

Die Evolution von Primärstrukturen*

Von PIERRE JOLLÈS

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 96, boulevard Raspail, Paris 6^e

Neben Stoffwechsel und Reproduktion, d.h. Vermehrung mit Vererbung, gehört Erbwandel durch Mutationen zu den für das Leben charakteristischen Vorgängen. Mutation erzeugt im Zusammenwirken mit der Selektion durch die Umwelt die stammesgeschichtliche *Evolution*: sie ist ihr Motor. Vererbung, d.h. Wiederkehr elterlicher Eigenarten bei den Nachkommen als das konservative Prinzip des Lebens, wird letztlich dadurch bewirkt, daß der Träger der Erbinformation in der Zelle, die Desoxyribonukleinsäure (DNS), durch Replikation vermehrt wird und die DNS-Kopien an die Nachkommen weitergegeben werden¹.

Die Mutation als progressives, Neues schöpfendes Prinzip besteht in der Änderung dieser Erbinformation. Während bei der Reproduktion exakte Replikation der DNS und somit Vererbung die Regel ist, stellen die Mutationen seltene «Ausnahmen» dar. Die Chance, daß ein Gen bei der Replikation mutiert, ist normalerweise sehr klein (10^{-5} bis 10^{-9} pro Verdoppelung). Diese Kleinheit der natürlichen «spontanen» Mutationsraten ist sinnvoll; durch sie wird trotz möglicher Veränderlichkeit die Lebensfähigkeit auf dem erreichten, bewährten Niveau gehalten. Eine gewisse Mutabilität ist aber notwendig, um die Fähigkeit der Art zur Anpassung an neue Umstände zu garantieren und die Evolution voranzutreiben¹.

Evolution und Proteine

Bis vor kurzem betrachtete man Evolution meistens anatomisch-morphologisch; die wichtigste Quelle hierfür waren der Vergleich von Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten lebender Organismen. Das ist die Betrachtung als Makroevolution, die sich aus zahlreichen kleinen Evolutionsschritten ergibt. Morphologische Differenzen sind notwendigerweise die Folge von Differenzen auf molekularer Basis, also von Veränderungen, von Mutationen, auf dem Niveau der Nukleinsäuren².

Jeder heute auf der Erde lebende Organismus trägt eine detaillierte Aufzeichnung seines genetischen Vorlebens in sich, und zwar seit Beginn des Lebens auf der

Erde. Diese Aufzeichnung ist in verschlüsselter Form im genetischen Material der DNS enthalten. Man könnte also die Evolution durch die genaue Analyse der DNS von verschiedenen Spezies untersuchen². Dies wird in Zukunft möglich sein, doch heute sind die Methoden dazu noch nicht weit genug entwickelt. Um die Evolution auf molekularer Basis, also die Mikroevolution, zu untersuchen, wendete man sich deshalb den direkten Produkten der Gene, den Proteinen, zu. Viele Punkte der phylogenetischen Geschichte, der Evolution alles Lebenden, konnten dank der Proteine aufgeklärt werden. Die Spezifität eines Proteinmoleküls, seine biologische Funktion, ist bedingt durch die Zahl der Aminosäuren im Proteinmolekül und ihre Aufeinanderfolge, die Aminosäuresequenz oder Primärstruktur.

Gleichartigkeit der chemischen Vorgänge bei allen Organismen

Mit der Zeit wurde es klar, daß die chemischen Vorgänge, die zur Erhaltung des Lebens dienen, bei allen Organismen eine erstaunliche Gleichartigkeit zeigen. Alle Zellen benützen Polyphosphate für Energie benötigende Biosynthesen. Alle Zellen synthetisieren und speichern gleichartige Substanzen, wie Fette, Zucker oder Proteine. An vielen metabolischen Reaktionen und anderen Elementarvorgängen sind zahllose Enzyme mit ihren Coenzymen beteiligt. Die Biosynthese aller Proteine erfolgt durch einen Code, und alle Untersuchungen weisen darauf hin, daß der Code universell ist. Die Natur bedient sich bei den biochemischen Reaktionen in den Zellen auch nur einer beschränkten Anzahl niedermolekularer Substanzen als Wirkstoffe, die bei allen Lebewesen immer wieder dieselben sind (Nicotinamid, Pyridoxal, Glutathion, Flavinoide, Carotene, Hämgruppen, Eisen-sulfid).

Daß so viele Koinzidenzen ganz unabhängig in so verschiedenen Organismen zufällig entstanden sein sollten, ist nicht glaubhaft. Ferner scheint es ganz unwahrscheinlich, daß durch Zufall zwei ganz unabhängige Organismen, wie das Rind und die Erbse, dasselbe Histon entwickelt haben³. Das Phänomen der Evolution ist durch diese biochemischen Aspekte weitaus besser illustriert als durch bloße morphologische oder embryologische Diskussionen. Hier möchte ich ein Wort des Schweizer

* Vortrag, gehalten am Symposium über Biopolymere, veranstaltet vom Schweizerischen Chemiker-Verband am 26. August 1970 in Bern.

¹ R. W. KAPLAN, in *Molekularbiologie* (T. WIELAND und G. PFLEIDERER, ed.), 3. Auflage, Umschau-Verlag, Frankfurt am Main 1969, S. 73.

² H. SUND, *Evolution und Struktur der Proteine*, Universitätsverlag Konstanz 1968, S. 20-1.

³ R. J. DELANCE, D. M. FARNBROUGH, E. L. SMITH und J. BONNER, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 5906.

Dichters RAMUZ zitieren: «Ce qu'il y a de beau dans la vie, et dans toute espèce de vie, c'est sa continuité.»

Strukturstudien: die klassische Methode und die Zukunftsmethoden

Nach heutigen Begriffen stellen Substanzen von der Art der Coenzyme relativ einfach gebaute Moleküle dar. Erst mit dem Fortschritt der Analysetechnik konnte der Vergleich komplizierterer Wirkstoffe aus verschiedenen tierischen Ursprungsmaterialien unternommen werden. Besonders aufschlußreich und interessant sind vergleichende Untersuchungen, nicht nur der Aminosäurezusammensetzung, sondern auch der Aminosäurereihenfolge bei analogen Proteinen aus verschiedenen Arten der Lebewesen (homologe Proteine)⁴.

