

Röntgenanalyse des Hämoglobins

NOBEL-VORTRAG AM 11. DEZEMBER 1962 [*]

VON DR. M. F. PERUTZ

MEDICAL RESEARCH COUNCIL LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY,
CAMBRIDGE (ENGLAND)

Vor vierzig Jahren kam *William Lawrence Bragg* nach Stockholm, um für die Verleihung des Nobelpreises an ihn und seinen Vater zu danken und um zu berichten, wie sie durch den Nachweis der Atomanordnung in Kristallen einfacher Verbindungen einen neuen und fruchtbaren Zweig der Physik ins Leben gerufen hatten [1]. Heute gilt *Sir Lawrence Bragg* als einer der Väter der Röntgenkristallographie. Aber er ist auch für mich persönlich so etwas wie ein wissenschaftlicher Vater, und ich bin außerordentlich stolz, daß ich nun selbst als sein früherer Schüler für die große Ehrung danken darf.

Ich begann meine Röntgenuntersuchungen an kristallinen Proteinen 1937 im Cavendish-Laboratorium in Cambridge unter *J. D. Bernal*, nachdem er und *Dorothy Hodgkin* gezeigt hatten, daß man von Proteinkristallen scharfe Beugungsbilder erhalten kann, aus denen sich noch Abstände in der Größenordnung zwischenatomarer Entfernungen erkennen lassen [2]. Bald danach wurde *Sir Lawrence Bragg* zum Cavendish-Professor ernannt. Meine Beugungsbilder des Haemoglobins entfachten sogleich seine Phantasie und Begeisterung. Er war von der Idee fasziniert, daß sich mit Hilfe der Röntgenanalyse auch die riesigen Moleküle untersuchen lassen sollten, die in lebenden Zellen als Katalysatoren wirken. *Braggs* nachdrückliche Unterstützung ermöglichte es mir, und später *Kendrew* und mir, unsere Untersuchungen all die vielen Jahre hindurch fortzuführen, die für die Entwicklung von Methoden zum Studium so komplizierter Strukturen nötig waren, und ich weiß, daß *Bragg* sich über unseren Erfolg und die uns zuteil gewordene Ehrung ungemein freut.

[*] Wir danken dem Autor und dem Nobel-Komitee, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieses Vortrags.

[1] *W. L. Bragg*, Les Prix Nobel (1921/22).

[2] *J. D. Bernal* u. *D. Crowfoot*, Nature (London) 133, 794 (1934).

Physikalische Grundlagen

Die Röntgenanalyse der Proteine gilt oft als nur dem Spezialisten verständlich, aber die unseren Arbeiten zugrundeliegenden Ideen sind einfach: Ein kleiner Proteinkristall wird in eine Glaskapillare gebracht und darin feucht gehalten (Abb. 1). Man durchstrahlt ihn

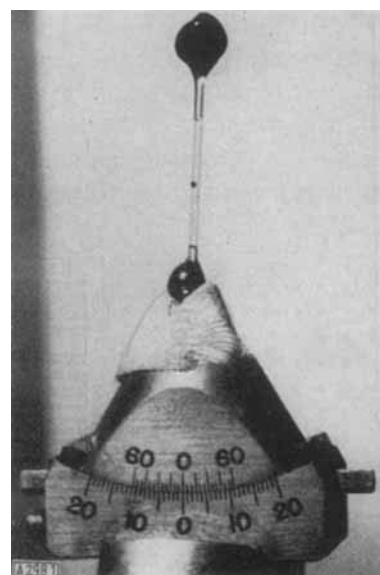


Abb. 1. Haemoglobin-Kristall im Gleichgewicht mit seiner Mutterlauge vor der Röntgenanalyse. Die Glaskapillare ist ungefähr 1 mm weit.

mit einem engen Bündel Röntgenstrahlen und dreht ihn dabei in bestimmte Richtungen. Auf einem hinter dem Kristall aufgestellten Röntgenfilm erscheint dann ein Beugungsbild (Abb. 2). Die Reflexe in diesem Bild liegen an den Kreuzungspunkten eines regelmäßigen zweidimensionalen Gitters, das zur Anordnung der Mole-

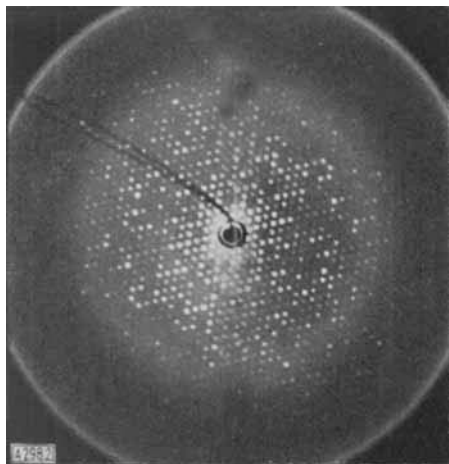


Abb. 2. Röntgendiagramm eines Haemoglobin-Kristalls, aufgenommen mit einer Buerger-Präzessionskamera. Das Beugungsbild wird zum Rand hin schwächer und entspricht dort einer Auflösung von 1,8 Å.

küle im Kristall in einer reziproken Beziehung steht. Darüber hinaus hat jeder Reflex eine charakteristische Intensität, die zum Teil durch die Anordnung der Atome im Molekül bestimmt wird. Bragg selbst hat dies in seinem Nobel-Vortrag wie folgt begründet:

