erzwungenen näherungsweise Behandlung der Dynamik von Makromolekülen haben theoretische Studien wertvolle Erkenntnisse über sie erbracht^[1-5].

In ähnlicher Weise können experimentelle Studien von Makromolekülen nur Teileinsichten vermitteln, die in Betracht der Bedeutung der dynamischen Eigenschaften für die Funktion der Proteine dennoch willkommen sind. Wahrscheinlich geht jede Wechselwirkung von Proteinen mit Liganden mit einer Strukturanpassung einher. Seien es enzymatische Reaktionen, in denen chemische Bindungen gebildet oder gelöst oder Gruppen von Atomen übertragen werden, seien es Umordnungen von Domänen in Proteinmolekülen oder von Untereinheiten in oligomeren Proteinkomplexen, die in einem Reaktionscyclus ablaufen: Bewegung ist wesentlich. Sogar in Strukturproteinen wie den Hüllproteinen von Viren ist Flexibilität für die Assemblierung bedeutungsvoll^[6]. Allerdings ähnelt die Packungsdichte von Atomen in Proteinmolekülen der in Kristallen, was auf Starrheit hindeutet. Sterische Komplementarität ist eng verknüpft mit Starrheit, und sie ist die Basis für eine präzise Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand. Es ist also wichtig, zu erkennen, daß Flexibilität und Starrheit allgemeine Eigenschaften von Proteinmolekülen sind und

[*] Prof. Dr. R. Huber
Max-Planck-Institut für Biochemie
D-8033 Martinsried

[**] Das Vorsatzblatt ist Abbildung 8c dieses Beitrags.

daß es vom jeweiligen Beispiel abhängt, ob Flexibilität oder Starrheit dominiert.

Um diesen Gesichtspunkt deutlicher zu machen, werden im folgenden Proteine unterschiedlicher Flexibilität hinsichtlich ihrer funktionellen Signifikanz und den zugrundeliegenden strukturellen Eigenschaften diskutiert und mit besonders starren Proteinen verglichen werden. Die Beispiele und Gesichtspunkte, die beschrieben werden, wurden recht willkürlich ausgewählt und beschränken sich auf die Flexibilität großer Molekülbereiche. Flexibilität kleiner Bereiche, z. B. von Aminosäureseitenketten, hat ebenfalls funktionelle Bedeutung und ist universell, scheint aber für den Versuch, die Vielseitigkeit der Proteine zu dokumentieren, weniger interessant zu sein.

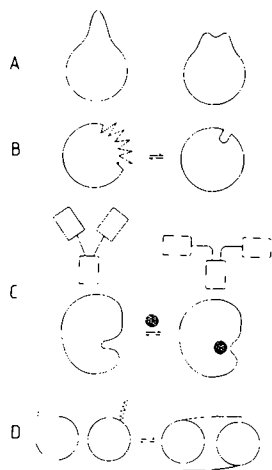


Abb. 1. Kategorien der Flexibilität großer Teile: A) Beweglichkeit von Segmenten. B) Übergang zwischen Ordnung und Fehlordnung. C) Freie und eingeschränkte Domänenbewegung. D) Strukturänderung von Untereinheiten beim Zusammenbau eines Oligomers.

Abbildung 1 zeigt die Arten von Flexibilität, die in Proteinen beobachtet wurden und später an Beispielen behandelt werden sollen. Flexibilität findet sich bei Aminosäureseitenketten, Polypeptidsegmenten und Proteindomänen. Die relative Beweglichkeit großer Teile von Proteinen mag der Enzymregulation dienen, die Bindung an Epitope eines Makromoleküls in mehreren geometrischen Anordnungen ermöglichen, eine aktive Form eines Enzyms erzeugen oder die Assoziation von Oligomeren stabilisieren.

2. Segmentäre Flexibilität

Kleine Protein-Proteinase-Inhibitoren sind besonders stabile Proteinmoleküle, wenn man Kriterien wie thermische Stabilität oder Nichtaustauschbarkeit eines großen Teils der Wasserstoffatome in D_2O anwendet. Dies zeigen NMR-Studien^[7,8] und die Neutronenbeugung^[9] am basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitor (BPTI). Durch NMR-Untersuchungen wurden jedoch Strukturfluktuationen in BPTI nachgewiesen, die durch spontanes Umklappen der Seitenketten aromatischer Aminosäuren, die sich im Inneren des Proteinmoleküls befinden, angezeigt werden^[10]. Dies ist ein Prozeß, der eine hohe Aktivierungsenergie und ein hohes Aktivierungsvolumen benötigt und auf große Fluktuationen in der Energie und in Packungsdefekten selbst bei Raumtemperatur hinweist.

Die Röntgenbeugung kann keine Information über diese aktivierten Prozesse liefern, da sie selten und sehr schnell sind und die Kristallstruktur, einen Mittelwert in Zeit und Raum, nicht sichtbar beeinflussen. Sie liefert jedoch Informationen über Positionen und Temperaturfaktoren (besser gesagt Fehlordnungsfaktoren) der Atome. Letztere sind ein Maß für die durchschnittlichen Abweichungen von der Gleichgewichtslage. Sie ermöglichen es, zwischen starren und „beweglichen“ Teilen eines Proteins zu unterscheiden, nicht aber zwischen den sehr unterschiedlichen physikalischen Phänomenen der thermischen Mobilität und der statischen Fehlordnung als Ursache der „Beweglichkeit“. Zusätzlich zu den Temperaturfaktoren hilft die Analyse verschiedener Kristallformen eines Proteins, die flexiblen Teile zu definieren, da sie anders als die starren Bereiche leicht durch Kristallgitterkräfte verändert werden (Abb. 2).

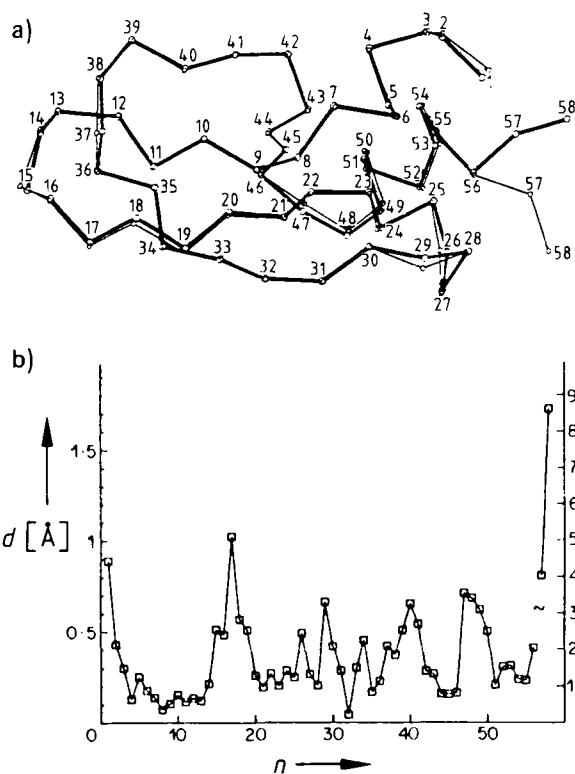


Abb. 2. Vergleich zweier BPTI-Kristallformen. a) Überlagerung der C^α -Positionen, b) ihre Abweichungen [11]. n = Position, d = Abweichung (die rechte Ordinate gilt für die Reste 57, 58).

Bei BPTI ergaben beide Experimente, die Analyse der Temperaturfaktoren und der Vergleich von Kristallformen^[11], eine erhöhte Flexibilität des Segments um den Rest Lysin 18. Dieses Segment ist an der Bindung an Proteasen beteiligt und ändert seine Konformation bei der Komplexbildung so, daß sich die stereochemische Passung verbessert (siehe Abb. 10 in ^[12]). Ähnliche Phänomene wurden in der Familie der Ovomucoide und sekretorischen Inhibitoren beobachtet^[13,14]. Es zeigte sich, daß das bindende Segment des Inhibitors im Komplex wesentlich niedrigere Temperaturfaktoren aufwies als im freien Zustand (siehe Abb. 11a in ^[13] und Abb. 5 in ^[14]). Insgesamt sind jedoch die Strukturanpassungen bei der Komplexbil-

dung gering, so daß man mit Recht von einer vorgeformten sterischen Komplementarität der kleinen Protease-Inhibitoren und ihrer zugehörigen Proteasen sprechen kann. In Einklang damit sind die Konformationen der Proteasebindungssegmente in allen Inhibitoren von Serin-Proteasen sehr ähnlich^[15, 16], auch wenn in den übrigen Molekülteilen keine Verwandtschaft zu beobachten ist.