Die vollständige Bestimmung der Primärstruktur eines Proteins ist heute noch eine schwierige und zeitraubende Arbeit.

Die klassische – bisher meist benützte – und von uns selbst oft erprobte Methode (Beispiel:^{5, 6}), ist in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I. Klassische Strategie betreffend die Aufklärung von Proteinstrukturen

10 Etappen:

1. Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung
2. Bestimmung des Molekulargewichtes
3. Qualitative und quantitative Bestimmung der N-terminalen Aminosäure (n) und Sequenz (en)
4. Qualitative und quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäure (n) und Sequenz (en)
5. Trennung der Ketten, wenn mehrere vorhanden
6. Spezifische Spaltung jeder Kette in kleinere Peptide (Fragmente), meistens dank der Einwirkung von Trypsin
7. Trennung und Reinigung der Fragmente
8. Bestimmung der Struktur der Fragmente
9. Wiedervereinigung der Fragmente (meistens tryptische Peptide) dank dem Studium von «Brückenpeptiden», die durch Spaltung mit Enzymen (Chymotrypsin) oder Chemikalien (BrCN) erhalten wurden
10. Bestimmung der Lage der Disulfidbrücken

In den letzten Jahren sind drei weitere Methoden für Strukturbestimmungen beschrieben worden, die in Zukunft erlauben sollten, die Strukturen *direkt* an einem Protein zu bestimmen.

Mit Hilfe der *Röntgenstrukturanalyse* konnten PERUTZ⁷ und KENDREW⁸ die Raumstruktur von Hämoglobin und Myoglobin aufklären. Später gelang PHILLIPS⁹ dasselbe mit dem Hühneriweiβlysozym, womit zum erstenmal

die Raumstruktur eines Enzyms bestimmt war. Für solche Arbeiten mußte jedoch bis dahin die Primärstruktur bekannt sein. Dank neueren Forschungen erscheint es durchaus möglich, daß in Zukunft der größte Teil einer Struktur direkt durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden kann.

Die zweite Zukunftsmethode besteht aus einer vollständigen *Automatisierung des Edmanschen Abbaues*¹⁰. Der Apparat, der diese Reaktionsfolge automatisch durchzuführen erlaubt, heißt Sequenator¹¹.

Die *Massenspektrometrie* stellt die dritte Zukunftsmethode dar; doch bis heute konnten noch keine Proteine, sondern bloß Peptide mit ihr bearbeitet werden¹².

Phylogenetische Studien

Die Evolution in Biologie und Biochemie ist sehr konservativ. Wir werden dies an Hand einiger Beispiele von Proteinstrukturen illustrieren. Nicht alle Proteine eignen sich jedoch in gleicher Weise für phylogenetische Studien.

Mutationen

Mutationen bestehen (meist) in Änderungen am informativsten Basenmuster des DNS. Kleinstmögliche Änderungen betreffen nur ein einziges Basenpaar. Solche Punktmutationen können den Sinn eines Codons ändern, wodurch in der mutierten Zelle und ihren Nachkommen (Mutanten genannt) in dem vom betroffenen Gen determinierten Protein an der entsprechenden Stelle eine andere Aminosäure eingebaut wird¹. Als Beispiel soll hier das N-terminale Ende der β -Polypeptidkette von normalem Hämoglobin und Sichelzellanämie mit den dazugehörigen Codons des für die Biosynthese zuständigen Struktur-Gens verglichen werden. Die molekulare Basis der Sichelzellanämie ist einzig und allein darin zu sehen, daß das Gen, das für die Synthese der β -Untereinheit des Hämoglobins zuständig ist, einer einzigen Basenveränderung, einer Punktmutation, unterworfen wurde. Sämtliche klinischen Manifestationen, die wir beobachteten, sind allein auf diesen Unterschied bei der 6. Aminosäure zurückzuführen¹³ (Abb. 1).

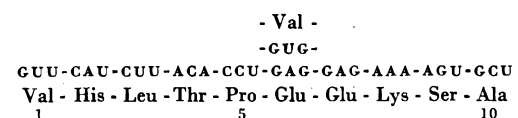


Abb. 1. N-terminales Ende (1–10) der β -Polypeptidkette von normalem Hämoglobin (Rest Nr. 6 = Glu) und Sichelzellanämie (Rest Nr. 6 = Val) mit den dazugehörigen Codons

⁴ TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, in *Molekularbiologie* (T. WIELAND und G. PFLEIDERER, ed.), 3. Auflage, Umschau-Verlag, Frankfurt am Main 1969, S. 145–8.

⁵ J. JOLLÈS, J. JAUREGUI-ADELL, I. BERNIER und P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 78 (1963) 668.

⁶ J. JOLLÈS und P. JOLLÈS, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 2671.

⁷ M. F. PERUTZ, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 646.

⁸ J. C. KENDREW, in *Enzyme Models and Enzyme Structure*, Brookhaven National Laboratory, Upton (N. Y.) 1962.

⁹ D. C. PHILLIPS, *Amer. Scientist* 215 (1966) 78.

¹⁰ P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 283.

¹¹ P. EDMAN und G. BEGG, *Europ. J. Biochem.* 1 (1967) 80.

¹² G. E. VAN LEAR und F. W. MCLAFFERTY, *Amer. Rev. Biochem.* 38 (1969) 303.

¹³ E. ZUCKERKANDL und L. PAULING, *Molecular Disease, Evolution and Genic Heterogeneity*, in *Horizons in Biochemistry* (M. KASHA und B. PULLMAN, ed.), Academic Press, New York 1962, S. 189.

Neben den Punktmutationen gibt es auch «Nonsense»-Mutationen, Segment- oder Chromosomenmutationen.