„Es ist bekannt, daß die Form der Linien eines optischen Gitters die relative Intensität der mit diesem Gitter erzeugten Spektrallinien beeinflusst. Die Intensität einiger Spektrallinien kann größer oder kleiner sein als die anderer. Gitter werden manchmal von vornherein so hergestellt, daß der größte Teil der Lichtenergie in den Spektralbereich gelangt, der untersucht werden soll. Die Form der Gitterlinien hat keinen Einfluß auf die Lage der Spektrallinien, die von der Liniendichte abhängt. Die Gitterlinien können aber bei der Lichtstreuung einige Richtungen bevorzugen, und das erhöht die Intensität der Spektrallinien, die in diesen Richtungen liegen.“

Die Struktur der Atomgruppen in einem Kristallgitter beeinflusst die Stärke der Reflexe in genau der gleichen

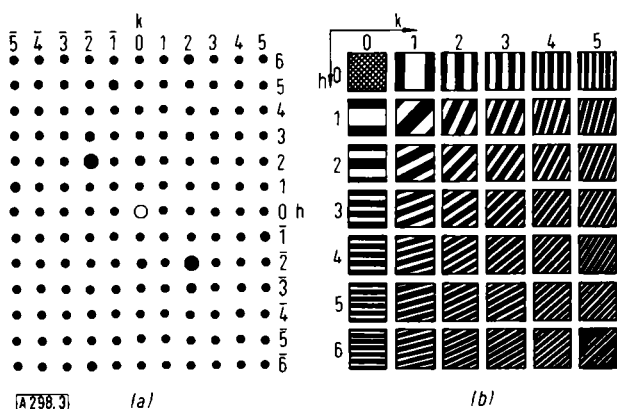


Abb. 3. (a) Ausschnitt aus einem Beugungsbild. Die Intensitäten der Reflexe sind durch die unterschiedliche Größe der Kreise angedeutet. Die Zahlen am Rand geben die Ordnungen an.

(b) Wellflächen, die aus Paaren symmetrisch gelegener Reflexe abgeleitet wurden. Die Ordnungen der Wellflächen entsprechen den Ordnungen der zugrundeliegenden Reflexe. So werden z. B. die Wellflächen der Ordnung 2,2 in (b) durch Interferenz der von den Punkten 2,2 und $\bar{2},\bar{2}$ in (a) gestreuten Wellen erzeugt. (Nach [2a].)

[2a] W. de Beauclair: Verfahren und Geräte zur mehrdimensionalen Fouriersynthese. Akademie-Verlag, Berlin 1949.

Weise. Die Röntgenstrahlen werden durch die Elektronenhüllen der Atome gebeugt. In einigen Richtungen wirken mehrere Atome zusammen und ergeben eine starke Streustrahlung. In anderen Richtungen heben sich ihre Wirkungen durch Interferenz nahezu auf. Die Anordnung der Atome läßt sich durch einen Vergleich der Intensitäten der Reflexe von verschiedenen Kristallflächen und in verschiedenen Ordnungen rekonstruieren.“

Es gibt also einen Weg, der gewissermaßen durch Umkehrung des Beugungsprozesses vom Beugungsbild zur Atomanordnung zurückführt. Um diesen Weg zu gehen, wird jedes Paar im Beugungsbild symmetrisch gelegener Punkte einer Gruppe von Wellflächen zugeordnet (Abb. 3). Die Amplituden der Wellflächen sind jeweils proportional zur Quadratwurzel aus den Intensitäten der Reflexe. Die in Abb. 3 b dargestellten Wellflächen werden dann rechnerisch oder mit Hilfe optischer Analoga übereinanderkopiert und ergeben so die Atomanordnung (Abb. 4a).

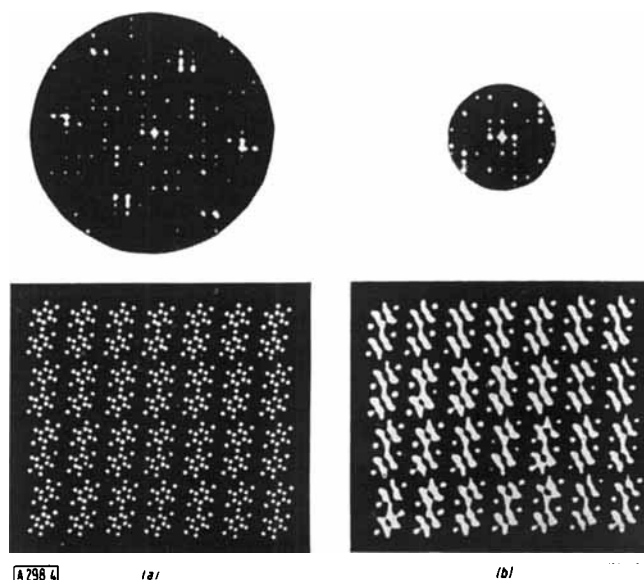
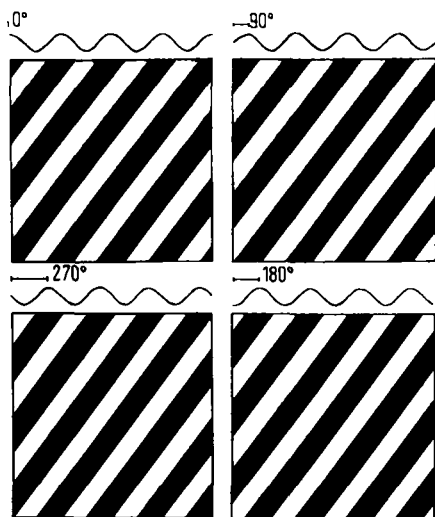


Abb. 4. (a) Atomanordnung im Hexamethylbenzol (unten), rekonstruiert durch Kombination der Wellflächen, die sich aus dem Röntgendiagramm (oben) ableiten lassen. Die Wellflächen wurden mit Hilfe eines optischen Gerätes rekombiniert.

