

Charakterisierung und Stabilität von Arthropoden-Hämocyanin

Dissertation
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Rüdiger Hübler
geb. in Heilbronn am Neckar

Mainz, 2001

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.Juli.2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Tiere und Tierhaltung	9
2.3	Gewinnung der Hämolymphe	10
2.4	Präparation der Hämocyanine	10
2.5	Dissoziation des Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i> und Aufreinigung der Untereinheiten	11
2.6	Native Gradientengelelektrophorese	13
2.7	Zweidimensionale-Immungelelektrophorese	15
2.8.	Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten	18
	2.8.1 Bradford-Test	18
	2.8.2 Modifizierter Lowry-Test	19
	2.8.3 Verfahren von Scopes	19
2.9	Bestimmung des Brechungsindex-Inkrement	21
2.10	Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropodenhämocyanin	23
	2.10.1 Vielwinkel-Laserlichtstreuung	23
	2.10.1.1 Theorie der Lichtstreuung	23
	2.10.1.2 Auswertung der Lichtstreudaten	26
	2.10.1.3 Aufbau und Meßprinzip des Laser-Lichtstreuphotometers	27
	2.10.1.4 Eichung und Normalisierung der Detektoren	28
	2.10.1.5 Berechnung der Konzentration und des Molekulargewichts	30
	2.10.2 Massenspektrometrie (MALDI-TOF)	31
2.11	Durchführung der Denaturierungsexperimente	33
	2.11.1 Absorptionsspektroskopie	33
	2.11.2 Fluoreszenzspektroskopie	33
	2.11.3 Berechnung des Förster-Transfers zwischen Tryptophanen und dem oxygenierten aktiven Zentrum	35
2.12	CD-Spektroskopie	37
2.13	Differential-Scanning-Kalorimetrie	37

3.	Ergebnisse	40
3.1	Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten	40
3.1.1	Bradford-Test	41
3.1.2	Modifizierter Lowry Test	42
3.1.3	Verfahren von Scopes	44
3.2	Bestimmung des Brechungsindex-Inkrement	47
3.3	Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropoden-Hämocyaninen	49
3.3.1	Molekulargewichtsbestimmung mittels Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung	49
3.3.2	Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-TOF	64
3.4	Stabilität des oligomeren Hämocyanins der Spinne <i>Eurypelma californicum</i>	69
3.4.1	Einfluß von GdnHCl auf den Oligomerisierungsgrad	69
3.4.2	Einfluß von GdnHCl auf das aktive Zentrum	71
3.4.3	Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	73
3.4.4	Stabilität der Sekundärstruktur in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	76
3.5	Stabilität der Untereinheit \underline{e} der Spinne <i>Eurypelma californicum</i>	78
3.5.1	Einfluß von GdnHCl auf das aktive Zentrum der Untereinheit \underline{e}	78
3.5.2	Fluoreszenzeigenschaften der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	79
3.5.3	Fluoreszenzanisotropie in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	83
3.5.4	Tryptophan-Fluoreszenzlöschung im oxygenierten Hämocyanin von <i>Eurypelma californicum</i> durch Förster-Transfer	87
3.5.5	Stabilität der Sekundärstruktur der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	94
3.6	Temperaturstabilität des Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i>	96
3.6.1	Messung der Stabilität von <i>Eurypelma</i> -Hämocyanin mittels DSC	96
3.6.2	Thermische Stabilität der Sekundärstruktur	100
3.6.3	Thermische Stabilität der Epitope	105

4.	Diskussion	107
4.1	Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropoden-hämocyanin	107
4.1.1	Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten mit verschiedenen Verfahren	108
4.1.2	Wirkungsmechanismen der verschiedenen Tests und Auswirkungen der Aminosäurezusammensetzung auf das Ergebnis der Proteinbestimmung	109
4.1.3	Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten mit dem spektroskopischen Verfahren von Scopes	112
4.1.4	Zur Methode der Molekulargewichtsbestimmung mittels Vielwinkel-Laserlichtstreuung	116
4.1.5	Molekulargewichtsbestimmung der Arthropoden-Hämocyanine	118
4.1.6	Einfluß des Brechungsindex-Inkrementes auf die Molekulargewichtsbestimmung der Arthropodenhämocyanine	121
4.1.7	Mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementes	122
4.1.8	Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von <i>Eurypelma californicum</i> mittels MALDI-TOF	123
4.2	Stabilität des oligomeren Hämocyanins der Spinne <i>Eurypelma californicum</i>	126
4.2.1	Dissoziation des 24-meren Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	126
4.2.2	Wechselwirkungen im oligomeren <i>Eurypelma</i> -Hämocyanin	127
4.2.3	Fluoreszenzeigenschaften des oligomeren Hämocyanins	132
4.2.4	Fluoreszenzverhalten des oligomeren Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i> in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	134
4.2.5	Stabilität der Sekundärstruktur des oligomeren Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	136
4.2.6	Verlauf der Denaturierung im Vergleich der verschiedenen spektroskopischen Methoden	137
4.3	Stabilität der Untereinheit <u>e</u> der Spinne <i>Eurypelma californicum</i>	140
4.3.1	Modellierte Struktur der Untereinheit <u>e</u>	140
4.3.2	Position der Cysteine in der modellierten Struktur der Untereinheit <u>e</u>	144
4.3.3	Fluoreszenzeigenschaften der Untereinheiten des Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i>	147
4.3.4	Löschung der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Hämocyanin durch Förstertransfer	149