Als spontan oder natürlich bezeichnen wir die Mutationen, die ohne Eingriff des Menschen geschehen, z. B. durch ionisierende Strahlen, durch Stoffwechselprodukte, durch Enzyme, usw. Sie vor allem sind diejenigen, welche die natürliche Evolution vorantreiben. Eine Aminosäuresubstitution, wie soeben beschrieben, bezeichnet man daher auch als Evolutionseinheit¹.

Mutationen sind vielleicht weniger selten, als es scheint, aber viele Änderungen waren höchstwahrscheinlich letal, und solche Mutanten können eben heute nicht mehr gefunden werden.

In der Evolutionsgeschichte von Proteinen ein und derselben Familie sei noch auf zwei weitere seltene Vorgänge hingewiesen: auf die Insertion und die Deletion von Aminosäuren.

Mutationsgeschwindigkeiten

Man hat aufgrund der Ergebnisse, die man mit den traditionellen Methoden der Paläontologie erhalten hatte, und aufgrund der Aminosäuredifferenzen zu berechnen versucht, wann sich die verschiedenen Arten aus einer gemeinsamen Vorstufe unabhängig voneinander weiterentwickeln begannen. Man konnte auch dank der Aufklärung der Struktur verschiedener Proteine ein und derselben Familie errechnen, wie viele Jahre bei dieser Familie vergehen müssen, um einen Aminosäureaustausch, also eine Mutation, wirksam werden zu lassen. Die Mutationsgeschwindigkeiten werden ausgedrückt durch «angenommene Punktmutationen per 100 Aminosäurereste und per 100 Millionen Jahre». Tabelle II¹⁴

Tabelle II. Mutationsgeschwindigkeiten einiger Proteine¹⁴

Proteine	Angenommene Punktmutationen per 100 Aminosäurereste und 100 Millionen Jahren
Fibrinopeptides	90
Growth hormones	60
Immunoglobulins	34
Kappa C region	40
Kappa V region	34
Heavy C region	28
Ribonucleases	30
Hemoglobins	12
Beta	13
Alpha	11
Myoglobins	9
Gastrins	9
Adenohypophysial hormones	9
Encephalitogenic proteins	7
Insulins	4
Cytochromes c	3
Glyceraldehyde 3-PO ₄ dehydrogenases	2
Histones	0,06

¹⁴ M. O. DAYHOFF, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, The National Biomedical Foundation, Silver Spring (Md., USA) 1969.

zeigt, daß die Evolutionsgeschwindigkeit der verschiedenen Proteinfamilien sehr ungleich ist, was an Hand einiger Beispiele näher diskutiert werden soll. Ich möchte jedoch noch darauf hinweisen, daß die Zahlen der Tabelle II nur eine Größenordnung darstellen; bei ihrer Berechnung wird vorausgesetzt, daß sich die Evolution auch wirklich «evolutionär» und nicht «revolutionär» entwickelt hat, d. h. von Naturkatastrophen verschont geblieben ist. Letztere könnten natürlich eine sehr viel höhere Mutationsrate zur Folge haben, und die berechneten Zeiträume würden dann um vieles kürzer sein².

Besonders konservative Strukturen

Proteine, die sich sehr langsam ändern, sind nur von geringem Wert für phylogenetische Studien. Aber um ein komplettes Bild der Evolutionsgeschwindigkeiten zu geben, muß deren Existenz doch erwähnt werden. In den 1,5 Milliarden Jahren seit der Divergenz der Linien, die zu Rind und Erbse führten, sind nur 2 Änderungen auf 102 Aminosäureresten in den Histonen entstanden³.

Schneller mutierende Proteine

Hier ist an erster Stelle das Hämoglobin zu nennen^{15, 16}. Jedes Jahr werden weitere anomale Hämoglobine gefunden und charakterisiert: in 1969 waren es 30. Das Hämoglobin des erwachsenen Menschen (Hb A) ist aus vier Polypeptidketten, zwei α -Ketten und zwei von diesen verschiedenen β -Ketten, zusammengesetzt. Daneben findet sich eine kleine Menge Hämoglobin A₂, das sich in den β -Ketten (hier δ genannt) vom normalen Hämoglobin unterscheidet. Vor der Geburt ist das Protein des menschlichen Blutfarbstoffs anders als danach: das fötale Hämoglobin besteht aus denselben α -Ketten, aber zwei γ -Ketten stehen an Stelle der β -Ketten.

Die α -, β -, γ - und δ -Ketten sind strukturell so nahe miteinander verwandt, daß es naheliegt, anzunehmen, daß die Cistrons, die für ihre Synthese verantwortlich sind, von einem gemeinsamen Genvorläufer abstammen, der sich mehrfach verdoppelt hat. Dies gilt auch für das rote Porphyrin-tragende Myoglobin. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, daß die Faltung der Polypeptidketten von Wal-Myoglobin und Hämoglobin identisch ist⁸. Um zu dem hohen Grad an Übereinstimmung zu kommen, muß man an einigen Stellen der α -Kette Lücken lassen, die infolge von Genmutationen entstanden sein können⁴ (Abb. 2).

Die am schnellsten mutierenden Sequenzen sind die der Fibrinopeptide, die N-terminalen Aktivationspeptide des Fibrinogens, die nach Einwirkung von Thrombin entstehen. Man konnte Differenzen sogar bei äußerst naheliegenden Spezies wie Hund und Fuchs feststellen¹⁷.

¹⁵ G. BRAUNITZER, K. HILSE, V. RUDLOFF und N. HILSCHMANN, *Advances Prot. Chem.* 19 (1964) 1.

¹⁶ E. ZUCKERKANDL, *Amer. Scientist* 212 (1965) 110.

¹⁷ B. BLOMBACK, M. BLOMBACK, A. HENSCHEN, B. HESSEL, S. IWANAGA und K. R. WOODS, *Nature* 218 (1968) 130.