Das allgemeingültige Bild von Struktur und Funktion kleiner Inhibitoren der Serin-Proteasen trifft nicht auf den α_1 -Protease-Inhibitor, den häufigsten Inhibitor der Serin-Proteasen im Blut von Säugetieren, zu. Dabei handelt es sich um ein wesentlich größeres Molekül, das sich auch funktionell anders verhält als die kleinen Inhibitoren. Proteasen spalten die suszeptiblen Peptidbindungen an der Proteasebindungsstelle in kleinen und großen Inhibitoren spezifisch. Die gespaltenen Spezies sind nur bei kleinen Inhibitoren aktiv, bei denen die neuen Kettenenden eng benachbart bleiben, wie kürzlich durch Kristallstrukturanalysen von gespaltenen Ovomuroid-Inhibitoren gezeigt wurde (Abb. 3a)^[17]; dadurch führt die Komplexbildung

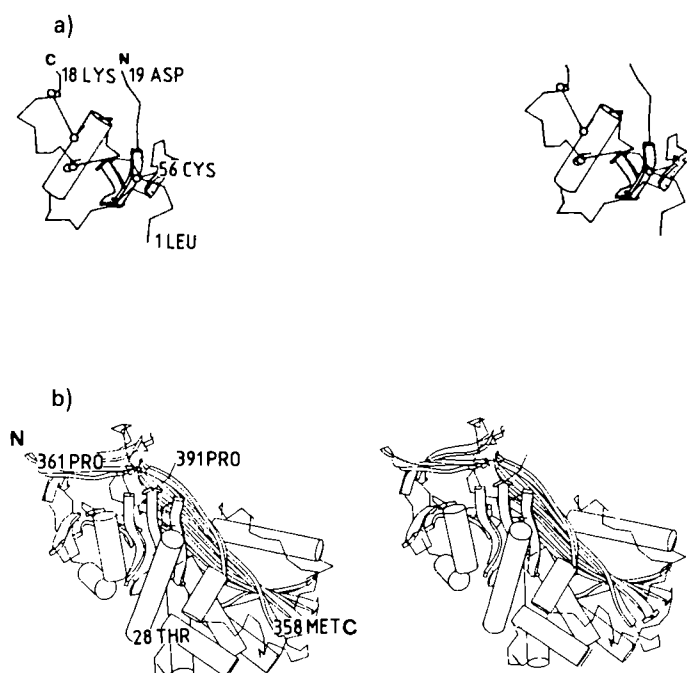


Abb. 3. a) Stereozeichnung der spezifisch gespaltenen Form des Ovomuroid-Inhibitors OMJPQ. Die neuen N- und C-Termini (N bzw. C), die durch die proteolytische Spaltung gebildet werden, bleiben in enger Nachbarschaft [17]. b) Stereozeichnung der gespaltenen Form des α_1 -Protease-Inhibitors. Die neuen Kettenenden (N und C) bei den Resten 359 bzw. 358 liegen an entgegengesetzten Enden des Moleküls [19].

der gespaltenen Spezies mit Proteasen zur Resynthese der Peptidbindung^[18]. Im Gegensatz dazu sind die gespaltenen Spezies von Inhibitoren der α_1 -Protease-Inhibitor-Familie inaktiv. Eine Analyse der Kristall- und Molekülstruktur des α_1 -Protease-Inhibitors lieferte eine Deutung auf molekularer Ebene^[19]. Der α_1 -Protease-Inhibitor, bei dem die Met358-Ser359-Bindung gespalten ist, ist ein kompaktes Molekül mit einem hohen Anteil an wohlgeordneter Sekundärstruktur. Überraschenderweise liegen die neuen Kettenenden Met358 und Ser359 an entgegengesetzten Enden des Moleküls, 70 Å voneinander entfernt und in zwei

β -Faltblätter integriert (Abb. 3b). Die – nicht bekannte – Struktur des intakten α_1 -Protease-Inhibitors ist gewiß sehr verschieden davon, da Met358 und Ser359 in ihm kovalent verbunden sind. Einige Beobachtungen machen in der Tat deutlich, daß die Spaltung der Met358-Ser359-Bindung von großen Änderungen der Stabilität und der physiologischen Eigenschaften begleitet wird (Abb. 4).^[20] Die gespannte Form S des intakten Proteins entspannt sich nach der limitierten Proteolyse zur Form R. Die konformative Spannung könnte sich in der Met358-Ser359-Bindung konzentrieren und zu einer außergewöhnlichen Affinität gegenüber Serin-Proteasen führen.

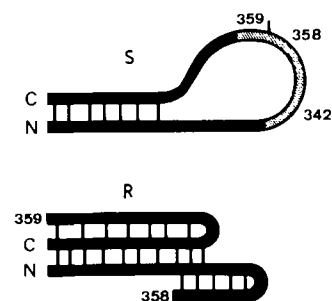


Abb. 4. Im intakten Zustand des α_1 -Protease Inhibitors ist das Polypeptidsegment um 358-359 exponiert und vermutlich in gespannter Konformation (S). Nach limitierter Proteolyse nimmt das Molekül die kristallographisch festgestellte entspannte starre Form R an.

Der α_1 -Protease-Inhibitor gehört einer großen Familie von Proteinen und Serin-Protease-Inhibitoren im Serum an^[21]. Alle Mitglieder dieser Familie, jedenfalls solche mit Inhibitorfunktion, zeigen wahrscheinlich ähnliche Strukturen und Strukturübergänge. Das Prinzip der konformativen Spannung könnte auch auf α_2 -Makroglobulin, einen anderen Plasma-Protease-Inhibitor – jedoch mit dem α_1 -Protease-Inhibitor nicht verwandt –, zutreffen^[22] und die ungewöhnlich leichte Proteolyse eines bestimmten Segments, der Köderregion, erklären.

3. Ordnungs-Fehlordnungs-Übergänge

Die Zielmoleküle der natürlichen Serin-Protease-Inhibitoren, die Serin-Proteasen, zeigen eine andere Art von Flexibilität. Serin-Proteasen werden als Proenzyme synthetisiert, die durch limitierte Proteolyse aktiviert werden^[23, 24]. Die damit verbundenen strukturellen, thermodynamischen und kinetischen Daten wurden in allen Einzelheiten analysiert (Abb. 5)^[25]. Abbildung 5a faßt die durch den Vergleich der Strukturen von Trypsinogen, Trypsin und ihren Komplexen mit BPTI gewonnenen Resultate zusammen: Im Proenzym Trypsinogen ist ein Teil des Moleküls, die Aktivierungsdomäne, ungeordnet. Bei der Umwandlung in Trypsin wird diese Domäne geordnet. Der auslösende Faktor ist die Bildung einer Ionenbindung zwischen einem Asparaginsäurerest und dem N-Terminus, der durch die aktivierende Spaltung freigesetzt wurde. Die Aktivierungsdomäne ist an der Substratbindung, die einen geordneten Zustand voraussetzt, beteiligt. Die katalytische Ineffizienz von Trypsinogen ist daher als Folge unzulänglicher Substratbindung zu verstehen. Sehr starke Liganden wie BPTI