(b) Mangelnde Auflösung, verursacht durch eine nur teilweise Auswertung des Röntgendiagrammes (oben).

An diesem Punkt aber liegt eine Komplikation: Um das richtige Bild von der Atomanordnung zu erhalten, muß jede Gruppe von Wellflächen in der richtigen Beziehung zu einem willkürlich gewählten Nullpunkt stehen (Abb. 5). Eine Wellfläche kann an diesem Punkt einen Wellenberg, ein Wellental oder irgendeinen dazwischenliegenden Wert haben, den man als Phasenwinkel bezeichnet. Man kann sagen, daß sich mit einer Gruppe von Wellflächen gegebener Amplitude eine unendliche Zahl von Atomanordnungen konstruieren läßt, je nachdem, welche Phasen man für die einzelnen Wellflächen wählt. Das Röntgendiagramm als solches gestattet nur eine Aussage über die Amplituden der Wellflächen, nicht über ihre Phasen, so daß die Hälfte der Information, die man zur Rekonstruktion der Atomanordnung benötigt, fehlt.

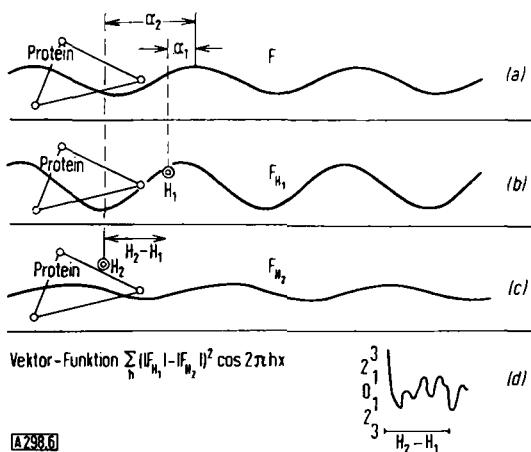
Das Phasenproblem läßt sich mit isomorphen, kristallinen Substanzen lösen, von denen eine das Protein allein



[A 298 5]

Abb. 5. Gruppen von Wellflächen mit verschiedenem Phasenwinkel relativ zur linken oberen Ecke. Der Phasenwinkel gibt den Abstand zwischen Wellenberg und Nullpunkt in Graden an; 360° entsprechen der Länge einer Welle.

ist, und eine zweite und dritte außer dem Protein noch ein schweres Atom, z. B. Quecksilber, enthält. Dieses schwere Atom muß mit dem Protein einmal in einer definierten Position 1, das andere Mal in einer Position 2 verknüpft sein (Abb. 6) [3–6].



[A 298 6]

Abb. 6. (a) Streuwellen eines als Dreieck dargestellten Proteins. (b) und (c) Änderung in Amplitude und Phase der Streuwellen, verursacht durch schwere Atome in den Positionen H_1 und H_2 ; α_1 und α_2 sind die Phasenwinkel der Streuwellen, bezogen auf H_1 und H_2 als Nullpunkte. (d) Vektorfunktion nach M. G. Rossmann. Die Fourier-Summe hat in einer Entfernung vom Nullpunkt, die dem Vektor $H_1 - H_2$ entspricht, ein deutliches Minimum. Normalerweise wird die Funktion in drei Dimensionen berechnet.

Die schweren Atome ändern die Intensitätsverteilung im Röntgendiagramm, und aus diesen Änderungen lassen sich die Phasen ermitteln. Das gelingt auf folgende Weise: Aus dem Unterschied in den Amplituden der

[3] C. Bokhoven, J. C. Schoone u. J. M. Bijvoet, Proc., Kon. nederl. Akad. Wetensch. 52, 120 (1949).

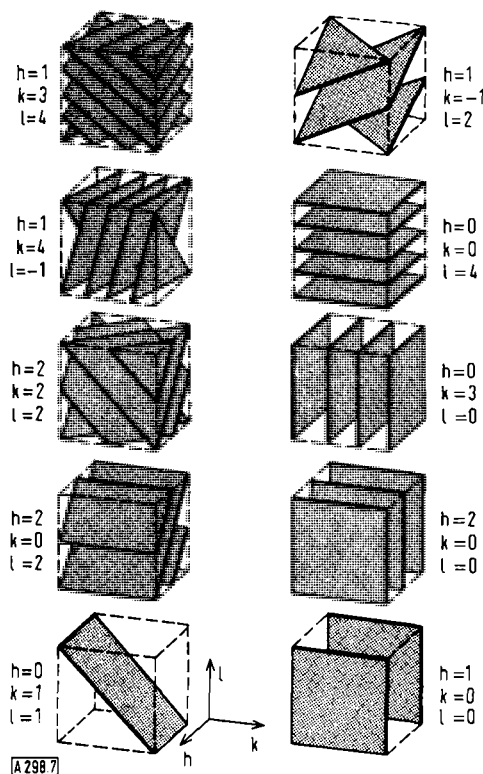
[4] D. W. Green, V. M. Ingram u. M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 225, 287 (1954).

[5] D. M. Blow, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 247, 302 (1958).

[6] G. Bodo, H. M. Dintzis, J. C. Kendrew u. H. W. Wyckoff, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 253, 70 (1959).