Tabelle III. Aminosäuredifferenzen zwischen den Cytochromen c verschiedenen Ursprungs²⁰

Spezies	Vergleich	Variante Aminosäure-restezahl	Divergenzen der Linien in Millionen von Jahren
Huhn	Kaninchen	8	280 (angenommen)
	Schwein, Schaf, Rind	9	
	Hund	10	
	Pferd	11	
	Känguruh	12	
	Affe	12	
	Mensch	13	
Thunfisch	Kaninchen	17	490 (berechnet)
	Schwein, Rind, Schaf	17	
	Hund	18	
	Pferd	19	
	Känguruh	20	
	Affe	21	
	Mensch	21	
Motte	Kaninchen	26	750 (berechnet)
	Hund	26	
	Schwein, Rind, Schaf	27	
	Känguruh	29	
	Pferd	29	
	Affe	30	
	Mensch	31	
Hefe	Kaninchen	44	1180 (berechnet)
	Schwein, Rind, Schaf	44	
	Hund	44	
	Affe	44	
	Mensch	44	
	Pferd	45	
	Känguruh	45	
Huhn	46		
Thunfisch	48		
Motte	48		

wurden von MARGOLIASH und SCHEJTER²⁰ Tabellen aufgestellt mit den Differenzen der Cytochromstruktur bei Spezies verschiedener zoologischer Klassen. So wurden Berechnungen angestellt, um den Zeitpunkt festzulegen, von dem an sich die verschiedenen Arten aus einer gemeinsamen Vorstufe unabhängig voneinander weiterentwickelt haben (Tabelle III).

Es sei noch bemerkt, daß Cytochrome aus Hefe und *Neurospora crassa* um 39 Aminosäuren differieren, obwohl diese beiden Einzeller nahe verwandt scheinen. Die Cytochrome von Vertebraten und Invertebraten unterscheiden sich etwa um die gleiche Anzahl Aminosäuren vom Hefe-Cytochrom. Es scheint denkbar, daß der Verlauf der evolutionären Differenzierung innerhalb der Mikroorganismen sehr viel rascher verlief als bei Tieren und höheren Pflanzen.

Dank den Strukturstudien konnte ein phylogenetischer Baum aufgestellt werden (Abb. 5).

Ich möchte nochmals darauf hinweisen, daß die verschiedenen Abbildungen nur mit einer Evolution vereinbar sind, die evolutionär und nicht revolutionär verlief und die eine Reihenfolge von Artverzweigungen, nicht aber eine gleichzeitige Bildung aller Arten umfaßt.

Die Lysozyme und die Evolution eines aktiven Zentrums

Nun möchte ich auf eine Proteinfamilie zu sprechen kommen, die mir besonders nahe liegt: die Lysozyme; wir werden hier die Gelegenheit haben, von der Evolution eines aktiven Zentrums zu sprechen.

Lysozyme (EC 3.2.1.17) sind weitverbreitete Enzyme, die nicht nur in Vogeleiweißen vorkommen, sondern auch in vielen menschlichen Geweben und Ausscheidun-

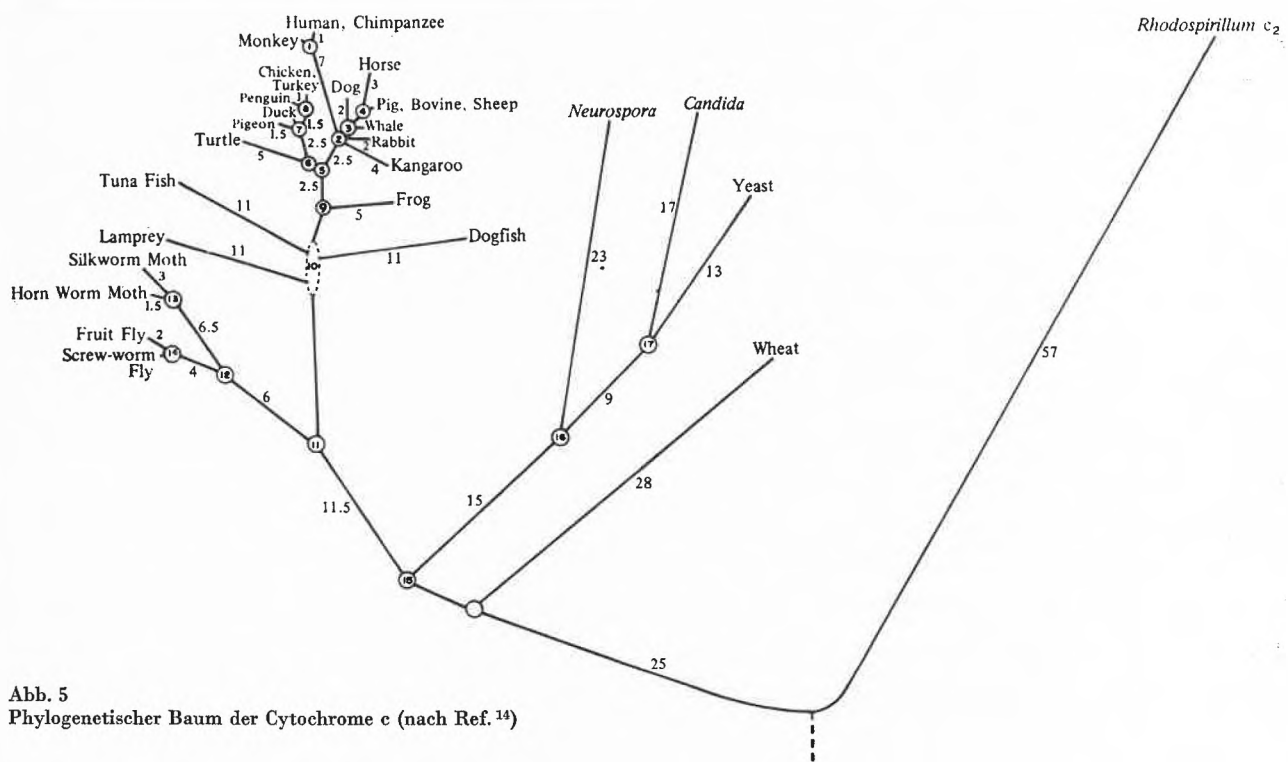


Abb. 5
Phylogenetischer Baum der Cytochrome c (nach Ref. 14)