4.3.5	Fluoreszenzverhalten der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	152
4.3.6	Stabilität des aktiven Zentrums der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration	155
4.3.7	Energieübertragung von Tyrosin auf Tryptophan durch Förster-Transfer	158
4.3.8	Verlauf der Denaturierung im Vergleich der verschiedenen spektroskopischen Methoden	161
4.3.9	Beurteilung des Verlaufs der Denaturierung anhand der 3D-Struktur	163
4.4	Thermische Stabilität des oligomeren Hämocyanins und der Untereinheiten von <i>Eurypelma californicum</i>	167
4.4.1	Denaturierung mittels `Differential-Scanning`-Kalorimetrie	167
4.4.2	Thermische Stabilität der Sekundärstruktur	168
4.4.3	Thermische Stabilität der Epitope	170
4.4.4	Adaptation an die Lebensbedingungen in extremen Biotopen	171
5.	Zusammenfassung	173
6.	Literatur	176

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Circulardichroismus
dn/dc	Brechungsindex-Inkrement
Da	Dalton
DSC	Differential-Scanning-Calorimetry
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ϵ	spezifischer Extinktionskoeffizient
FI	Fluoreszenzintensität
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GPC	Gelpermeationschromatographie
HABA	2,4 - Hydroxyphenylazo-Benzoessäure
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
λ_{\max}	maximale Emissionswellenlänge
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight
Mio	Million/-en
M_r	Molekulargewicht
nm	Nanometer
ns	Nanosekunden
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SANS	Small Angle Neutron -Scattering
SAXS	Small Angle X-Ray-Scattering
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS	sichtbares Licht

1. Einleitung

- **Aufbau und Struktur der Hämocyanine**

Hämocyanine sind sehr große, sauerstofftransportierende Proteine, die frei gelöst in der Hämolymphe von Arthropoden und Mollusken vorkommen. Arthropoden- und Molluskenhämocyanine zeigen deutliche strukturelle Unterschiede [van Holde and Miller, 1995; Salvato and Beltramini, 1990; Ellerton et al., 1983]. Molluskenhämocyanine sind zylindrisch aufgebaut und bestehen aus Dekameren, Didekameren oder Multidekameren. Eine Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 350 - 450 kDa besteht aus bis zu 8 funktionellen Domänen, die jeweils ein aktives Zentrum mit zwei Kupferatomen zur Sauerstoffbindung besitzen. Im Gegensatz hierzu sind Arthropodenhämocyanine kubisch aufgebaut. Sie bestehen aus Hexameren oder einem Vielfachen davon ($n \times 6$) [Markl and Decker, 1992] (Abb.1.1).

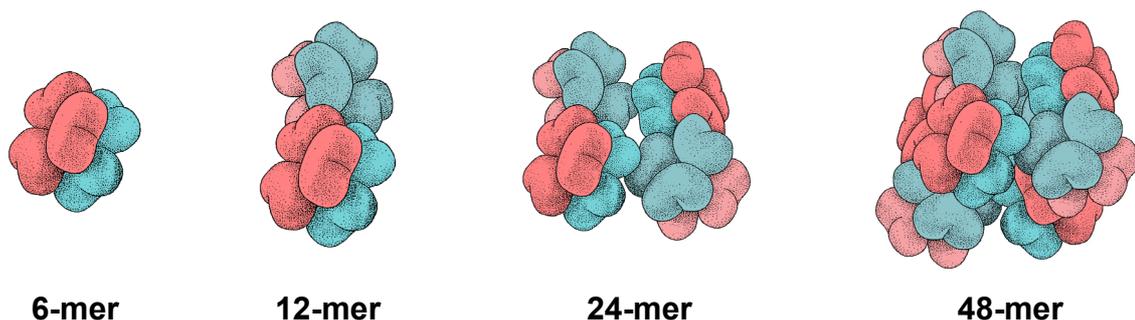


Abb. 1.1: Aggregationsstufen verschiedener Arthropodenhämocyanine.

6- und 12-mere kommen vorwiegend bei Crustaceen, 24-, 36- (nicht gezeigt) und 48-mere vorwiegend bei Cheliceraten vor. Die Trimere der jeweiligen Hexamere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.

Eine Untereinheit besteht aus etwa 620-650 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von etwa 72-75 kDa und besitzt jeweils ein aktives Zentrum mit zwei Kupferatomen zur Sauerstoffbindung.