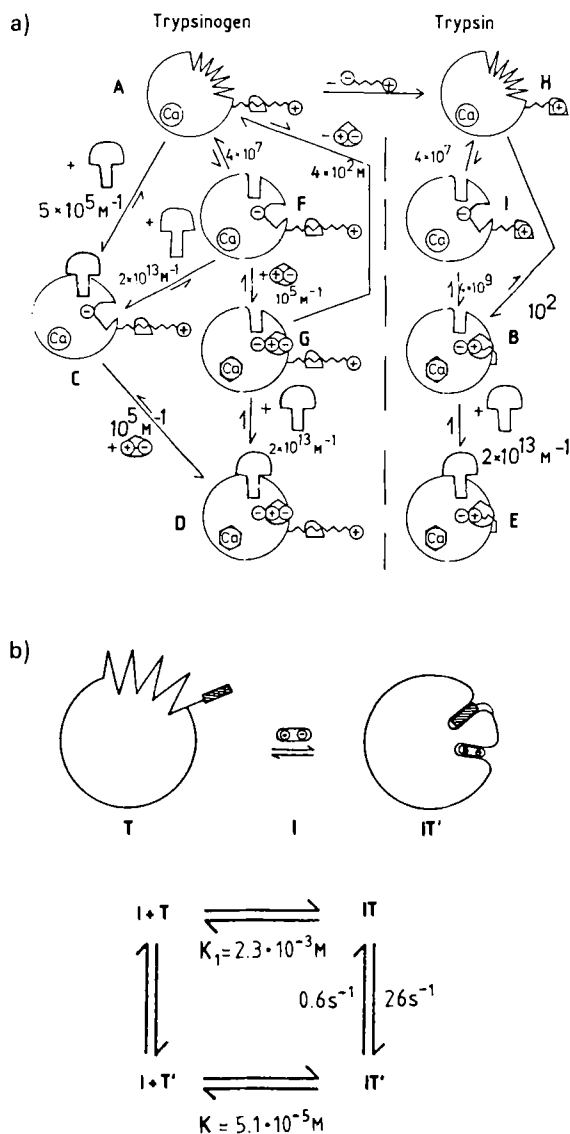


Abb. 5. Schemata der Strukturen und Thermodynamik des Systems Trypsinogen/Trypsin/BPTI/Aktivierungspeptid. a) In Trypsinogen ist die Aktivierungsdomäne fehlgeordnet (A), wird aber geordnet (B) nach der Abspaltung des N-terminalen Peptids (A · H). Der freigesetzte N-Terminus wechselwirkt stark mit Trypsin (B). B bildet einen festen Komplex mit BPTI (E). Auch Trypsinogen bildet einen Komplex mit BPTI (C), in dem die Aktivierungsdomäne geordnet ist. Dieser Komplex ist schwächer als E, wird aber durch die Wechselwirkung mit einem exogenen Peptid stabilisiert, das dem N-Terminus von Trypsin ähnelt (D). A–E wurden in Kristallen beobachtet und die zugehörigen Assoziations- $[M^{-1}]$ oder Gleichgewichtskonstanten bestimmt (große Zahlen). Die übrigen Strukturen und Assoziations- oder Gleichgewichtskonstanten sind hypothetisch (kleine Zahlen) [25]. b) Ausgehend vom einfachen System aus Trypsinogen und kovalent gebundenem *p*-Guanidinobenzoat (T) wird die Aktivierungsdomäne geordnet und die Bindungstasche für den Liganden *p*-Guanidinobenzoat in Anwesenheit des exogenen Peptids I gebildet. Struktur, Thermodynamik und Kinetik dieses Systems wurden analysiert [25, 71]. Die Messungen deuten auf eine relativ langsame Isomerisierung (Geschwindigkeitskonstante 26 s^{-1}) eines lockeren Komplexes IT zur stabilen Spezies IT' hin, die vermutlich beim Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang eine Rolle spielt.

können aber an Trypsinogen binden und bewirken dabei den Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang der Aktivierungsdomäne. Die Wechselwirkung ist schwächer als bei Trypsin, da der N-Terminus nicht zur Bindung beiträgt. Andere Systeme, die ebenfalls einen Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang zeigen, wurden auf atomarer Ebene charakterisiert, wenngleich weniger detailliert als das System der Serin-Proteasen und ihrer Inhibitoren: Der Übergang Pro-

phospholipase → aktive Phospholipase ist mit der Ordnung eines Molekülbereichs verbunden^[26]. Ein großer Teil der C_H2 -Domäne (eine der konstanten Faltungsdomänen der schweren (H-)Kette) des C-terminalen Fragments (Fc) der Immunglobuline ist ungeordnet^[27]. Es wird vermutet, daß einige dieser ungeordneten Segmente für Effektorfunktionen eine Rolle spielen. Im Tabakmosaik-Virus (TMV) ist die Polypeptidkette, die den Kontakt mit der Ribonucleinsäure (RNA) vermittelt, im intakten Virus geordnet^[28], in der leeren Proteinhülle jedoch ungeordnet^[29]. Das läßt vermuten, daß ein Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang dieses Bereichs des Hüllproteins den Aufbau des Virus begleitet. Ein Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang von beweglichen N-terminalen „Arm“-Regionen bestimmter Untereinheiten des Hüllproteins scheint auch beim Aufbau kugelförmiger ikosaedrischer Viren eine Rolle zu spielen^[30].

Bis jetzt wurde der ungenaue Ausdruck „fehlgeordnet“ benutzt, um den Zustand der Aktivierungsdomäne in Trypsinogen oder der ungeordneten Bereiche in den anderen Beispielen zu beschreiben. Diese Regionen tragen zum Röntgenbeugungsdiagramm der Kristalle nicht erheblich bei. Ursache kann eine „statische“ oder eine „dynamische“ Fehlordnung sein, die der Ordnung des Kristallgitters nicht folgt. Statische Fehlordnung ist dabei durch die Existenz unterschiedlicher Konformere des Moleküls, die statistisch im Kristallgitter verteilt sind, definiert, während dynamische Fehlordnung auf ein Konformer mit großen thermischen Fluktuationen zurückzuführen ist. Die Temperaturabhängigkeit dieser beiden Modelle ist sehr verschieden, so daß man durch Beugungsexperimente bei mehreren Temperaturen zwischen ihnen unterscheiden kann. Beugungsuntersuchungen an Proteinkristallen bei tiefen Temperaturen sind schwierig, wurden jedoch an Trypsinogenkristallen durchgeführt^[31]. Es zeigte sich, daß sogar bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs die Aktivierungsdomäne nicht zur Röntgenbeugung beiträgt. Das läßt darauf schließen, daß statische Fehlordnung vorherrscht und die Aktivierungsdomäne in einer Reihe von Konformationen ähnlicher Stabilität existiert. Übergänge zwischen diesen Konformeren sind bei Raumtemperatur möglich. Die Gleichgewichtslage kann durch schwache äußere Kräfte, z. B. die Kristallpackung, verändert und dadurch ein Konformer selektiv stabilisiert werden. Das ist in der Tat der Fall bei dem mit Trypsinogen verwandten α -Chymotrypsinogen, dem Proenzym der Serin-Protease Chymotrypsin. Zwei Kristallformen wurden analysiert, von denen eine zwei unabhängige Moleküle in der asymmetrischen Einheit aufwies^[32–34]. Die jeweils anderen Kristallpackungskräfte haben nur wenig Einfluß auf die starren Teile der Moleküle, beeinflussen jedoch die flexible Aktivierungsdomäne und stabilisieren unterschiedliche Konformere. Die Ergebnisse dieser Studien bestätigen die allgemeinen Schlußfolgerungen, die aus den Untersuchungen an Trypsinogen gezogen wurden, und decken eine neue Seite des schillernden Begriffs Fehlordnung auf. Ein tieferes Verständnis der physikalischen Grundlagen für die experimentellen Ergebnisse könnte durch Berechnungen der Moleküldynamik des Trypsinogen-Trypsin-Systems erreicht werden^[35].

Röntgenographische Experimente bei mehreren Temperaturen ermöglichen es, zwischen dynamischer und stati-

scher Fehlordnung zu differenzieren und in letzterem Fall, eine untere Grenze für die Zahl der Konformere zu definieren. Der Begriff „statische Fehlordnung“ ist jedoch irreführend, da ein Übergang zwischen den Konformeren in Abhängigkeit von der Temperatur möglich ist. Durch Beugungsexperimente können die Geschwindigkeitskonstanten und die Energien dynamischer Prozesse nicht bestimmt werden; dies gehört in den Bereich der Spektroskopie. Trypsinogen wurde daher mit der zeitaufgelösten Spektroskopie der gestörten γ - γ -Winkelkorrelation^[36] untersucht; dabei zeigten sich in der Tat bei Raumtemperatur Übergänge im Nanosekundenbereich, die bei tiefer Temperatur nicht auftreten^[37]. Das Ergebnis der kristallographischen und spektroskopischen Experimente läßt sich so zusammenfassen: Die Struktur der Aktivierungsdomäne oszilliert bei Raumtemperatur zwischen Konformeren ähnlicher Stabilität. Zusätzlich zu dieser Bewegung schwingen die Atome in den Konformeren um ihre Gleichgewichtslagen. Derartige Eigenschaften sind charakteristisch für Flüssigkeiten, gelten aber bei Proteinen nur für deren ungeordnete Regionen (für eine kritische allgemeine Diskussion siehe^[38]).