Human milk	1	H. Lys-Val-Phe-Glu-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Arg-Thr-Leu-Lys-Arg-Leu-Gly-
Hen	1	Gly Ala Ala Met His
Duck II	1	Tyr Ser Ala Ala Met
Human milk	17	Met-Asp-Gly-Tyr-Arg-Gly-Ile-Ser-Leu-Ala-Asn-Trp-Met-Cys-Leu-Ala-
Hen	17	Leu Asn Tyr Gly Val Ala
Duck II	17	Leu Asn Tyr Gly Val Ala
Human milk	33	Lys-Trp-Glu-Ser-Gly-Tyr-Asn-Thr-Arg-Ala-Thr-Asn-Tyr-Asn-Ala-Gly-Asp
Hen	33	Phe Asn Phe Gln Arg Asp Thr Asn ⊙
Duck II	33	Asn Tyr Ser Phe Gln Arg Thr Asp ⊙
Human milk	50	Arg-Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ile-Phe-Glu-Ile-Asn-Ser-Arg-Tyr-Trp-Cys-
Hen	49	Gly Leu Glu Trp
Duck II	49	Gly Leu Trp
Human milk	66	Asn-Asp-Gly-Lys-Thr-Pro-Gly-Ala-Val-Asn-Ala-Cys-His-Leu-Ser-Cys-
Hen	65	Arg Ser Arg Leu Asn Ile Pro
Duck II	65	Ser Lys Gly Ile Pro
Human milk	82	Ser-Ala-Leu-Leu-Glx-Asx-Asx-Ile-Ala-(Ala, Asx, Val, Ala)-Cys-Ala-Lys-
Hen	81	Ser Ser Thr Ser Asn
Duck II	81	Val Arg Ser Thr Glu Ala Arg
Human milk	98	Arg-⊙-Val-Arg-Asp-Pro-Gln-Gly-Ile-Arg-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg-Asn-
Hen	97	Lys Ile Ser Gly Asp Met Asn
Duck II	97	Ile Ser Gly Asp Met Asn
Human milk	114	Arg-Cys-Gln-Asn-Arg-Asp-Val-Arg-Gln-Tyr-Val-Gln-Gly-Cys-Gly-Val.OH
Hen	114	Lys Gly Thr Gln Ala Trp Ile Arg Arg Leu
Duck II	114	Arg Gly Thr Ser Lys Trp Ile Arg Arg Leu

Abb. 6. Vergleich der Strukturen von Muttermilch- (⁶ und J. JOLLÈS und P. JOLLÈS, unveröffentlichte Resultate, 1970), Enteneiweiß-²³ und Hühner-eiweißlysozymen⁵. ⊙: Deletion

gen, und bei den meisten Vertebraten und Invertebraten gefunden werden. Auch in Bakterien, Phagen und Pflanzen wurden Lysozyme festgestellt^{21, 22}. Lysozyme hydrolysieren ein Mucopolysaccharid, welches sich in der Zellwand aller Bakterien befindet; sie bauen auch Chitin ab, allerdings viel langsamer.

Das Hühner-eiweißlysozym war das erste Lysozym, dessen Struktur ausgearbeitet wurde⁵. Seither haben wir einige weitere Strukturen aufgeklärt, u. a. diejenigen des Enteneiweißlysozyms II²³ und eines ersten menschlichen Lysozyms, des Muttermilchlysozyms⁶. 19 Aminosäuren unterscheiden die zwei Vogeleiweißenzyme. Die Anzahl der Unterschiede steigt auf 50, wenn man ein Vogeleiweißlysozym und das menschliche Enzym vergleicht; besonders hervorzuheben sind hier eine Deletion und eine Insertion (Abb. 6).

Alle diese Vertebratenlysozyme haben dieselbe Spezifität; jedoch schon eine ganz kleine Anzahl von Unterschieden in der Primärstruktur haben einen großen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Einwirkens der Enzyme auf ihr Substrat. Dies kommt ganz besonders zum Vorschein, wenn man dreidimensionale Modelle vergleicht, welche die enzymatische Aktivität als eine Funktion von pH und Ionenstärke wiedergeben²⁴ (Abb. 7).

Im Falle der Lysozyme kann man auf zwei weitere Fragen eine Antwort geben: Gibt es Lysozyme, die von Hühner-eiweißlysozym ganz verschiedene Strukturen aufweisen, und – gibt es Substanzen, die eine dem Hühner-

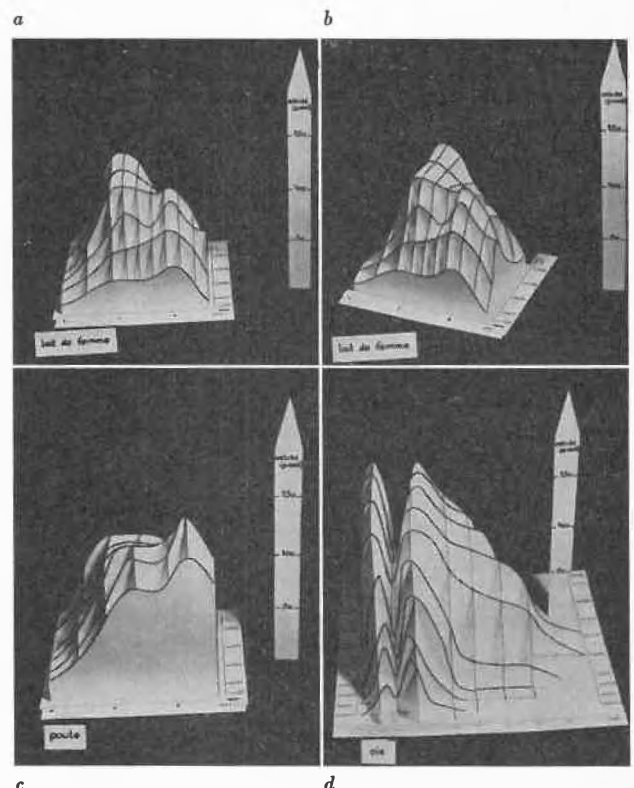


Abb. 7. Lytische Aktivität (v %) von Muttermilch- (a und b), Hühner-eiweiß- (c) und Gänseeiweißlysozymen (d) als eine Funktion von pH und Ionenstärke²⁴

enzym ähnliche Struktur besitzen, jedoch keine biologische Aktivität zeigen?