Streuwellen in Gegenwart und Abwesenheit des schweren Atoms geht für jede Streuwellen der Abstand des Wellenberges vom schweren Atom hervor. Man erhält also die Größe der Phasenwinkel bezogen auf das schwere Atom als Nullpunkt. Leider bleibt das Vorzeichen ungeklärt, denn es läßt sich nicht sagen, ob der Phasenwinkel im positiven oder negativen Sinn zu messen ist. Aber diese Schwierigkeit läßt sich lösen, wenn man aus dem Röntgendiagramm der Substanz mit dem schweren Atom in Position 2 den Abstand aller Wellenberge von dieser Position berechnet, und wenn der Vektor $H_1 - H_2$ bekannt ist. Die Bestimmung dieses Vektors ist einer der entscheidenden und oft schwierigen Schritte einer Röntgenanalyse [7, 8]. Solange die Zahl der schweren Atome, die mit jedem Protein-Molekül verknüpft sind, nicht zu groß ist, gelingt die Bestimmung des Vektors durch Berechnung der in Abb. 6d angeschriebenen Fourier-Reihe [9].

Nach der Lösung des Phasenproblems muß die Atom-anordnung rekonstruiert werden. Bei einfachen Strukturen lassen sich die Atomlagen oft bereits aus ihrer zweidimensionalen Projektion auf zwei zueinander senkrechte Ebenen ableiten, aber für Proteine braucht man ein dreidimensionales Bild. Um dies zu erhalten, nutzt man die Tatsache aus, daß die Röntgendiagramme dreidimensional sind: Abbildung 2 kann als Schnitt durch eine Kugel angesehen werden, die Schicht auf Schicht solcher Beugungsbilder enthält. Wertet man diese aus, so läßt sich jedem Paar symmetrisch gelegener Punkte eine dreidimensionale Gruppe von Wellflächen zuordnen (Abb. 7), und aus der Addition dieser Gruppen



[A 298 7]

Abb. 7. Dreidimensionale Gruppen von Wellflächen, durch deren Überlagerung sich ein dreidimensionales Bild der Elektronendichteverteilung gewinnen läßt. (Nach [2a].)

[7] D. Harker, Acta crystallogr. 9, 1 (1954).

[8] M. F. Perutz, Acta crystallogr. 9, 867 (1956).

[9] M. G. Rossmann, Acta crystallogr. 13, 221 (1960).

erhält man ein Bild der Proteinstruktur. Dieses Bild besteht aus zahlreichen Schnitten durch das Molekül, ähnlich wie man mit einem Mikrotom Schnitte durch ein Gewebe erhält, nur ist der Maßstab hier um das tausendfache kleiner (Abb. 8).

Schließlich stellt sich die Frage nach der Auflösung. Das Auflösungsvermögen ist ungefähr gleich der kürzesten Wellenlänge der Streuwellen, die man zur Rekonstruktion der Atomanordnung verwendet. Diese Wellenlänge steht in einer reziproken Beziehung zum Winkel

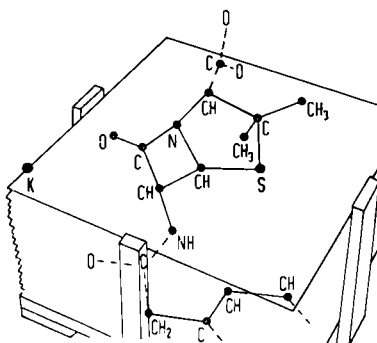
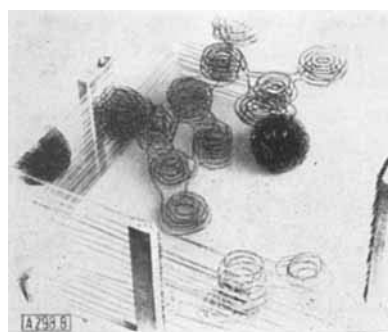


Abb. 8. Dreidimensionale Darstellung der Elektronendichteverteilung im Penicillin. Die Auflösung genügt, um einzelne Atome erkennen zu lassen. (Nach [9a].)

zwischen dem zugehörigen gebeugten Strahl und dem einfallenden Röntgenstrahl (Abb. 3). Rekonstruiert man die Atomanordnung nur mit einem Teil der Wellflächen, die sich aus dem Beugungsbild ableiten lassen, so ist die Auflösung ungenügend (Abb. 4b).

Röntgendiagramme von Proteinkristallen enthalten viele zehntausend Reflexe. Sie alle müssen für mehrere isomorphe Verbindungen vermessen und mit geometrischen Faktoren korrigiert werden, und schließlich muß man aus ihnen viele zehntausend Wellflächen ableiten, durch deren Überlagerung sich dann ein Bild von der Struktur des Proteins ergibt. So erforderte beispielsweise die Berechnung eines dreidimensionalen Bildes vom Myoglobin bei einer Auflösung von 2 Å die Registrierung und Auswertung von etwa 250000 Reflexen und die schließliche Addition oder Subtraktion von ungefähr $5 \cdot 10^9$ Zahlen [10]. Ganz offensichtlich wäre das ohne rasch arbeitende Rechenanlagen nicht zu bewältigen gewesen, und wir hatten insofern großes Glück, als die Entwicklung der Rechenmaschinen mit den Bedürfnissen unserer Röntgenanalysen stets gerade Schritt hielt.