4. Beweglichkeit von Domänen

Bisher wurden strukturelle und funktionelle Aspekte der Flexibilität und Fehlordnung in relativ kleinen Teilen von Proteinen behandelt. Wir wenden uns jetzt Proteinen zu, bei denen sich große Bereiche (Domänen) gegenüber anderen Teilen als starre Körper bewegen. Die Konformationsänderungen, die solche Bewegungen ermöglichen oder begleiten, sind häufig auf kurze Segmente oder einzelne Peptideinheiten beschränkt, die als Gelenke bezeichnet werden. In den Gelenkregionen tritt häufig die Aminosäure Glycin auf, vermutlich weil durch das Fehlen einer Seitenkette in dieser Aminosäure die konformative Beweglichkeit größer ist. Ähnlich markieren häufig Glycinreste die Grenzen zwischen geordneten und ungeordneten Segmenten in den Proteinsystemen, die in Abschnitt 3 behandelt wurden.

Das wohl am besten definierte Beispiel eines Proteinmoleküls mit uneingeschränkter Domänenbeweglichkeit ist das Immunglobulinmolekül. Immunglobuline der Klasse G (IgG) sind symmetrische Dimere aus zwei H- und zwei L- (leichten) Ketten. Lange bevor Kristallstrukturen bekannt waren, war aus Aminosäuresequenzen ersichtlich, daß H- und L-Ketten lineare Anordnungen von vier bzw. zwei strukturell verwandten Domänen sind. Die Beobachtung, daß die Segmente, die die Domänen verbinden, vorzugsweise von proteolytischen Enzymen gespalten werden und daß dabei stabile Fragmente freigesetzt werden, die eine Teilfunktion des intakten Moleküls beibehalten, bestätigt diese Annahme.

Hydrodynamische, spektroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben den Beweis für die weitgehende Flexibilität der Immunglobuline geliefert^[39-42]; es bedurfte jedoch kristallographischer Untersuchungen, um das Domänenmotiv der Immunglobuline zu bestätigen und die Bewegungsarten auf atomarer Ebene zu zeigen (Abb. 6)^[43]. Es wurde festgestellt, daß sich identische oder eng verwandte IgG-Fragmente, die in unterschiedlichen Kristallformen analysiert wurden, in der rela-

tiven Anordnung von Domänenpaaren (Modulen) unterscheiden. Die Anordnung des (V_H - V_L)-Moduls (V-Domänen sind variable Faltungsdomänen) in Bezug auf das (C_H1 - C_L)-Modul zeigt im „Ellenbogenwinkel“ Veränderungen bis zu 60°. Die relative Orientierung der Arme des antigenbindenden Fragments (Fab) variiert von maximaler Ausdehnung (T-Form) bis zur parallelen Anordnung, wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich ist. Die Struktur des Fc-Fragments, des Stammteils der Immunglobuline, ist konstanter, aber auch hier unterscheiden sich die Orientierungen der C_H2 -Domänen relativ zu den C_H3 -Domänen um 5° bis 10° je nach Kristallverband. Ein glücklicher Umstand bei kristallographischen Experimenten ermöglichte die direkte Beobachtung der Flexibilität zwischen Fab und Fc, weil Kristalle des intakten Immunglobulins und seines (Fab)₂-Fragments, das kein Fc enthält, zugänglich waren^[44a]. Beide Kristalle zeigten selbst bei geringer Auflösung sehr ähnliche Röntgenbeugungsspektren; dies belegt die Fehlordnung des Fc-Teils im kristallinen Zustand und ihre überwiegend statische Natur. Wäre der Fc-Teil dynamisch fehlgeordnet, d.h. gekennzeichnet durch Oszillationen um eine einzige Gleichgewichtslage, müßten die Beugungsmuster des intakten IgGs und des (Fab)₂-Fragments zumindest bei geringer Auflösung verschieden sein.

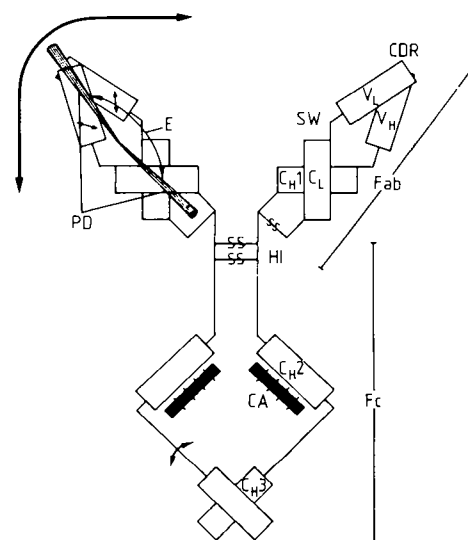


Abb. 6. Schema eines Immunglobulinmoleküls der IgG-Klasse. Es ist ein symmetrisches Dimer aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die in vier bzw. zwei Domänen gefaltet sind. Das V_H - V_L -Modul bildet durch die komplementären Regionen (CDR) die Antigenbindungsstelle. Die Module und Domänen zeigen Beweglichkeit relativ zueinander. Das Ausmaß dieser Beweglichkeit ist durch die doppelten Pfeile angegeben. E = Ellenbogen, HI = Scharnier, SW = Schalter, CA = Kohlenhydrat, PD = pseudo-zweizählige Achse.

Eine bewegliche Verbindung des Fab-Teils mit dem Fc-Stamm ist von funktioneller Bedeutung, wie bei IgG-Varianten beobachtet wurde, bei denen das Scharnier, das Fab und Fc verbindet, entfernt war. Sie können einige biologische Funktionen nicht ausführen, für die der Fc-Teil wichtig ist (eine Übersicht dazu bietet^[44b]). Dieser Umstand weist auf das interessante Problem der Kooperativität zwischen den Funktionen der Fab- und Fc-Teile, Antigenbindung und Effektorfunktion, hin. Die kovalente Bindung zwischen Fab und Fc verknüpft diese Funktionen räum-

lich, ohne daß – wegen der relativen Beweglichkeit beider Teile – ihre Reaktivität gegenüber anderen Makromolekülen stark eingeschränkt ist. Die Beweglichkeit ist in den scharnierlosen IgG-Varianten beeinträchtigt, und Bindungsstellen an Fc können durch die Fab-Teile abgedeckt werden. Es gibt allerdings trotz intensiver Suche keine weiteren Belege für die Existenz kooperativer Effekte. Die strukturelle Beweglichkeit ist unvereinbar mit einer Signalübertragung zwischen Fab und Fc^[45]. Eine Signalübertragung zwischen den (V_H-V_L)- und (C_H1-C_L)-Modulen innerhalb des Fab-Teils wurde dagegen durch eine Reihe von Experimenten bewiesen. Die (V_H-V_L)- und (C_H1-C_L)-Module sind durch ein Scharnierpeptid voneinander getrennt, das eine Ellenbogenbewegung und damit die Bildung oder Lösung von longitudinalen, nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen V_H und C_H1 ermöglicht. Die kürzlich entdeckte Verzerrung des (V_H-V_L)-Moduls durch Antigenbindung könnte der Auslöser sein, durch den der Ellenbogenwinkel und die Kontakte mit dem (C_H1-C_L)-Modul geändert werden^[46]. Beispiele für weitere Proteine, die kovalent, aber flexibel verbundene Domänen aufweisen, sind das Protein A^[27,47] und Ovomucoid-Inhibitoren^[14,18]. An den Proteolysefragmenten dieser Proteine wurden Strukturuntersuchungen durchgeführt. Deren Ergebnisse und die funktionellen Eigenschaften der Fragmente deuten darauf hin, daß in den Fragmenten Struktur und thermische Stabilität der intakten Moleküle erhalten bleiben und signifikante Wechselwirkungen zwischen den Domänen in den intakten Molekülen fehlen. Aus repetitiven Aminosäuresequenzen ist zu schließen, daß ein ähnliches Konstruktionsprinzip auf die Hauptproteinkomponente des Cytoskeletts (Spectrin)^[48] und der extrazellulären Matrix (Fibronectin und Laminin)^[49] zutrifft. Diese Proteine bilden ein Netz von Domänen, das spezifische Bindungsstellen für andere Zellkomponenten aufweist und dazu dienen kann, diese Komponenten im Raum zu ordnen.

Die Bewegung der Fab-Teile des Immunglobulins relativ zum Fc-Teil ist fast ungehindert, da die langen Verbindungssegmente nur geringe sterische Einschränkungen verursachen. Die Ellenbogenbeugung in den Fab-Teilen dagegen ist durch die Doppelverbindung der (V_H-V_L)- und (C_H1-C_L)-Module stärker eingeschränkt. Diese Art von Domänenbeweglichkeit führt uns zur Beweglichkeit in einigen Enzymen, in denen Domänen mit kleinen Winkeln oszillieren.