TSUGITA²⁵ beschrieb die Struktur zweier Phagenlysozyme, die vom Hühnerenzym total verschieden sind,

²¹ P. JOLLÈS, *Angew. Chem. int. Ed.* 3 (1964) 28.

²² P. JOLLÈS, *Angew. Chem. int. Ed.* 8 (1969) 227.

²³ J. HERMANN und J. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 200 (1970) 178.

²⁴ J. SAINT-BLANCARD, P. CHUZEL, Y. MATHIEU, J. PERROT und P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 220 (1970) 300.

²⁵ A. TSUGITA und M. INOUE, *J. Mol. Biol.* 37 (1968) 201.

was die Primärstruktur anbelangt, und eine besondere Affinität zu *E. coli*-Zellen haben. Wir selbst haben Untersuchungen mit einigen Invertebratenlysozymen und dem Weißbrühenlysozym unternommen, die uns zeigten, daß einige dieser Enzyme keine guten Muramidasen sind, wie dies für die Vertebratenlysozyme üblich ist, und sich statt dessen als ausgezeichnete Chitinasen erweisen. Es bleibt abzuwarten, ob die Strukturen von Lysozymen und Chitinasen (EC 3.2.1.14) Gemeinsamkeiten aufweisen.

BREW *et al.*²⁶ fanden kürzlich, daß Kuh- α -Lactalbumin und Hühnerweißlysozym sehr nah verwandte Strukturen haben, obwohl auf den ersten Blick diese zwei Proteine gar nichts miteinander zu tun haben. Immunologische «cross-reactions» konnten jedoch zwischen dem α -Lactalbumin und den Lysozymen nicht festgestellt werden^{27, 28}. α -Lactalbumin selbst besitzt auch keine biologische Aktivität. Man weiß jedoch heute, daß es eine der Untereinheiten des Enzyms Lactose-Synthetase (EC 2.4.1.c) darstellt, das die Synthese des Milchzuckers reguliert, indem es die Galaktose statt mit N-Acetylglucosamin mit Glucose verknüpft.

Nach Beobachtungen von PHILLIPS⁹, BLAKE²⁹ und VERNON³⁰ verläuft die Spaltung des Lysozylsub-

strates vermutlich folgendermaßen (Abb. 8): 1. Das Substrat wird an das Enzym gebunden und durch Wasserstoffbrücken und andere Kräfte in einer günstigen Lage fixiert. Hierbei wird der Ring des vierten Zuckerrestes verzerrt und in eine zur Bildung eines Carboniumions günstige Konformation gebracht. Das Substrat ist hier ein Hexasaccharid (NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-NAM). 2. Die Seitenkette von Glu 35 überträgt ein Proton auf das glykosidische Sauerstoffatom. 3. Die Heterolyse der Bindung zwischen C-1 und diesem Sauerstoffatom führt zu einem Carboniumion, das durch Wechselwirkung mit der negativen Ladung der Seitenkette von Asp 52 stabilisiert wird. 4. Das so aus dem Substrat entstandene Disaccharid diffundiert vom Enzym ab, ein Wassermolekül greift das Carboniumion an, und die Hydrolyse ist beendet. Hiernach sind also drei Faktoren für die katalytische Wirkung wichtig: allgemeine Säurekatalyse, Aktivierung des Substrats durch konformative Verzerrung und elektrostatische Wechselwirkung. Der für die Aktivität der Lysozyme wichtige Glutaminsäurerest Nr. 35 ist im α -Lactalbumin durch einen Histidinrest ersetzt. Dies erklärt höchst wahrscheinlich, warum diesem Protein die lysierende Wirkung fehlt.

Evolution der Substratspezifität

Das Studium der Lysozyme hat uns somit zum Studium der Evolution der Substratspezifität geführt.

Durch Divergenz aus einem gemeinsamen Ahnenprotein können im Laufe der Evolution auch Enzyme verschiedener Substratspezifität entstanden sein⁴. Der Strukturvergleich von Trypsin (EC 3.4.4.4)^{31, 32} und Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)³³ hat durch die große Zahl der übereinstimmenden Aminosäurepositionen (40%) zweifellos Homologie, d.h. gemeinsame Herkunft, ergeben.

Sie gehören beide zu den Proteinasen, deren katalytische Wirkung auf einer Umesterung der zu spaltenden Peptidbindung auf die Hydroxylgruppe eines bestimmten Serinrests beruht. Diese wird durch einen oder zwei Histidinreste ermöglicht, die sich durch die räumliche Faltung der Polypeptidketten von 222 (Trypsin-) bzw. 230 (Chymotrypsin-) Aminosäuren in nächster Nachbarschaft befinden kann, obwohl sie in der Kette um etwa 140 Aminosäuren vom Serin entfernt sind. Beim Vergleich der an der Wirkung beteiligten Peptidsequenzen von Rindertrypsin und -chymotrypsin A ergibt sich nahezu völlige Übereinstimmung. Auch andere Enzyme – wie z. B. Elastase (EC 3.4.4.7)³⁴ aus der Bauchspeicheldrüse des Schweins – ist dem Trypsin und Chymotrypsin sehr ähnlich⁴ (Abb. 9).