Funktionen und Struktur des Haemoglobins

Wirbeltier-Haemoglobin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 64500. Vier seiner 10000 Atome sind Eisenatome, die zusammen mit Protoporphyrin vier Haemgruppen bilden. Die restlichen Atome befinden sich in vier einzelnen Polypeptidketten, deren jede über 140 Aminosäure-Reste enthält. Für menschliches Hae-

moglobin ist deren Sequenz heute bekannt [11,12]. Auch die Aminosäure-Sequenz des Pferde-Haemoglobins ist teilweise aufgeklärt worden; sie unterscheiden sich von der des menschlichen Haemoglobins nur an wenigen Stellen [13,14].

Haemoglobin transportiert Sauerstoff aus der Lunge in die Gewebe und Kohlendioxyd aus den Geweben zur Lunge. Seine vier Eisenatome befinden sich im zweiwertigen Zustand, und jedes von ihnen kann reversibel ein Molekül Sauerstoff binden, ohne dadurch selbst oxy-

diert zu werden. Sie stehen untereinander in einer physiologisch vorteilhaften Wechselwirkung, indem die Vereinigung eines Eisenatoms mit Sauerstoff die Geschwindigkeit der Sauerstoff-Aufnahme durch die drei anderen erhöht. Eine ähnliche Wechselwirkung tritt bei der Abgabe des Sauerstoffs auf. Das Kohlendioxyd wird nicht von den Eisenatomen transportiert. Seine Aufnahme wird aber dadurch erleichtert, daß bei der Sauerstoff-Abgabe in jedem Molekülviertel des Haemoglobins eine saure Gruppe verschwindet. Umgekehrt beschleunigt die Anwesenheit von Säuren in den Geweben die Abgabe des Sauerstoffs [15]. Das Haemoglobin kann also als ein Enzym mit zwei Funktionen und mehreren aktiven Zentren gelten, die untereinander in komplizierter und ausgeklügelter Wechselwirkung stehen. Die Klärung dieser Wechselwirkungen ist eines der Hauptziele unserer Untersuchungen.

Wir haben dreidimensionale Röntgenanalysen des Oxyhaemoglobins vom Pferd und des sauerstoff-freien Haemoglobins vom Menschen ausgeführt. Die bisher erreichte Auflösung beträgt 5,5 Å und läßt den Verlauf der Polypeptidketten sowie die Lage der Haemgruppen erkennen, genügt aber nicht, um einzelne Aminosäurereste sichtbar zu machen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, daß sich die sauerstoff-freie von der sauerstoffhaltigen Form strukturell deutlich unterscheidet und daß mit der Sauerstoff-Aufnahme eine molekulare Umordnung verbunden sein muß.

[11] G. Braunitzer, R. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hoborn, V. Rudloff u. B. Wittmann-Liehold, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325, 283 (1961).

[12] W. Konigsberg, G. Guidotti u. R. J. Hill, J. biol. Chemistry 236, PC 55 (1961).

[13] G. Braunitzer u. G. Matsuda, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 324, 91 (1961).

[14] D. B. Smith, persönliche Mitteilung.

[15] F. J. W. Roughton in: Respiratory Function of the Blood. Amer. Physiol. Soc. Series, 1963.

[9a] D. Crowfoot et al.: The Chemistry of Penicillin. Princeton University Press 1949, S. 327.

[10] J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips u. V. C. Shore, Nature (London) 185, 422 (1960).

Über die Struktur des Oxyhaemoglobins vom Pferd haben wir bereits vor einiger Zeit berichtet [16–18], und ich brauche daher nur an die wichtigsten Merkmale zu erinnern: In Übereinstimmung mit den Ergebnissen che-

Ein Modell des Haemoglobins entsteht, wenn man zunächst jede Kette ihrem Symmetriepartner gegenüberstellt (Abb. 10) und dann die „weißen“ Ketten umgekehrt oben auf die „schwarzen“ Ketten setzt (Abb. 11).

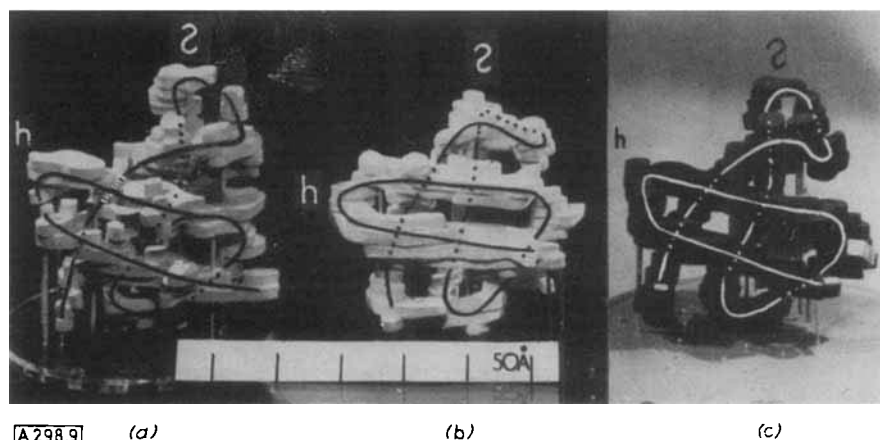


Abb. 9. Vergleich des Myoglobins (a) mit der „weißen“ und „schwarzen“ Untereinheit des Hämoglobins. (b) bzw. (c). Die weißen und schwarzen Untereinheiten haben ähnliche, aber nicht die gleichen Konfigurationen. In der schwarzen Kette (c) ist die S-förmige Faltung an der Spitze deutlicher ausgeprägt als in der weißen Kette (b). Die Haemgruppe sitzt auf der Rückseite der Modelle.