Das Enzym Citrat-Synthase ist dafür ein Beispiel, das strukturell und funktionell gut charakterisiert ist^[50-52]. Citrat-Synthase ist ein Dimer, das die Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A zu Citrat und Coenzym A katalysiert. Jede Untereinheit ist in eine große und eine kleine Domäne gefaltet, wie durch Kristallstrukturuntersuchungen von ligandierten und freien Enzymformen gezeigt wurde. Die nichtligandierte Enzymform ist durch eine tiefe Spalte zwischen den großen und den kleinen Domänen gekennzeichnet. Die kleine Domäne ist aus einem fortlaufenden Kettensegment gefaltet und doppelt an die große Domäne gebunden. Wenn die Synthase Produktmoleküle gebunden enthält, ist der Spalt zwischen der großen und kleinen Domäne einer Untereinheit geschlossen, so daß die Moleküle eingeschlossen sind (Abb. 7). Eine ähnliche geschlossene Form findet man, wenn die Substrate an die Synthase gebunden sind. Der Unterschied zwischen offe-

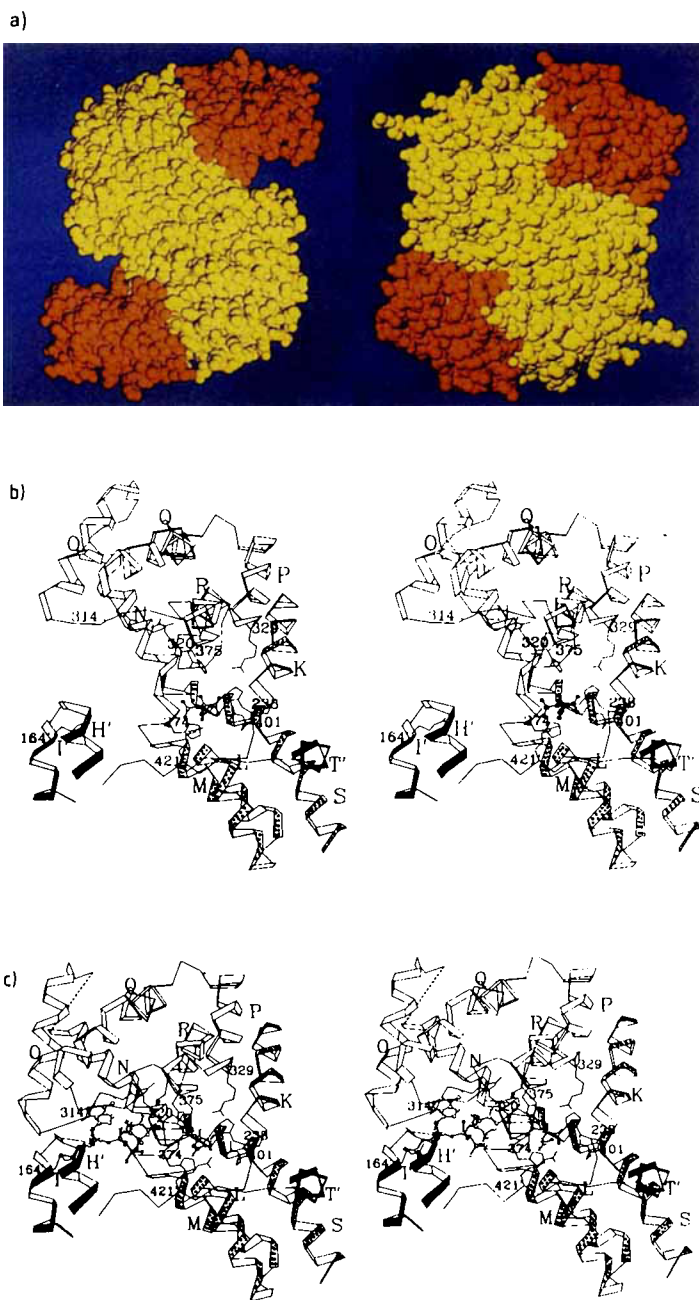


Abb. 7. a) Raumfüllende Darstellung der offenen (links) und geschlossenen (rechts) Form von Citrat-Synthase. Die kleinen Domänen sind rot, die großen gelb. b) Stereozeichnung der offenen Form der Citrat-Synthase in der Nähe eines Citratmoleküls. c) Stereozeichnung der geschlossenen Form, die die Produkte Citrat und Coenzym A gebunden enthält. Die Bindungsstelle des Coenzym A in der geschlossenen Form wird durch Reste der kleinen Domäne (offenes Band) und der großen Domänen beider Untereinheiten (punktirtes und gefülltes Band) gebildet [50, 52].

ner und geschlossener Form kann in erster Näherung durch eine Rotation der kleinen Domäne um etwa 18° relativ zur großen Domäne beschrieben werden. Die dichte Packung in der geschlossenen Enzymform läßt vermuten, daß es sich dabei um eine starre Molekülform handelt, die auch in Lösung vorherrscht. Die offene Form mag zwar in Lösung flexibel sein, im Kristallverband wird aber ein bestimmtes Konformer selektiert. Die detaillierte Analyse der Strukturen legt nahe, daß die katalysierte Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A in der geschlossenen Form abläuft, während Substrataufnahme und Pro-

duktfreisetzung über die offene Form stattfinden, da die Bindungsstelle dann für die Lösung zugänglich ist. Es überrascht nicht, daß die Kondensationsreaktion in der vom Lösungsmittel abgeschlossenen Umgebung, der geschlossenen Form der Citrat-Synthase, stattfindet, in der beide Substrate unmittelbar benachbart sind. Neben diesem allgemeinen Effekt der Annäherung und Desolvatation spielen bestimmte katalytisch wirkende Reste eine Rolle, von denen His274 verdient erwähnt zu werden. Es befindet sich neben Gly275, das an der Domänenrotationsachse liegt und seine Konformation beim Übergang zwischen offener und geschlossener Form drastisch ändert. Es scheint, als löse die Wechselwirkung von His274 mit dem Substrat den Konformationsübergang zur geschlossenen Form aus, die dann durch eine Vielzahl von Proteinwechselwirkungen stabilisiert wird. Auch hier befindet sich ein Glycinrest an der Domänengrenze. Die beiden geschlossenen Formen der Citrat-Synthase, die Produkt- bzw. Substratmoleküle gebunden enthalten, zeigen zahlreiche Differenzen in der Struktur der kleinen Domänen. Die Enzymstruktur reagiert offensichtlich auf die katalytischen Teilreaktionen und die Bindungserfordernisse der Zwischenprodukte. Diese Art von Flexibilität ist mit den geringen Änderungen verwandt, die für kleine Protease-Inhibitoren bei der Komplexbildung mit Proteasen beobachtet wurden.

Die durch Liganden verursachte Konformationsänderung der Citrat-Synthase ist in Einklang mit einem geordneten sequentiellen Mechanismus der Bindung der beiden Substrate, Oxalacetat und Acetyl-CoA, und einer starken Kooperativität: Oxalacetat bewirkt die geschlossene Form, die erst die Bindung des Co-Substrats Acetyl-CoA ermöglicht, da die offene Form keine Bindungsstelle dafür aufweist (Abb. 7).

Eine Domänenbewegung zwischen offenen und geschlossenen Formen wie bei der Citrat-Synthase wurde auch in einigen anderen Proteinen gefunden und im Detail aufgeklärt: bei Aspartat-Aminotransferase^[53, 54], Alkohol-Dehydrogenase^[55], Hexokinase^[56] und Adenylat-Kinase^[57]. Beim Arabinose-Bindungsprotein^[58] und bei Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase^[59] gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Domänenbewegung.