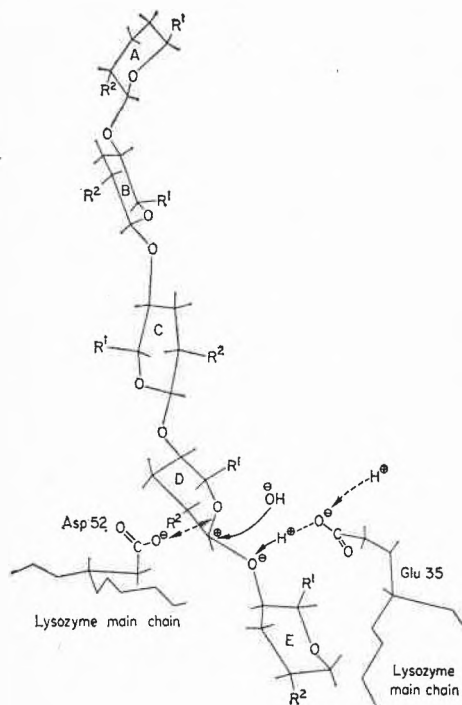


Abb. 8. Die Spaltung eines Substrates durch Lysozym⁹ (A, C und E: N-Acetylglucosamin; B und D: N-Acetylmuraminsäure)

²⁶ K. BREW, T. C. VANAMAN und R. L. HILL, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3747.

²⁷ R. ARNON und E. MARON, *J. Mol. Biol.* 51 (1970) 703.

²⁸ A. FAURE und P. JOLLÈS, *FEBS Letters* 10 (1970) 237.

²⁹ C. C. F. BLAKE, L. N. JOHNSON, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS und V. R. SARMA, *Proc. Roy. Soc. (London)* 167 B (1967) 378.

³⁰ C. A. VERNON, *Proc. Roy. Soc. (London)* 167 B (1967) 389.

³¹ M. CHARLES, M. ROVERY, A. GUIDONI und P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta* 69 (1963) 115.

³² B. S. HARTLEY, J. R. BROWN, D. L. KAUFFMAN und L. B. SMILLIE, *Nature* 207 (1965) 1157.

³³ J. R. BROWN und B. S. HARTLEY, *Biochem. J.* 101 (1966) 214.

³⁴ D. M. SHOTTON und B. S. HARTLEY, unpublished results, 1969.

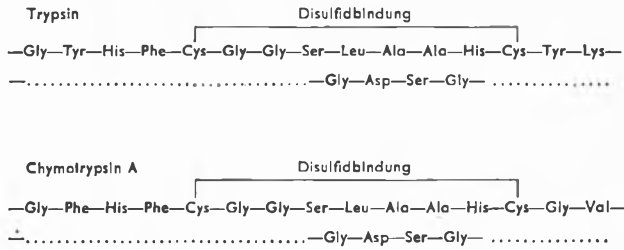


Abb. 9. Vergleich der Aminosäuresequenzen an den Wirkstellen von Trypsin und Chymotrypsin A des Rindes

Außer der soeben dargestellten Wirkungsstelle besitzt jedes Enzym eine für die Spezifität verantwortliche Stelle, an der die zu spaltende Peptidbindung angelagert werden muß, so z. B. basische Seitenketten von Lysin oder Arginin im Falle des Trypsins, hydrophobe Seitenketten im Falle des Chymotrypsins. So ist die Annahme berechtigt, daß eine diesbezügliche Mutation aus dem ursprünglichen gemeinsamen proteolytischen Enzym die beiden Substratspezifitäten hat entstehen lassen⁴. Man nimmt aufgrund der Gemeinsamkeit der Serin-haltigen Peptidstruktur Asp-Ser-Gly in weiteren Enzymen, darunter dem für die Blutgerinnung wichtigen Thrombin, und der ähnlichen Struktur Glu-Ser-Ala in Ester-spaltenden Enzymen an, daß alle aus einer noch viel älteren Urform hervorgegangen sind (Abbildungen 10 und 11). Einige Bakterien- und Pilzproteinasen haben am «aktiven» Serin eine andere Umgebung, z. B. -Thr-Ser-Met.⁴

Enzyme	Sequence
Chymotrypsin	-Gly-Val-Ser-Ser-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Lys-
Trypsin	-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Ser-Gly
Thrombin	-Asp-Ser-Gly-
Elastase	-Gly-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-(Gly,Gly,Pro)-Leu-His-Cys-Leu-Val
Alkaline phosphatase	-Gly-Lys-Pro-Asp-Tyr-Val-Thr-Asp-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-
Butyrylcholinesterase	-Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-
Acetylcholinesterase	-Glu-Ser-Ala-
Liver aliesterase	-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-Gly-
Phosphoglucomutase	-Val-Thr-Ala-Ser-His-Asp-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-Leu-Asp-Leu-
Subtilisin: BPN'	-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-Pro-His-
Mold protease	-Thr-Ser-Met-Ala-
Phosphorylase	-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-

Abb. 10. Aminosäuresequenzen in der Umgebung des «aktiven» Serinrestes von einigen Enzymen³⁵

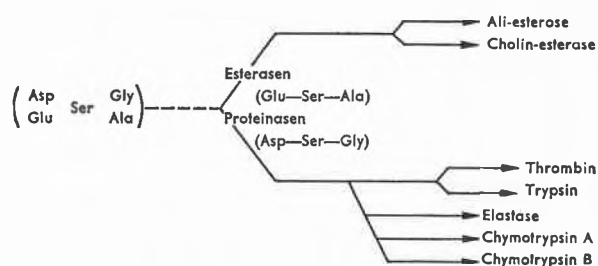


Abb. 11. Evolution von Esterasen und Proteinasen aus einer gemeinsamen Urform³⁶

³⁵ S. J. SINGER, *Advances Prot. Chem.* 22 (1967) 9.

³⁶ C. H. DIXON, *Mechanism of Protein Evolution, in Assays in Biochemistry* 2 (1966) 147.

Schlußbemerkungen

Ich möchte zum Schluß noch drei weitere Punkte erörtern.