mischer Untersuchungen zeigt die Elektronendichteverteilung vier Haemgruppen und vier einzelne, paarweis gleiche Polypeptidketten. Diese Ketten haben sehr ähnliche Strukturen (Abb. 9), und jede von ihnen erinnert stark an die Struktur des Pottwal-Myoglobins [10], über die Dr. Kendrew berichtet wird [*]. Das Pottwal-Myoglobin besteht aus acht helixförmig gebauten Ab-

Man erhält eine tetraedrische Anordnung der Ketten, die zusammen eine kompakte, kugelförmige Molekel bilden. Die Haemgruppen befinden sich in einzelnen „Taschen“ an der Oberfläche der Molekel (Abb. 12 und 13). Der große Abstand zwischen den Haemgruppen war vielleicht die größte Überraschung für uns, denn man würde erwarten, daß ihre chemische Wechselwirkung

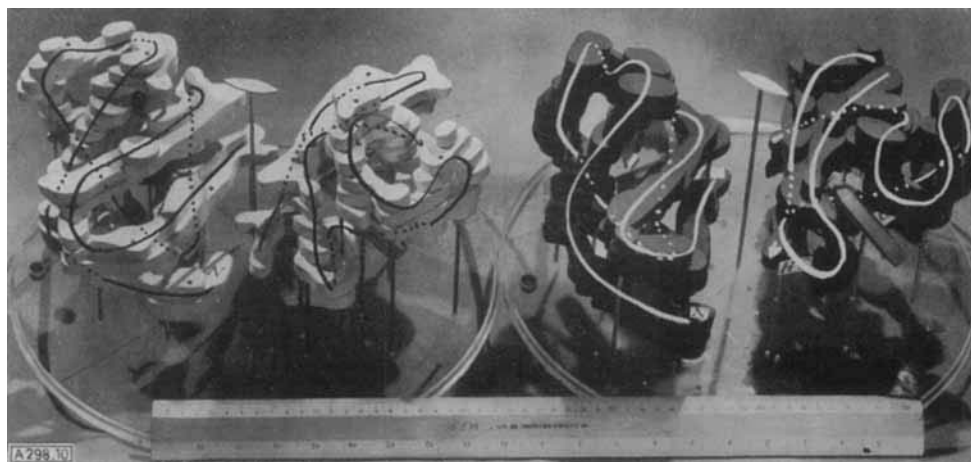


Abb. 10. Paarweise Anordnung der Haemoglobin-Untereinheiten. Jedes Paar ist in bezug auf die Diadenachse symmetrisch.

schnitten, zwischen denen Ecken oder nicht helixförmige Abschnitte liegen; das Aminoende der Kette befindet sich (in der in Abb. 9a gewählten Darstellung) unten links.

[16] M. F. Perutz, M. G. Rossmann, Ann F. Cullis, Hilary Muirhead, G. Will u. A. C. T. North, Nature (London) 185, 416 (1960).

[17] Ann F. Cullis, Hilary Muirhead, M. F. Perutz, M. G. Rossmann u. A. C. T. North, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 265, 15 (1961).

[18] Ann F. Cullis, Hilary Muirhead, M. F. Perutz, M. G. Rossmann u. A. C. T. North, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 265, 161 (1962).

[*] Siehe den Nobel-Vortrag von J. C. Kendrew, Angew. Chem. 75, 595 (1963).

auf einer engen Nachbarschaft beruht. Nach dem heutigen Stand lassen sich die physiologischen Eigenschaften des Oxyhaemoglobins aus seiner Struktur nicht erklären.

Die sauerstoff-freie Form des Haemoglobins (etwas unglücklich als reduziertes Haemoglobin bezeichnet) unterscheidet sich, wie seit langem bekannt, in Löslichkeit, Kristallstruktur [19–21] und anderen Eigenschaften

[19] F. Haurowitz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 254, 266 (1938).

[20] H. M. Jope u. J. R. P. O'Brien in: F. J. W. Roughton u. J. C. Kendrew: Haemoglobin. Butterworths, London 1949, S. 269.

[21] M. F. Perutz, I. F. Trotter, E. R. Howells u. D. W. Green, Acta crystallogr. 8, 241 (1955).

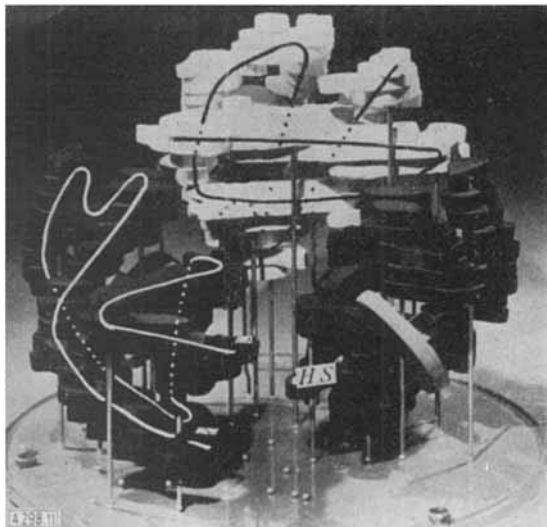


Abb. 11. Unvollständiges Modell einer Haemoglobin-Molekel. Das Modell besteht aus zwei schwarzen Untereinheiten und einer weißen Kette und zeigt, wie diese Gruppen in der Haemoglobin-Molekel zusammengefügt sind.