5. Flexibilität beim Zusammenbau von Oligomeren

Es ist nicht verwunderlich, daß Flexibilität nicht nur bei der Wechselwirkung von Proteindomänen innerhalb einer Polypeptidkette eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei der Assemblierung von Oligomeren. Die Entwicklung von günstigen Kontakten zwischen den Untereinheiten fördert die Assoziation. Die Polypeptidsegmente, die in den isolierten Untereinheiten exponiert sind, werden im Aggregat vergraben und reagieren auf diese drastische Änderung ihrer Umgebung. Eine Art von Reaktion haben wir bereits im Fehlordnungs-Ordnungs-Übergang des TMV gesehen, bei dem beide Zustände – das leere Capsid und das intakte Virus – direkt beobachtet werden konnten. Eine andere Auswirkung wurde in sphärischen Viren beobachtet, deren chemisch identische Proteinuntereinheiten in der ikosaedrischen Hülle ungleiche Strukturen aufweisen^[60]. In einem Ikosaeder können sechzig Einheiten äqui-

valente Lagen einnehmen. In Partikeln mit der Triangulationszahl $T=3$ sind die 3×60 Proteinuntereinheiten in Triplets aus quasi-äquivalenten Molekülen angeordnet. Die Quasi-Äquivalenz spiegelt sich wider in deutlichen Unterschieden zwischen den Proteinuntereinheiten sowie in der Art, wie je zwei globuläre Domänen relativ zueinander angeordnet sind. Sie können eine von zwei relativen Orientierungen einnehmen, abhängig von der Lage der Untereinheit bezüglich der ikosaedrischen Symmetrie.

In anderen Fällen stehen Polypeptidsegmente weg vom globulären Teil der Untereinheiten, sind jedoch mit einer angrenzenden Untereinheit im Aggregat verbunden. Es ist wahrscheinlich, daß diese Segmente ungeordnet sind oder alternative Konformationen in den isolierten Untereinheiten einnehmen. Die Armsegmente der ikosaedrischen Viren, die oben erwähnt wurden, sind ein Beispiel für diese Art von Flexibilität. Ein weiteres Beispiel ist der bifunktionelle Multienzymkomplex Riboflavin-Synthase^[61, 62]. Riboflavin-Synthase besteht aus zwei verschiedenen chemischen Untereinheiten. Sechzig β -Untereinheiten bilden eine Hülle mit ikosaedrischer Symmetrie. Drei α -Untereinheiten besetzen den Kern des Partikels. Die Polypeptidkette der β -Untereinheiten ist zu einem viersträngigen β -Faltblatt und vier α -Helices, zwei an jeder Seite des β -Faltblatts, gefaltet. Das N-terminale Segment aus zehn Amino-

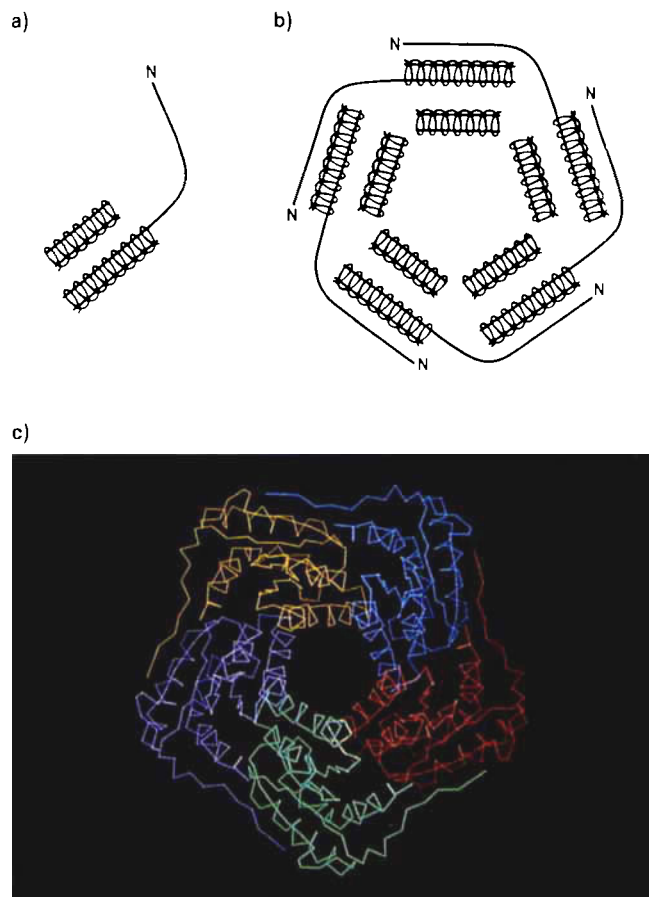


Abb. 8. Faltung einer β -Untereinheit der schweren Riboflavin-Synthase (a). Sie besteht aus vier Strängen eines zentralen β -Faltblatts, das beidseitig von α -Helices flankiert ist. Nur das obere Paar der α -Helices ist sichtbar. Der N-terminale Teil weist nach außen, ist aber Teil des β -Faltblatts der benachbarten Untereinheit im Pentamer (b). c) Die beobachteten C^α -Positionen im Pentamer; die fünf Untereinheiten sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet [61, 62].

säureresten ist von der Untereinheit weg orientiert und haftet als äußerster fünfter Strang am β -Faltblatt einer benachbarten Untereinheit im Pentamer. Die Anordnung ist cyclisch (Abb. 8). Obgleich die Struktur der isolierten Untereinheit unbekannt ist, ist es wahrscheinlich, daß das *N*-terminale Segment flexibel ist, da seine Konformation nicht durch sekundäre Wechselwirkungen stabilisiert wird. Der Zusammenbau der Untereinheiten im Pentamer steht wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit der Neuordnung und Stabilisierung des *N*-terminalen Polypeptidstrangs.

6. Starrheit

Ich schließe nun die Diskussion über die Proteine als anpassungsfähige, flexible Gebilde ab und kehre zum Aspekt der Proteine als starre Körper zurück. Wir haben möglicherweise aus den Augen verloren, daß Proteine ein Gerüst bilden, um Liganden, prosthetische Gruppen und Chromophore zu binden. Diese Funktionen benötigen eine genaue geometrische Anordnung der wechselwirkenden Gruppen, die in jedem der Systeme, die bisher unter dem Aspekt der Beweglichkeit präsentiert wurden, zu finden sind, da wohldefinierte komplementäre Oberflächen eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit Liganden oder Makromolekülen spielen. Diese Oberflächen benötigen aber auch eine gewisse Beweglichkeit, um sich an Desolvatation und Veränderungen der Umgebung anpassen zu können. Es gibt jedoch eine Klasse von Proteinen, bei denen die Starrheit dominiert, da Beweglichkeit zu Nebenreaktionen führen würde – es sind Protein-Pigment-Komplexe, die bei der Übertragung von Lichtenergie und Elektronen in der Photosynthese eine Rolle spielen. Ihre Substrate und Produkte sind masselos oder sehr klein (Photonen bzw. Elektronen), und die Reaktionen sind intramolekular. Ich habe daher zwei Beispiele aus dem Bereich der Photosynthese gewählt, um die funktionelle Signifikanz der Starrheit in Proteinen hervorzuheben.

Lichtsammlung und Lichtenergietransfer in den peripheren Lichtsammelkomplexen (Phycobilisomen) von Cyanobakterien ist an die exakte dreidimensionale Anordnung von Chromophoren gebunden^[63,64]. Die Chromophore sind offenkettige Tetrapyrrolsysteme (Biline). Die Anregungsenergie des Lichts wird in die photosynthetische Membran geleitet und dort von den Reaktionszentren in einen Elektronenfluß durch die Membran umgewandelt. Die Energie wird innerhalb der Lichtsammelkomplexe durch induzierte Resonanz sehr schnell mit minimalem Energieverlust und einer Quantenausbeute nahe Eins übertragen. Die elektromagnetische Kopplung der Chromophore und die Geschwindigkeit des Energietransfers werden vom Abstand und von der Orientierung der Chromophore bestimmt. Bewegung würde die Kopplung stören, den Energietransfer verlangsamen und zu einem Verlust von Anregungsenergie durch Fluoreszenz führen. In den intakten Komplexen ist daher erwartungsgemäß die Energietransferzeit um mehrere Größenordnungen kürzer als die intrinsische Fluoreszenzlebensdauer. Ein weiterer Mechanismus der Desaktivierung wäre die photochemische Umwandlung der angeregten Chromophore. Die offenkettigen Tetrapyrrolsysteme isomerisieren photochemisch als Pigmente von Phytochrom, dem Photorezeptor der Pflanzen. In den Phycobilisomkomponenten dagegen sind die Pigmente starr durch Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen mit geladenen Gruppen des Proteins gebunden (Abb. 9). Diese Kräfte sind gerichtet und wirken Bewegungen, die zur Isomerisierung führen, entgegen^[65–67].