Angenommene Punktmutationen

Abb. 12 zeigt zusammenfassend die Punktmutationen, die aufgrund des Studiums von zehn Proteinfamilien angenommen werden. Das gleiche Bild ergibt sich, wenn man jede Familie einzeln untersucht. Die Änderungen hängen also nicht von dieser oder jener Substanzgruppe ab, sondern unterliegen allgemeineren Gesetzen. Besonders hervorzuheben ist die große Zahl von 0 und 1.

Änderungen, die auf die Mutation von nur einem Nukleotid im Gen zurückzuführen sind, werden nur selten beobachtet. Wahrscheinlich traten sie öfters auf, aber die natürliche Selektion hat sie verworfen.

Mutabilität der verschiedenen Aminosäuren

Es sei noch hervorgehoben, daß im Laufe der Evolution die verschiedenen Aminosäuren sehr unterschiedlich mutieren. In den meisten Proteinen sind Ser, Met, Asn und Ile sehr leicht mutabel. Dagegen können hydrophobe Aminosäuren, besonders Trp sowie Cys, nicht leicht ausgetauscht werden. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, daß diese Aminosäuren besonders wichtig für die Struktur im Raum (Tertiärstruktur) sind.

«Restricted sequence»

Schließlich möchte ich den Begriff «restricted sequence» diskutieren³⁷: es handelt sich um Sequenzen, die weniger oft vorkommen, als dies normalerweise der Fall sein sollte; diese Beschränkung wurde wahrscheinlich durch die natürliche Selektion aufgedrungen.

Als Beispiel möchten wir die Sequenzen Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr (X = eine der 20 üblichen Aminosäuren) wählen. Man kennt heute ungefähr 250 komplette oder nahezu komplette Proteinstrukturen. Mit Hilfe der

³⁷ L. J. HUNT und M. O. DAYHOFF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970) 757.

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	-	
Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Gap		
A Ala																						
R Arg																						
H Asn	10	2																				
D Asp	10		15																			
C Cys	1																					
Q Gln	9	3	5	7																		
E Glu	15		3	40	10																	
G Gly	30		7	5	1	3	9															
H His	1	5	7	2		4	1															
I Ile	1		1		1	1	1		1													
L Leu	3		1	1		1	3	1	2	15												
K Lys	12	16	13	5		6	9	3	4	2	4											
M Met	2	2			1	1					2	9	1									
F Phe	2	1						1	5	7		2										
P Pro	17		3			3	5	5		1		2										
S Ser	44		22	12	5	6	6	18	5	1	2	9	2	2	5							
T Thr	22		8	1	2	5	6	4	2	7	4	7	1	1	2	34						
W Trp									1							3						
Y Tyr										1			1		18					2		
V Val	20		2	2	4	3	4	4	1	44	15	8	8	1	3	4	12					
- Gap	8	4		2		1	2	2	1		1	3	2	1	2	5	1					1

Abb. 12. Angenommene Punktmutationen bei zehn Proteinfamilien (nach DAYHOFF¹⁴)

Computer konnte man sehr schnell 20000 Tripeptide untersuchen, die in diesen Proteinen enthalten sind. Wahrscheinlichkeitsrechnungen erlaubten vorauszusagen, daß die zwei angegebenen Sequenzen $101 \cdot 9 \pm 10 \cdot 1$ mal vorkommen sollten. Dies ist jedoch nicht der Fall; diese zwei Sequenzen kommen in den 250 Proteinen nur 61 ± 4 mal vor.

Natürlich hat man das gleiche Spiel mit anderen verwandten Sequenzen durchgeführt: Glu/Gln-X-Ser/Thr, Ser/Thr-X-Asn/Asp, Ser/Thr-X-Glu/Gln. In allen diesen Fällen fand man jedoch die durch die Wahrscheinlichkeitsrechnung vorausgesagte Anzahl von Sequenzen.

Also warum diese 35% Beschränkung im Falle der Struktur Asn-X-Ser/Thr?

Man weiß heute, daß in den meisten Glykoproteinen, deren Struktur bekannt ist – ihre Zahl ist jedoch noch klein –, die prosthetische Zuckergruppe entweder durch eine O-glykosidische Bindung an Ser oder Thr des Proteinteils gebunden ist, wie im α -Casein³⁸, oder an einem Asparagin-Rest hängt, der meistens in einem Tripeptid Asn-X-Ser/Thr vorkommt³⁹. Diese zwei Tripeptidstrukturen, die meistens auf der «akzessiblen» Seite der Proteine liegen, werden wahrscheinlich von den Zuckerübertragenden Enzymen, den Glykosyltransferasen,

leicht erkannt, die dann der Proteinkette hier eine prosthetische Zuckergruppe anhängen. Die natürliche Selektion scheint also die Etablierung dieser zwei Tripeptide in all denjenigen Fällen zu verhindern, in denen die Anwesenheit von Zuckern die normale Funktion des ursprünglichen Proteins stören würde.

Chemische Strukturstudien ermöglichten verschiedenen Wissenschaften, wie der Genetik, der Physiologie, der Immunologie, der Kristallographie und natürlich auch der Evolutionsforschung, große Fortschritte zu machen. Die Resultate der Evolutionsstudien ergaben wiederum eine große Anzahl neuer zu lösender Probleme. Die Mathematiker hatten neue Theorien und auch Computer-Programme auszuarbeiten, um die gefundenen Resultate zu interpretieren, und die synthetisierenden Chemiker sind nun wohl aufgerufen, ein «Ur-Enzym» herzustellen, welches vielleicht weitaus mehr biologische Eigenschaften besitzen könnte als die heute bekannten Enzyme.

³⁸ J. JOLLÈS, P. JOLLÈS und C. ALAIS, *Nature* 222 (1969) 668.

³⁹ A. NEUBERGER, A. GOTTSCHALK und R. D. MARSHALL, in *Glycoproteins* (A. GOTTSCHALK, ed.), Elsevier, Amsterdam 1966, S. 275.