- **Struktur des 24-meren Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum***

Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ist ein aus vier Hexameren aufgebautes 24-mer, das aus sieben immunologisch und biochemisch unterschiedlichen Untereinheitentypen besteht [Markl et al., 1979], deren Sequenzen bekannt sind [Voit et al., 2000]. Die Stöchiometrie der Untereinheiten, die mit den

Buchstaben a-g bezeichnet werden, wurde als 4:2:2:4:4:4:4 bestimmt [Markl et al. 1981a]. Zwei der vier Hexamere, die das 24-mer bilden, enthalten Untereinheit b, die anderen zwei Untereinheit c (Abb. 1.2). Alle Untereinheiten sind hierbei in bestimmter Weise arrangiert und notwendig, um ein stabiles 4x6-mer zu formen [Markl et al., 1981, 1982]. Jeweils ein Hexamer mit Untereinheit b und ein Hexamer mit Untereinheit c bilden ein 12-mer. Die zwei identischen 12-mer bilden über Kontakte zwischen den Untereinheiten b und c das native oligomere 24-mer.

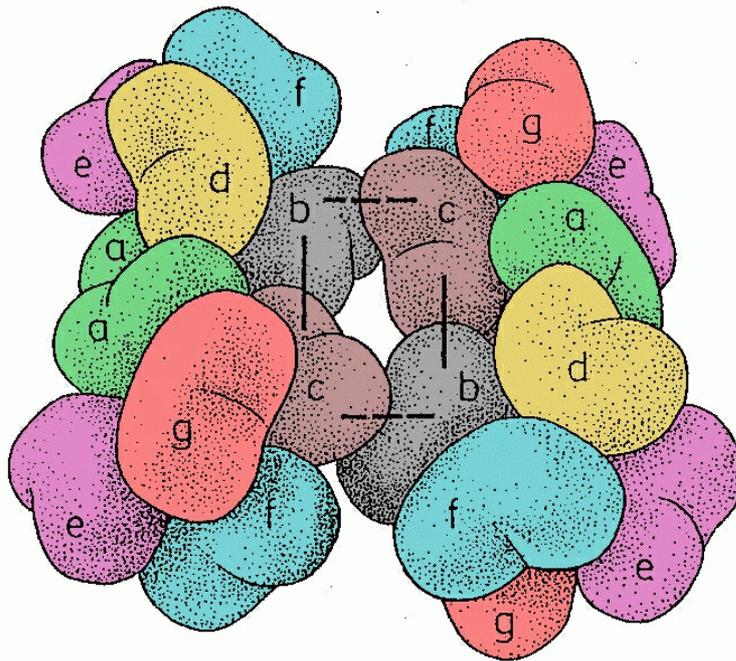


Abb. 1.2: Quartärstruktur des 4x6-meren Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*.

Die fünf Monomere a, d, e, f, and g besitzen jeweils die gleiche topologische Position innerhalb der Hexamere. In zwei Hexameren kommt Untereinheit b und in den anderen zwei Untereinheit c vor. Zwei Hexamere bilden jeweils die 12-mer, die ihrerseits über die Untereinheiten b und c miteinander verbunden sind. Diese Halbmoleküle sind strukturell identisch [Abbildung modifiziert nach Savel-Niemann et al., 1988].

Während das Hexamer Sauerstoff mit einer geringen Kooperativität bindet, zeigt das 24-mer von *Eurypelma californicum* eine hoch kooperative Bindung von Sauerstoff mit einem Hillkoeffizient von $n_H > 7$. Jede Untereinheit trägt in spezifischer Weise zu dieser Bindung bei [Loewe, 1978; Decker et al, 1989; Decker and Sterner, 1990]. Die strukturelle Hierarchie des 24-meren Hämocyanins geht so mit einer Hierarchie auf funktioneller Ebene einher [Decker et al., 1986, 1988; Robert et al., 1987; Savel-Niemann et al., 1988; Decker and Sterner, 1990 a,b].

- **Struktur des oxygenierten aktiven Zentrums der Arthropodenhämocyanine**

Die beiden Kupferatome des aktiven Zentrums der Arthropodenhämocyanine sind durch insgesamt sechs Histidinreste koordinativ gebunden [Gaykema et al., 1984]. Die genaue Struktur des oxygenierten aktiven Zentrums war lange unklar. Spektroskopische Untersuchungen mit synthetischen Komplexen (Tris-pyrazolborat-Liganden) von Kitajima et al. [1989], die dem aktiven Zentrum der Hämocyanine sehr ähnlich sind [Kitajima et al., 1989, 1992; Baldwin et al., 1992], und die Röntgenstrukturanalyse der Untereinheit II des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* [Magnus et al., 1994] zeigten, daß es sich bei dem oxygenierten aktiven Zentrum um einen Kupfer-Peroxo-Komplex in side-on-Koordination ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$) handelt.