Ähnliche Überlegungen treffen auf die sehr schnellen Elektronenübertragungsschritte im Reaktionszentrum zu, in dem die vom Lichtsammelsystem transferierte Anregungsenergie Elektronen vom primären Donor zum primären Acceptor treibt^[68]. Detaillierte Strukturdaten sind für das Reaktionszentrum eines Purpurbakteriums, *Rhodospseudomonas viridis*, vorhanden^[69,70]. Ein spezielles Paar von Bacteriochlorophyll-Chromophoren wird durch Lichtenergie angeregt und gibt ein Elektron ab, das an einen primären Elektronenacceptor, ein Chinon, über eine Kette

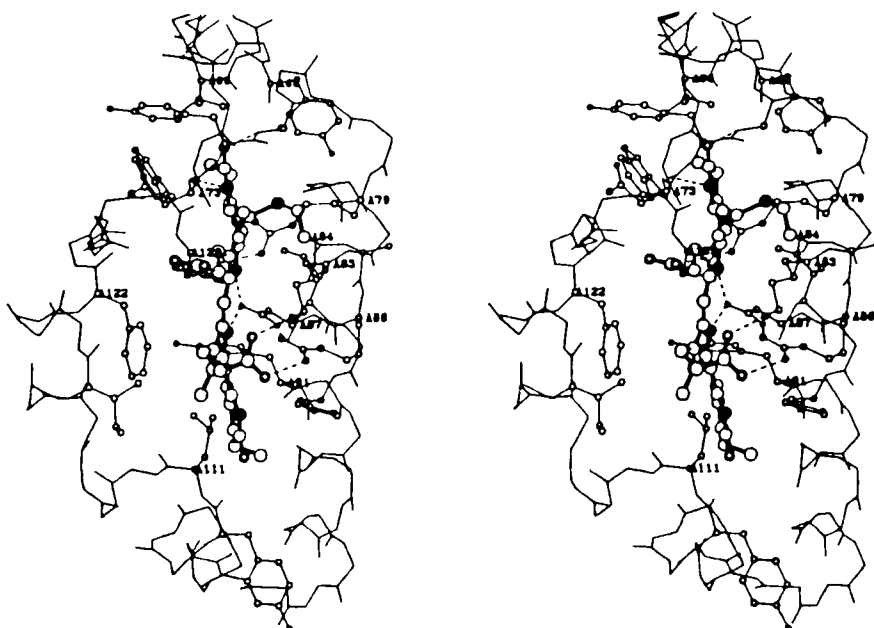


Abb. 9. Stereozeichnung des Dihydrobiliverdin-Chromophors A84 und seines Umfelds in C-Phycocyanin. Polare und ionische Wechselwirkungen von AspA87 mit den zentralen Pyrrolstickstoffatomen und von ArgA79, LysA83 und ArgA86 mit den Propionsäureseitenketten vernetzen den Chromophor mit der Proteinmatrix [65–67].

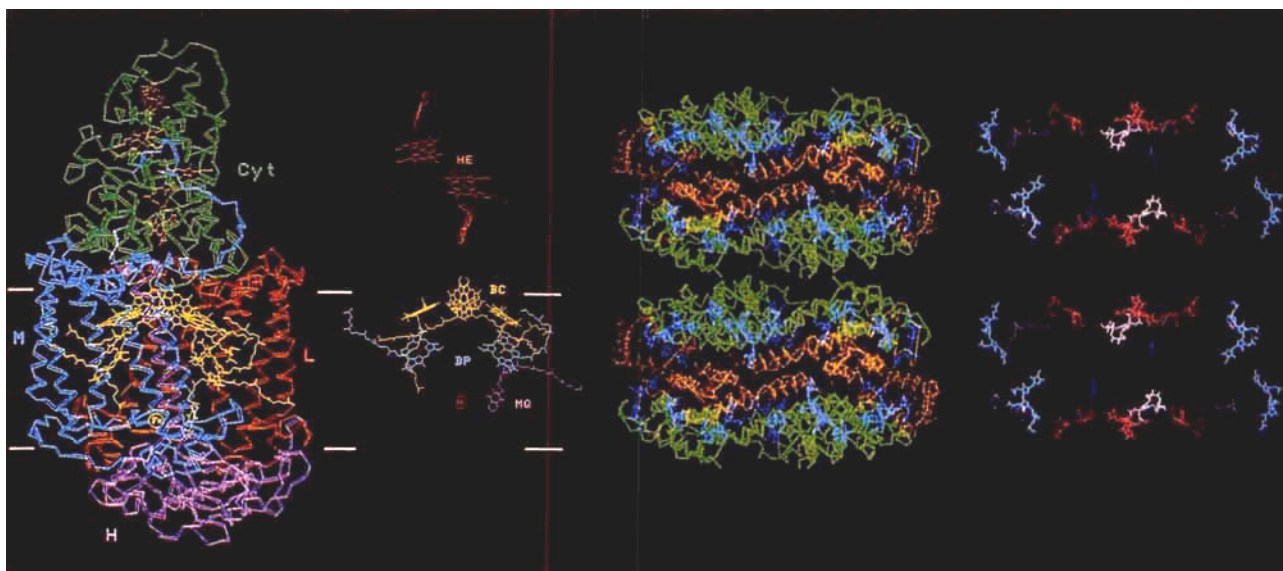


Abb. 10. a) C α -Kette und Bandzeichnung des Protein-Pigment-Komplexes des Reaktionszentrums. Die vier Proteinkomponenten sind verschiedenfarbig markiert: grün = Cytochrom Cyt, blau = M-Untereinheit; braun = L-Untereinheit; violett = H-Untereinheit; gelb = Pigmente. b) Die isolierten Pigmente aus a), deren Chromophore farblich unterschieden sind: braun = Haemgruppen HE; gelb = spezielles Bacteriochlorophyll(BC)-Paar; gelb = Extra-Bacteriochlorophyll; blau = Bacteriopheophytin BP; violett = Menachinon-9 MQ; rot = Fe. Die Position der photosynthetischen Membran ist markiert [69, 70]. c, d) Zum Größenvergleich seien zwei übereinandergelagerte Hexamere des C-Phycocyanins und die assoziierten Tetrapyrrolpigmente gezeigt. Dieses Aggregat ähnelt einer Antenne der Phycobilisom-Organelle. Die Untereinheiten und Chromophore sind farblich markiert: Braun = α -Untereinheiten; grün = β -Untereinheiten; blau und violett = Pigmente.

von Bacteriochlorophyll- und Bacteriopheophytin-Pigmenten weitergeleitet wird. Wie in den Lichtsammelsystemen ist die Quantenausbeute dieses Prozesses nahe Eins. Prozesse wie die Desaktivierung durch Fluoreszenzemission finden kaum statt, weil der Elektronentransfer um mehrere Größenordnungen schneller ist. Dies ist auf eine wirkungsvolle elektronische Kopplung der Leitungselemente zurückzuführen. Um diese Kopplung zu sichern, müssen die Chromophore exakt von der Proteinmatrix gebunden werden. Eine photochemische Isomerisierung als Mechanismus der Desaktivierung ist in cyclischen Bacteriochlorophyll-Systemen anders als in den Tetrapyrrolysystemen der Lichtsammelkomplexe unwahrscheinlich. Der Elektronentransfer könnte aber verzögert werden durch die Anziehungskraft eines sich bewegenden Elektrons auf Ionen oder dipolare bewegliche Moleküle, insbesondere Wasser. Die schnellen Elektronentransferschritte laufen tatsächlich weit entfernt von Wasser über Elektronenleiter ab, die in einer hydrophoben Proteinmatrix eingebettet sind, die ihrerseits in eine Membran integriert ist (Abb. 10). Die Aktivierungsenergien der schnellen Elektronentransferprozesse sind sehr niedrig; die Prozesse werden bei tiefen Temperaturen sogar schneller, was ein experimenteller Hinweis darauf ist, daß Atombewegungen keine Rolle spielen.

Zum cyclischen Elektronentransfer der Photosynthese gehört eine Anzahl weiterer Schritte, die in diesem Beitrag nicht berücksichtigt wurden. – Sie benötigen eine Reorientierung von Atomgruppen und Diffusion und weisen daher eine Aktivierungsenergie auf.

7. Schlußbemerkungen

Ich habe versucht, in diesem Aufsatz einige Aspekte der Starrheit und Beweglichkeit von Proteinen an ausgewähl-

ten Proteinsystemen zu zeigen, um den Dualismus der Proteine als passive, starre Matrices und aktive, bewegliche Reaktanten bei chemischen Reaktionen zu demonstrieren. Die Arten der Flexibilität sind so verschieden und komplex wie die chemischen Reaktionen selbst. Es lag nicht in meiner Absicht, die ausgewählten Systeme in Einzelheiten zu beschreiben, und der interessierte Leser sei auf die jeweils zentrierten Originalpublikationen zur weiteren Information hingewiesen.