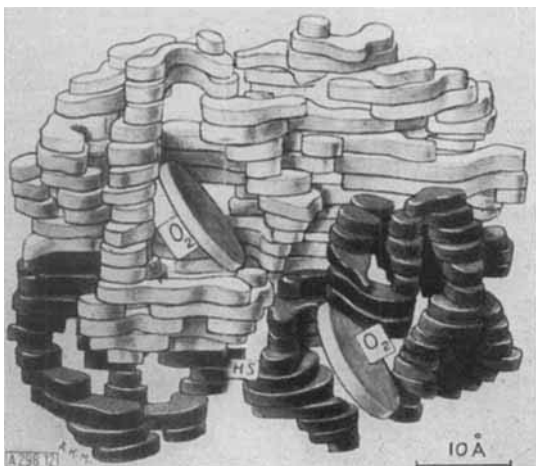


Abb. 12. Vollständiges Modell einer Haemoglobin-Molekel. Die grauen Scheiben bezeichnen zwei Haemgruppen. In der Mitte unten ist die SH-Gruppe eines Cystein-Restes angedeutet.

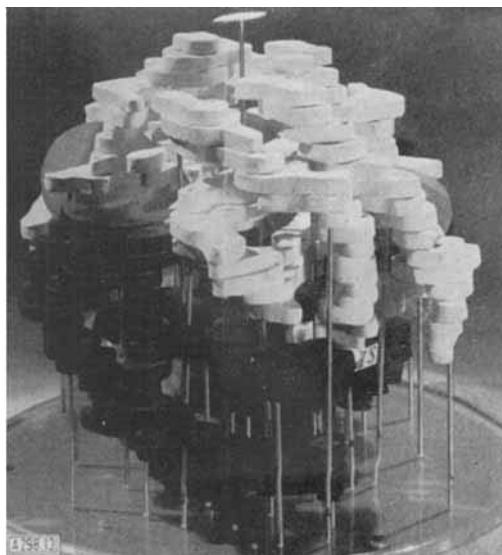


Abb. 13. Modell einer Haemoglobin-Molekel. Man erkennt, daß die Oberflächen der weißen und schwarzen Ketten weitgehend zueinander komplementär sind.

vom Oxyhaemoglobin, was auf eine strukturelle Umordnung bei der Sauerstoff-Aufnahme und -Abgabe schließen läßt. Leider kristallisiert sauerstoff-freies Haemoglobin vom Pferd in einer Form, die sich nicht zur detaillierten Röntgenanalyse eignet, so daß wir uns dem günstigeren Menschen-Haemoglobin zuwandten. Allerdings entsteht damit eine Lücke in der Schlußkette, denn die Struktur menschlichen Oxyhaemoglobins ist noch unbekannt und könnte sich möglicherweise vom Pferde-Oxyhaemoglobin ebenso unterscheiden, wie sauerstoff-freies Menschen-Haemoglobin. Angesichts der großen Ähnlichkeit in den Aminosäure-Sequenzen ist das zwar unwahrscheinlich, bleibt aber zu prüfen.

Bisher haben wir vom sauerstoff-freien menschlichen Haemoglobin nur wenige isomorphe Schweratom-Derivate röntgenanalytisch untersucht (beim Pferde-Oxyhaemoglobin waren es sechs), und aus technischen Gründen ließen sich mit diesen Derivaten die Phasenwinkel nicht sehr genau bestimmen [22].

Trotz dieser Mängel ist einiges doch schon sehr klar: Die Molekel besteht aus vier Untereinheiten, die den Untereinheiten des Pferde-Oxyhaemoglobins strukturell sehr ähnlich zu sein scheinen, aber die zwei (in unserem Modell schwarzen) Ketten sind deutlich anders geordnet, so daß der Abstand zwischen symmetrisch gelegenen Merkmalen beim sauerstoff-freien Haemoglobin um bis zu 7 Å größer ist. Die relative Anordnung der weißen Ketten ist gleich.

Chemisch bezeichnet man die weißen Untereinheiten als α -, die schwarzen als β -Ketten [23]. Die andersartige Ordnung der β -Ketten im sauerstoff-freien Haemoglobin muß natürlich die Folge einer strukturellen Umlagerung in den Ketten oder an den Berührungsstellen zwischen α - und β -Ketten sein. Kleine strukturelle Änderungen können wir bei der gegenwärtig erreichten Auflösung nicht erkennen, aber größere Änderungen, beispielsweise in den Winkeln zwischen den helixförmig gebauten Abschnitten, sollten nachzuweisen sein. Diese Winkel stimmen jedoch innerhalb der Fehlergrenzen für sauerstoff-freies menschliches Haemoglobin und Pferde-Oxyhaemoglobin überein. Welcher Art die strukturelle Änderung also auch sein mag, sie ist offenbar zu gering, als daß sie sich bei der gegenwärtigen Auflösung erkennen ließe.

Wir dürfen hoffen, daß sich die Wechselwirkungen zwischen den Haemgruppen und die Aciditätsänderungen, auf denen die physiologische Funktion des Haemoglobins beruht, eines Tages an Hand struktureller Veränderungen erklären lassen, von denen die hier beschriebenen neuen Ergebnisse einen ersten Eindruck vermitteln. Aber es könnte sein, daß man vorher die Struktur mindestens einer der beiden Formen bis in atomare Details bestimmt haben muß. Infolge des damit verbundenen enormen Aufwands an Arbeit wird das einige Zeit dauern, aber vielleicht ist diese Zeitspanne klein, verglichen mit den 22 Jahren, die für die erste Analyse nötig waren.