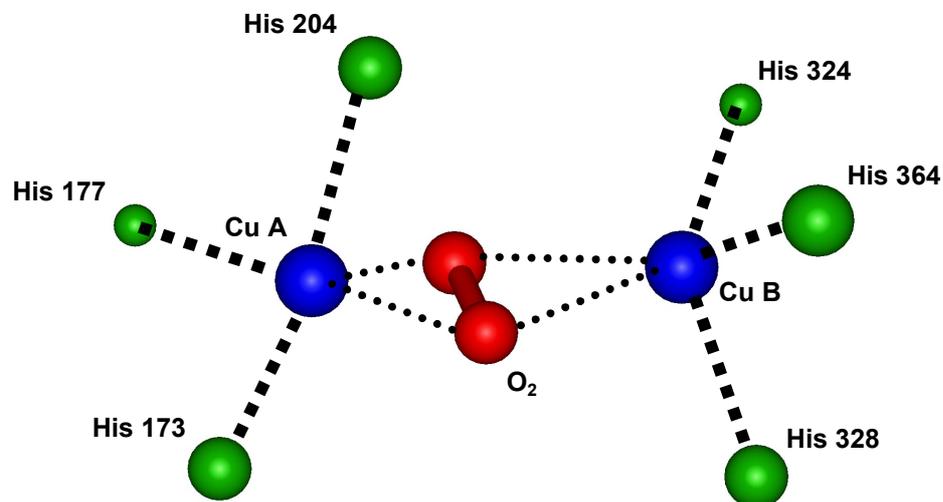


Abb. 1.3: Aktives Zentrum des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* [Magnus et al., 1994]

Das Sauerstoffmolekül (rot) ist in der `side-on`-Konfiguration an die beiden Kupferatome (blau) gebunden. Die N-Atome der Histidine, die die Kupferatome koordinieren, sind grün dargestellt.

Mit der Bindung von Sauerstoff ist eine Abstandsänderung der beiden Kupferatome in den Untereinheiten verbunden. Röntgenstrukturanalysen des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* zeigen Verkleinerung des Abstands der Kupferatome von 4.6 Å im deoxygenierten zu 3.2 Å im oxygeniertem Hämocyanin [Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994]. Diese Abstandsänderung induziert eine Konformationsänderung des Proteins, die offensichtlich die Basis für die starken homo- und heterotropen Wechselwirkungen der Untereinheiten im oligomeren Hämocyanin darstellen [Volbeda and Hol, 1989; Markl and Decker, 1992; van Holde and Miller, 1995].

- **Stabilität und Flexibilität von Proteinen**

Die Faltung von globulären Proteinen ist ein zentrales Problem in der Biochemie und Molekularbiologie. Für das Verständnis der Faltung und der Ausprägung der dreidimensionalen Raumstruktur ist eine physikalische Charakterisierung sowohl des nativen als auch des denaturierten Zustandes notwendig.

Generell zeichnen sich Proteine, insbesondere Enzyme mesophiler Organismen, durch eine nicht sonderlich ausgeprägte Stabilität aus [Privalov 1979, Jaenicke, 1991]. Während eine hohe spezifische Stabilität auch eine gewisse Steifheit impliziert, ist die relativ niedrige Stabilität der meisten Enzyme auf die entsprechend katalytisch notwendige Flexibilität zurückzuführen [Huber, 1988]. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß Proteine, die als Inhibitoren wirken, wie z.B. Proteinase-Inhibitoren, relativ stabile Strukturen annehmen.

Auch beim Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* fordert die Kooperativität der Sauerstoffbindung und deren Regulation durch Effektoren neben der strukturellen Stabilität [Sterner et al., 1995; Hübler et al., 1998] eine gewisse Flexibilität des Proteinmoleküls.

- **Stabilitätsuntersuchungen von Proteinen mit chaotropen Agenzien**

Eine Möglichkeit, um Informationen über die Stabilität von Proteinen und über die komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen strukturellen Ebenen zu bekommen, ist die Durchführung von Experimenten mit chaotropen Agenzien, wie beispielsweise Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) oder Harnstoff.

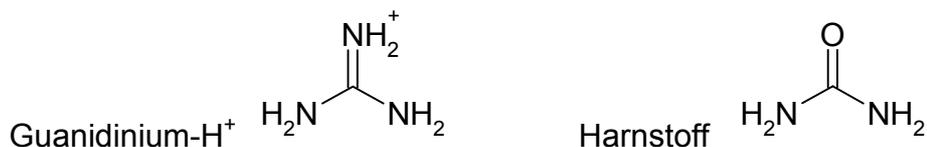


Abb. 1.4: Guanidinium-Ion und Harnstoff

Der Wirkungsmechanismus dieser chaotropen Agenzien ist noch nicht eindeutig geklärt. Es scheint klar, daß denaturierende Agenzien direkt mit dem Protein wechselwirken [Simpson and Kauzmann, 1953]. Ferner ist bekannt, daß hohe Konzentrationen an Denaturierungsmitteln die Eigenschaften des Lösungsmittels selbst verändern, wie Messungen der Oberflächenspannung mit GdnHCl und