Dr. W. S. Bennett hat wertvolle Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts in Form und Inhalt gemacht. R. Sergeon hat wesentlich zur Textgestaltung und Übersetzung beigetragen.

Eingegangen am 28. Juli 1987 [A 651]

- [1] S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181.
- [2] M. Karplus, J. A. McCammon, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 9 (1981) 293.
- [3] M. Levitt, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 11 (1982) 251.
- [4] W. L. Peticolas, *Methods Enzymol.* 61 (1979) 425.
- [5] A. Cooper, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 44 (1984) 181.
- [6] W. S. Bennett, R. Huber, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 15 (1984) 291.
- [7] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 75.
- [8] K. Wüthrich, G. Wagner, *Trends Biochem. Sci.* 9 (1984) 152.
- [9] A. Wlodawer, J. Walter, R. Huber, L. Sjölin, *J. Mol. Biol.* 180 (1984) 301.
- [10] R. Hetzel, K. Wüthrich, J. Deisenhofer, R. Huber, *Biophys. Struct. Mech.* 2 (1976) 159.
- [11] A. Wlodawer, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 145.
- [12] W. Bode, P. Schwager, R. Huber in D. W. Ribbons, K. Brew (Hrsg.): *Proteolysis and Physiological Regulation, Miami Winter Symposia*. Academic Press, New York 1976, S. 43.
- [13] M. Bolognesi, G. Gatti, E. Menegatti, M. Guarneri, M. Marquart, E. Papamokos, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 162 (1982) 839.
- [14] E. Papamokos, E. Weber, W. Bode, R. Huber, M. W. Empie, I. Kato, M. Laskowski, Jr., *J. Mol. Biol.* 158 (1982) 515.
- [15] W. Bode, E. Papamokos, D. Musil, U. Seemüller, H. Fritz, *EMBO J.* 5 (1986) 813.
- [16] R. J. Read, M. N. G. James in A. J. Barrett, J. Salvesen (Hrsg.): *Proteinase Inhibitors*. Elsevier, Amsterdam 1986, S. 301.
- [17] D. Musil, *Dissertation*, Technische Universität München 1987.
- [18] M. Laskowski, Jr., I. Kato, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 593.
- [19] H. Loebermann, R. Tokunaka, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 177 (1984) 531.
- [20] R. Carrell, *Nature (London)* 312 (1984) 14.

- [21] S. C. Bock, K. Skriver, E. Nielsen, H.-C. Thøgersen, B. Wiman, V. H. Donaldson, R. L. Eddy, J. Marrinan, E. Radziejewska, R. Huber, T. B. Shows, S. Magnusson, *Biochemistry* 25 (1986) 4292.
- [22] L. Sottrup-Jensen, H. F. Hansen, S. B. Mortensen, T. E. Peterssen, S. Magnusson, *FEBS Lett.* 123 (1981) 145.
- [23] H. Neurath, E. Davie, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 515.
- [24] P. Desnuelle, C. Fabre, *Biochem. Biophys. Acta* 18 (1955) 49.
- [25] R. Huber, W. Bode, *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 114.
- [26] B. W. Dijkstra, G. J. H. van Nes, K. H. Kalk, N. P. Brandenburg, W. G. J. Hol, J. Drenth, *Acta Crystallogr. Sect. B* 38 (1982) 793.
- [27] J. Deisenhofer, *Biochemistry* 20 (1981) 2361.
- [28] G. Stubbs, S. Warren, K. C. Holmes, *Nature (London)* 267 (1977) 216.
- [29] a) J. N. Champness, A. C. Bloomer, G. Bricogne, P. J. G. Butler, A. Klug, *Nature (London)* 259 (1976) 20; b) A. C. Bloomer, J. N. Champness, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *ibid.* 276 (1978) 362.
- [30] S. C. Harrison, *Adv. Virus Res.* 28 (1983) 175.
- [31] J. Walter, W. Steigemann, T. P. Singh, H. Bartunik, W. Bode, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. B* 38 (1982) 1462.
- [32] D. Wang, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 185 (1985) 595.
- [33] J. Kraut in R. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 3, 3. Aufl., Academic Press, New York 1971, S. 165–183.
- [34] H. T. Wright, *J. Mol. Biol.* 79 (1973) 13.
- [35] A. Brünger, R. Huber, M. Karplus, *Biochemistry* 26 (1987) 5153.
- [36] Übersicht: A. Lerf, T. Butz, *Angew. Chem.* 99 (1987) 113; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 110.
- [37] T. Butz, A. Lerf, R. Huber, *Phys. Rev. Lett.* 48 (1982) 890; *Hyperfine Interact.* 15/16 (1983) 869.
- [38] W. Bialek, M. F. Goldstein, *Biophys. J.* 48 (1985) 1027.
- [39] M. E. Noelken, C. A. Nelsen, C. E. Buckley, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 218.
- [40] J. Yugerabide, H. G. Epstein, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 51 (1970) 573.
- [41] V. N. Schumaker, G. W. Seegan, C. A. Smith, S. K. Ma, J. D. Rodwell, M. F. Schumaker, *Mol. Immunol.* 17 (1980) 413.
- [42] R. C. Valentine, N. M. Green, *J. Mol. Biol.* 27 (1967) 615.
- [43] R. Huber, *Behring Inst. Mitt.* 76 (1984) 1.
- [44] a) M. Marquart, J. Deisenhofer, R. Huber, W. Palm, *J. Mol. Biol.* 141 (1980) 369; b) M. L. Morgan, W. O. Weigle, *Adv. Immunol.* 40 (1987) 61.
- [45] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature (London)* 264 (1976) 415.
- [46] P. M. Colman, W. G. Laver, J. N. Varghese, A. J. Baker, P. A. Tulloch, G. M. Air, R. G. Webster, *Nature (London)* 326 (1987) 358.
- [47] J. Deisenhofer, T. A. Jones, R. Huber, J. Sjö Dahl, J. Sjöquist, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 975.
- [48] D. W. Speicher, J. S. Morrow, W. J. Knowles, V. T. Marchesi, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9093.
- [49] J. Engel, E. Odermatt, A. Engel, J. A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, R. Timpl, *J. Mol. Biol.* 150 (1981) 97.
- [50] S. Remington, G. Wiegand, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 158 (1982) 111.
- [51] G. Wiegand, S. Remington, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 174 (1984) 205.
- [52] G. Wiegand, S. Remington, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 (1986) 97.
- [53] G. C. Ford, G. Eichele, J. N. Jansonius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2559.
- [54] A. Arnone, P. D. Briley, P. H. Rogers, C. C. Hyde, C. M. Metzler, D. M. Metzler in J. F. Griffin, W. L. Duax (Hrsg.): *Molecular Structure and Biological Activity*, Elsevier, New York 1982, S. 57.
- [55] H. Eklund, J. P. Samana, L. Wallen, C. I. Bränden, Å. Åkeson, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* 146 (1981) 561.
- [56] W. S. Bennett, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* 140 (1980) 211.
- [57] U. Egner, A. G. Tomasselli, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 649.
- [58] M. A. Saper, F. A. Quijcho, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11057.
- [59] A. G. W. Leslie, A. S. Wonnacott, *J. Mol. Biol.* 178 (1984) 743.
- [60] L. Liljas, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 48 (1986) 1.
- [61] R. Ladenstein, B. Meyer, R. Huber, H. Labischinski, K. Bartels, H.-D. Bartunik, L. Bachmann, H. C. Ludwig, A. Bacher, *J. Mol. Biol.* 187 (1986) 87.
- [62] R. Ladenstein, A. Bacher, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 751.
- [63] H. Zuber, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 414.
- [64] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 (1985) 47.
- [65] T. Schirmer, W. Bode, W. Sidler, R. Huber, H. Zuber, *J. Mol. Biol.* 184 (1985) 257.
- [66] T. Schirmer, R. Huber, M. Schneider, W. Bode, M. Miller, M. L. Hackert, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 651.
- [67] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 677.
- [68] Übersichten: a) J. Deisenhofer, H. Michel, R. Huber, *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985) 243, zit. Lit.; b) J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 34 (1986) 416, zit. Lit.
- [69] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *J. Mol. Biol.* 180 (1984) 385.
- [70] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature (London)* 318 (1985) 618.
- [71] H. J. Nolte, E. Neumann, *Biophys. Chem.* 10 (1979) 253.