[22] Hilary Muirhead u. M. F. Perutz, Nature (London), im Druck.

[23] D. B. Smith u. M. F. Perutz, Nature (London) 188, 406 (1960).

Der Nachweis einer strukturellen Änderung des Haemoglobins bei der Aufnahme von Sauerstoff läßt es möglich erscheinen, daß auch andere Enzyme bei der Vereinigung mit ihrem Substrat ihre Struktur ändern und daß dies vielleicht ein wichtiger Faktor bei der enzymatischen Katalyse ist.

Dank

Ich habe bereits gesagt, wie sehr Sir *Lawrence Bragg* diese Untersuchungen förderte, aber ich schulde ihm außerdem großen Dank für viele Ideen und helfende Kritik.

Sir *Harold Himsworth*, Geschäftsführer des Medical Research Council, sorgte dafür, daß uns nie die benötigten Mittel oder Geräte fehlten. Ohne diese ständige Unterstützung wären unsere Arbeiten in dem Umfang unmöglich gewesen. Dr. *G. R. Pomerat*, einer der Direktoren der Rockefeller Foundation, half uns, zusätzliche Ausgaben zu decken, die der Medical Research Council nicht übernehmen konnte. Darüberhinaus unterstützte mich die Rockefeller Foundation in den ersten Jahren. Ohne ihre Hilfe wären die Untersuchungen über Anfänge wahrscheinlich nicht hinausgekommen.

Eingegangen am 1. April 1963 [A 298]

Übersetzt von Dr. *H. Grünwald*, Heidelberg

Myoglobin und die Struktur der Proteine

NOBEL-VORTRAG AM 11. DEZEMBER 1962 [*]

VON DR. J. C. KENDREW

MEDICAL RESEARCH COUNCIL,
LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY, CAMBRIDGE (ENGLAND)

Einleitung

Als ich mich gegen Ende des 2. Weltkrieges zum ersten Male für die Struktur der Proteine interessierte, war ich davon überzeugt, daß dieses Problem vor allen anderen die Aufmerksamkeit derer verdiente, die sich mit den Grundlagen der Biologie befassen. Wäre mein Interesse einige Jahre später geweckt worden, so hätte ich zweifellos bemerkt, daß hier nicht nur eine, sondern sogar zwei grundlegende Fragen unbeantwortet waren: die Struktur der Proteine und die Struktur der Nucleinsäuren. Die zweite Frage wurde später gestellt und früher beantwortet. Für mich jedoch schien in den vierziger Jahren nur eine Frage das Interesse desjenigen wert zu sein, der chemische und physikalische Methoden auf Probleme der Biologie anwenden wollte. Weiter schien die Röntgenstrukturuntersuchung die einzige erfolgversprechende Methode zur Bestimmung der Struktur so großer und kompliziert gebauter Moleküle, wie die Proteine es sind, zu sein. Rückblickend würde ich sagen, daß meine nahezu völlige Unkenntnis dieser Methode ein glücklicher Umstand gewesen ist, insofern als sie mir verbarg, wie wenig sich die damalige Technik der Röntgenkristallographie zur Strukturbestimmung von Molekülen mit vielen tausend Atomen eignete; es war wirklich ein Fall glückseliger Unwissenheit.

Einige Jahre lang blieb die Lage unverändert. Vieles wurde versucht, aber nichts ließ eine endgültige Lösung erhoffen, bis mein Kollege Dr. *Max Perutz* zeigte, daß die Methode des isomorphen Ersatzes, die man bis

dahin in der Kristallographie ziemlich selten und auf dem zur Diskussion stehenden Gebiet überhaupt nicht angewendet hatte, für die Lösung des Protein-Problems geradezu ideal war. Seine erste erfolgreiche Anwendung dieser Methode bei der Untersuchung der Hämoglobin-Struktur gab die Grundlage für alle folgenden Arbeiten, meine eigenen eingeschlossen. *Perutz* hat die Methode in seinem Vortrag [1] beschrieben, so daß ich über Fragen der Methodik nur soweit berichten werde, wie sie spezielle Bedeutung für meine eigenen Arbeiten haben.

Die Wahl des Themas und der Methode waren für mich ohne Problem gewesen; nicht so die Wahl des Materials. Es sollte ein Protein von niedrigem Molekulargewicht sein, das sich leicht in größerer Menge darstellen ließ, gut kristallisierte und noch nicht röntgenographisch untersucht war. Diesen Bedingungen schien das Myoglobin zu genügen; außerdem hatte es den Vorteil, mit dem Hämoglobin verwandt zu sein, dem sich *Perutz* seit einigen Jahren gewidmet hatte, und wie dieses die sehr bedeutende und interessante biologische Funktion der reversiblen Sauerstoff-Aufnahme zu erfüllen. Es zeigte sich später, daß das Myoglobin aus einer einfachen Polypeptidkette von etwa 150 Aminosäureresten besteht, die mit einer Hämgruppe verbunden ist. Daß sein Molekulargewicht zu dem des Hämoglobins im Verhältnis 1:4 steht, ist kein zufälliges Zusammentreffen; vielmehr beruht dieses Verhältnis auf einer grundlegenden strukturellen Verwandtschaft, die beim Vergleich der Molekülmodelle beider Proteine

[*] Wir danken dem Autor und dem Nobel-Komitee, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieses Vortrags.

[1] *M. Perutz*, *Angew. Chem.* 75, 589 (1963).