Harnstoff gezeigt haben [Breslow et al., 1990]. Die molekulare Basis dieser beiden Effekte bei der Denaturierung ist allerdings noch nicht klar. Ebenso wenig ist der genaue Wirkungsort der Denaturierungsmittel bekannt. Es wurde postuliert, daß die denaturierenden Agenzien in das Protein wandern, mit den Atomen des Proteinrückrates Wasserstoff-Brücken bilden und es so entfalten [Hedwig et al., 1991]. Unterstützt wird dieses Modell dadurch, daß die Austauschraten von Protonen einiger NH-Gruppen, sowohl an der Oberfläche als auch im Inneren von Proteinen, in der Gegenwart von z.B. Harnstoff abnehmen. Dies konnte für Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas gezeigt werden [Kim and Woodward, 1993]. Kristallografische Studien mit Diketopiperazin, einer Modellverbindung für die Peptidbindung, und Harnstoff zeigten Wasserstoff-Brücken zwischen der Amidgruppe und dem Denaturierungsmittel auf [Thayer et al., 1993]. Kristallographische Studien mit Ribonuclease A und GdnHCl und mit Dihydrofolatreduktase und Harnstoff zeigen laut Dunbar et al. [1999], daß kein spezifischer Sekundär- oder Tertiärstrukturtyp für die Bindung der Denaturierungsmittel nötig zu sein scheint.

Andere Modelle schlagen vor, daß die Wirkung der Denaturierungsmittel auf einer Schwächung des hydrophoben Effektes basiert, welcher gemeinhin als die vorherrschende Kraft bei der Faltung von Proteinen postuliert wird [Privalov et al., 1988; Murphy et al., 1990; Sharp, 1991; Dunbar et al., 1997].

• **Charakterisierung der Arthropodenhämocyanine**

Eine wichtige Größe bei der Charakterisierung von Proteinen ist das Molekulargewicht [M_r] zu dessen Bestimmung eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung stehen. Alle besitzen Vor- und Nachteile und je nach Molekulargewichtsbereich eine unterschiedliche Genauigkeit.

Die Methode der SDS-Gelelektrophorese erlaubt die Bestimmung molarer Massen bis etwa 200 kDa unter denaturierenden Bedingungen. Viele der bisherigen Molekulargewichtsbestimmungen von Hämocyaninen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf der Ebene von Untereinheiten durchgeführt und die Molekulargewichte der entsprechenden Oligomere abgeschätzt [Rogala und Gondko, 1981; Markl et al., 1979b; Larson et al., 1981; Salvato und Zatta, 1978; Gondko und Michalik, 1981; Ellerton et al., 1970; van Holde und van Bruggen, 1971].

Für die Molekulargewichtsbestimmung sehr großer Proteine können die Methoden der analytischen Ultrazentrifugation und der statischen Lichtstreuung angewendet

werden. Ein großer Vorteil hierbei ist, daß sie die Charakterisierung der Proteine in Lösung erlauben. Für oligomere Hämocyanine wurden in mehreren Untersuchungen Molekulargewichte mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt [Jeffrey et al., 1978; Kuiper et al., 1975; Johnson und Yphantis; 1978, Klarman et al., 1979; Ellerton et al., 1970; Markl et al. 1976; Schneider et al., 1977].

Bei der Methode der statischen Lichtstreuung sind der molare Extinktionskoeffizient $[\epsilon]$ und das Brechungsindex-Inkrement $[dn/dc]$ wichtige Größen, die in die Berechnung des Molekulargewichtes eingehen. Die spezifischen Extinktionskoeffizienten $[\epsilon]$ und Brechungsindex-Inkremente $[dn/dc]$, die bisher für Hämocyanine bestimmt wurden, unterscheiden sich zum Teil deutlich [Nickerson and van Holde, 1971; Morimoto and Kegeles, 1971; Herskovits et al. 1981; Herskovits und Hamilton, 1987; Herskovits et al., 1990]. Im Rahmen meiner Arbeit sollten, neben der Verwendung von Literaturwerten, die Extinktionskoeffizienten und Brechungsindex-Inkremente für die verwendeten Arthropoden-Hämocyanine bestimmt werden.

Neben der Methode der Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung sollte zur Bestimmung der M_r einzelner Untereinheiten oder von Untereinheitengemischen des Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* die Methode der Massenspektrometrie angewendet werden. Mit der 1987 von Karas und Hillenkamp entwickelten 'Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation–Time Of Flight' [MALDI-TOF] wurden die Molekulargewichte einzelner Untereinheiten und von Untereinheitengemischen des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* bestimmt.

- **Stabilitätsuntersuchungen mit dem Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum***

Zur Untersuchung der Stabilität sollten im Rahmen meiner Arbeit Denaturierungsexperimente mit GdnHCl mit dem Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* erste Ergebnisse von Fertl [1989], Penz [1990] und Schraml [1991] verifizieren und mit Hilfe neuer Methoden ergänzen. Hiermit sollten weitere Erkenntnisse über die Art der Wechselwirkungen und Kräfte gewonnen werden, die sowohl auf der Ebene der oligomeren Struktur, als auch auf der Ebene einer einzelnen Untereinheit wirken.

Das 24-mere Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* eignet sich besonders gut für derartige Stabilitätsuntersuchungen, da bereits eine große Menge struktureller Informationen vorhanden ist. Neben dem Aufbau der Quartär- und Tertiärstruktur [Markl et al., 1980a, b, 1981; Linzen et al., 1985, Linzen, 1989, de Haas and van

Bruggen, 1994] sind auch die Aminosäuresequenzen der sieben verschiedenen Untereinheiten bekannt [Voit et al., 2000]. Von den nahe verwandten Hämocyaninen der Crustaceenart *Panulirus interruptus* und der Cheliceratenart *Limulus polyphemus* kennt man die Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 3.2 Å bzw. 2.18 Å [Volbeda and Hol, 1989, Hazes et al., 1993].

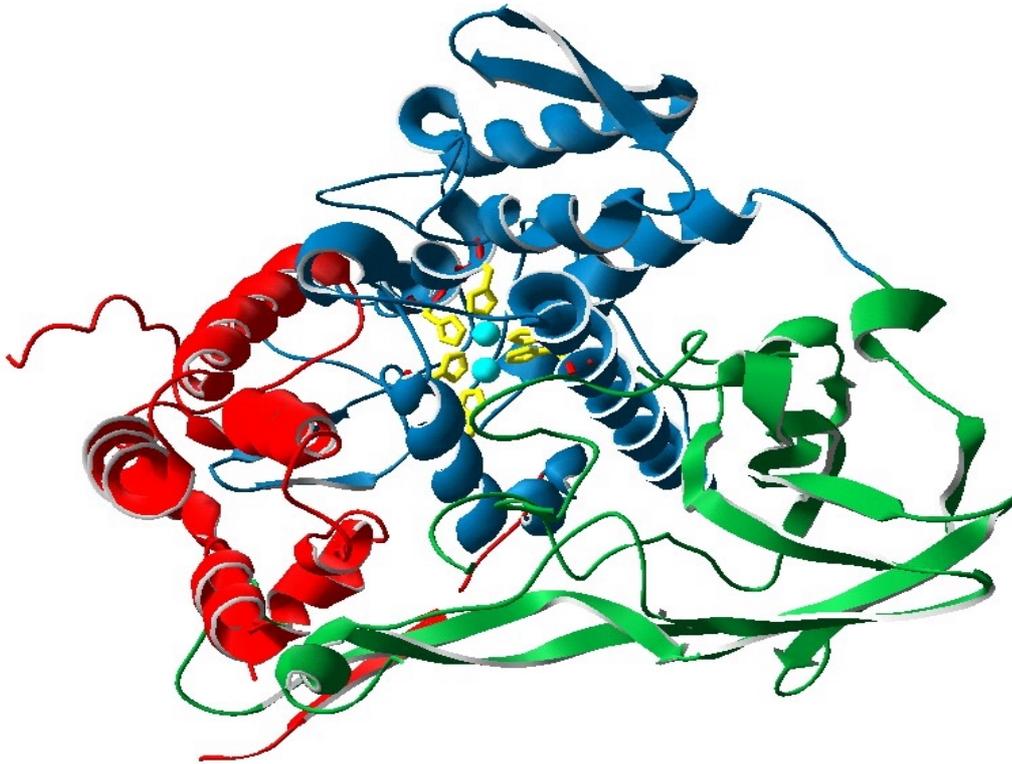


Abb. 1.5: Struktur der Untereinheit II des Cheliceratenhämocyanins von *Limulus polyphemus* [111a; Hazes et al., 1993].

Die Untereinheit gliedert sich in drei Domänen mit jeweils typischen Faltungsmotiven. Domäne I (rot) besteht vorwiegend aus α -Helices. Der Bereich zwischen den beiden offenen Enden wurde in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst. Domäne II (blau) besitzt ein 'Four- α -Helix-Bundle' als charakteristisches Faltungsmotiv. Die α -Helices beinhalten die sechs Histidine (gelb), die die zwei Kupferatome (cyan) des aktiven Zentrums koordinieren. Domäne III (grün) besteht vorwiegend aus β -Faltblättern, die ein siebensträngiges β -Barrel bilden.

Neben der Stabilität des oligomeren Hämocyanins wurde auch die Stabilität der Untereinheit e untersucht. Mit der Kenntnis der vollständigen Aminosäuresequenz der Untereinheit e [Voit et al., 2000] und der Röntgenstruktur der Untereinheit II des nahe verwandten Cheliceraten-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* [Hazes et al., 1993] konnte die räumliche Struktur der Untereinheit mittels des Verfahrens der 'Homologie-Modellierung' modelliert werden [Sali et al., 1994, Voit et al., 2000]. Damit war die Basis für eine Interpretation der Ergebnisse der Denaturierung auf

molekularer Ebene gegeben. Untereinheit \underline{e} ist in diesem Fall von besonderem Interesse, da die vier Untereinheiten im 24-meren Molekül jeweils an den äußeren Ecken des Oligomers liegen (Abb. 1.2). Reassoziationsexperimente haben gezeigt, daß nur bei Anwesenheit von Untereinheit \underline{e} stabile 24-meren Hämocyaninmoleküle gebildet werden [Markl et al., 1982]. Ferner fehlt einem reassemblierten 24-mer, das keine Untereinheit \underline{e} besitzt, jegliche Kooperativität [Decker, 1981]. Somit scheint Untereinheit \underline{e} eine zentrale Rolle bei der Stabilität und der Gewährleistung der Kooperativität im 24-meren Molekül zuzukommen.

Neben der Stabilität gegenüber GdnHCl, sollte die Thermostabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* untersucht werden. Hierbei wurden sowohl der Einfluß der Oligomerisierung auf die Thermostabilität der Untereinheiten [Fertl, 1989; Sterner et al., 1995], als auch die die Thermostabilität der verschiedenen strukturellen Ebenen, untersucht werden. Diese sollte mit der Stabilität von Hämocyaninen anderer Arthropoden mit unterschiedlicher Aggregationshöhe verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a.-Qualität und wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen mit folgenden Ausnahmen:

EDTA	(Fluka, Neu-Ulm)
TEMED	(Fluka, Neu-Ulm)
NaH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	(Merck, Darmstadt)
BSA	(Sigma, Steinheim)
Sinapinsäure	(Sigma, Steinheim)
HABA	(Sigma, Steinheim)
APS	(Sigma, Steinheim)
Coomassie	(Sigma, Steinheim)
H ₂ O	(Milli-Q-Plus PF, Millipore, Eschborn)

2.2 Tiere und Tierhaltung

Die Spinnen der Art *Eurypelma californicum* wurden bei der Firma North Carolina Biological Supply (Charlotte, USA) bezogen.

Die Haltung der Tiere erfolgte in etwa 20 cm hohen Plastikwannen (30x30 cm), die mit einem Gitter nach oben abgeschlossen waren. Der Boden der Wannens war mit Torf bedeckt. Wasser wurde *ad libitum* in Petrischalen bereitgestellt. Die Fütterung erfolgte zweiwöchentlich mit jeweils einem Heimchen pro Spinne. Der Wechsel von Licht und Dunkel erfolgte in einem 12 Stunden Rhythmus.

Die amerikanischen Hummer *Homarus americanus*, die Krebse *Astacus astacus* und *Astacus leptodactylus*, die Taschenkrebse *Cancer pagurus* und die Strandkrabben *Carcinus maenas* wurden lebend von einem ortsansässigen Fischgroßhändler (Deutsche See, Mainz) bezogen. Das Hämocyanin von *Limulus polyphemus* wurde von Prof. Bonaventura aus North Carolina bezogen. Das Hämocyanin von *Panulirus interruptus* wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Beintema (Holland) zur Verfügung gestellt.

2.3 Gewinnung der Hämolymphe

Die Hämolymphe von *Eurypelma californicum* wurde durch Punktion des dorsal gelegenen Perikards erhalten. Die austretende Hämolymphe wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und sofort etwa 1:1 mit Puffer verdünnt. Danach wurden die Zellbestandteile der Hämolymphe für 30 Minuten bei 13000 g abzentrifugiert (Universal 16/16R, Hettich, Tuttlingen).

Auch die Hämolymphe der Krebse wurde durch Punktion des dorsal gelegenen Perikards gewonnen. Hierzu wurde eine Kanüle auf der dorsalen Seite flach am hinteren Ende des Carapax eingestochen und die Hämolymphe mit einer Spritze aufgezogen. Diese wurde dann direkt in die Zentrifugenbehälter gefüllt und zur Gerinnung für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde die geronnene Hämolymphe mittels eines Spatels zerkleinert und die Gerinnungsfaktoren und zellulären Bestandteile für 40 Minuten bei 30.000 g bei 4°C abzentrifugiert (Ultrazentrifuge L7, Beckmann, München). Der Überstand wurde mit 0.02% Azid versehen und bis zur Aufreinigung bei 4°C gelagert.

2.4 Präparation der Hämocyanine

Die Aufreinigung der Hämocyanine erfolgte mittels Gelfiltration. Die Hämolymphe von *Eurypelma californicum* wurde bei 4 °C über eine Biogel A 1.5 M (Bio-Rad, München) Size-Exclusion Säule mit einer Länge von 120 cm und einem Durchmesser von 1.5 cm aufgereinigt. Die Säule wurde mittels Schwerkraft betrieben. Der Fluß betrug etwa 15-18 ml/h. Pro Lauf wurden etwa 2-3 ml der Hämolymphe mit einer Hämocyaninkonzentration von 30-50 mg Protein aufgegeben. Das aufgereinigte Hämocyanin wurde mittels eines Fraktionssammlers in 3 ml Fraktionen (Modell 2110, Bio-Rad, München) gesammelt. Der Hämocyaningehalt der Fraktionen wurde danach mittels eines Absorptionsspektrometers (Hitachi U-3000, Tokio, Japan) bestimmt.

Die Aufreinigung der Crustaceen-Hämocyanine erfolgte mittels Gelfiltration über ein mit Fractogel TSK HW 55(S) gefülltes XK50 Säulengehäuse (Pharmacia, Freiburg). Die Säule war an eine FPLC-Anlage (Biologic Chromatography System, Bio-Rad, München) angeschlossen. Das aufgereinigte Hämocyanin wurde mittels eines Fraktionssammlers (Modell 2128, Bio-Rad, München) gesammelt.

Zur Aufreinigung der Hämocyane wurden etwa 10 ml Hämolymphe mit einer Proteinkonzentration von etwa 40 mg/ml auf die Säule aufgetragen und mit einem Fluß von 2.5 ml/min eluiert. Das aufgereinigte Hämocyanin wurde in 4 ml Fraktionen gesammelt und bei 4°C gelagert.

2.5 Dissoziation des Hämocyans von *Eurypelma californicum* und Aufreinigung der Untereinheiten

Für die Dissoziation des 24-meren Hämocyans von *Eurypelma californicum* wurde Hämocyaninlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Visking Dialysierschlauch (Roth) mit einer Porengröße von 25-50 Å (Ausschlußgrenze: 10.000-20.000 Dalton) gegen 0.05 M GlyOH-Puffer mit 5 mM EDTA, pH 9.6 dialysiert. Die Dialyse erfolgte gegen das 1000-fache Puffervolumen unter ständigem Rühren bei 4°C.

Die Aufreinigung der Untereinheiten erfolgte mittels einer DEAE-Sepharose-Ionenaustauschsäule welche an ein FPLC-System (Biologic Chromatography System, Bio-Rad, München) angeschlossen war. Hierbei wurde ein Stufengradient von 0 M bis 0.4 M KCl angelegt, um die Untereinheiten zu eluieren (Abb. 2.1).

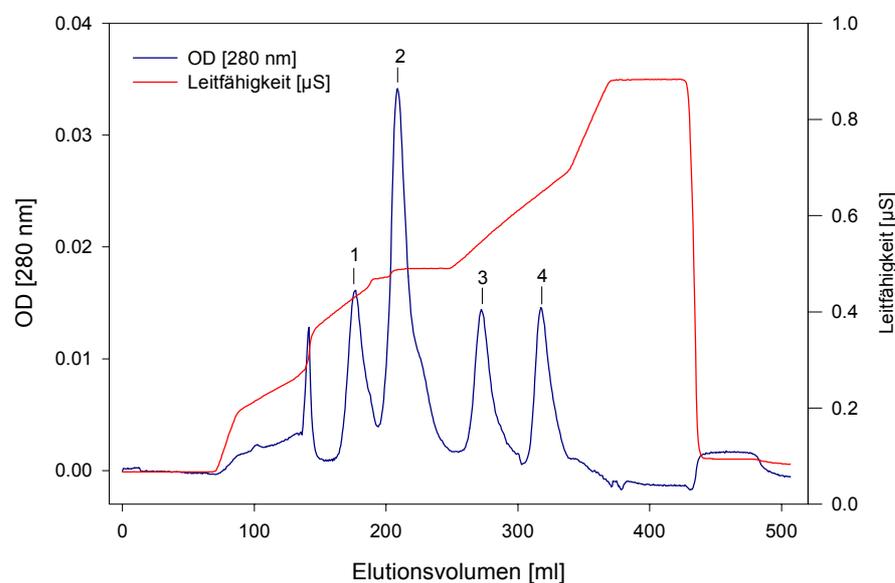


Abb. 2.1: Elutionsprofil der Untereinheitenreinigung des Hämocyans aus *Eurypelma californicum*.

Dargestellt ist das OD-Signal des UV-Vis-Detektors bei 280 nm und der Verlauf des KCl-Gradienten anhand der Leitfähigkeit. Peak 1 enthält Untereinheit d, Peak 2 die Untereinheiten a, g und f, Peak 3 Untereinheit e und Peak 4 das Heterodimer bc.

Die einzelnen Fraktionen der Peaks wurden mittels nativer PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abb 2.2).

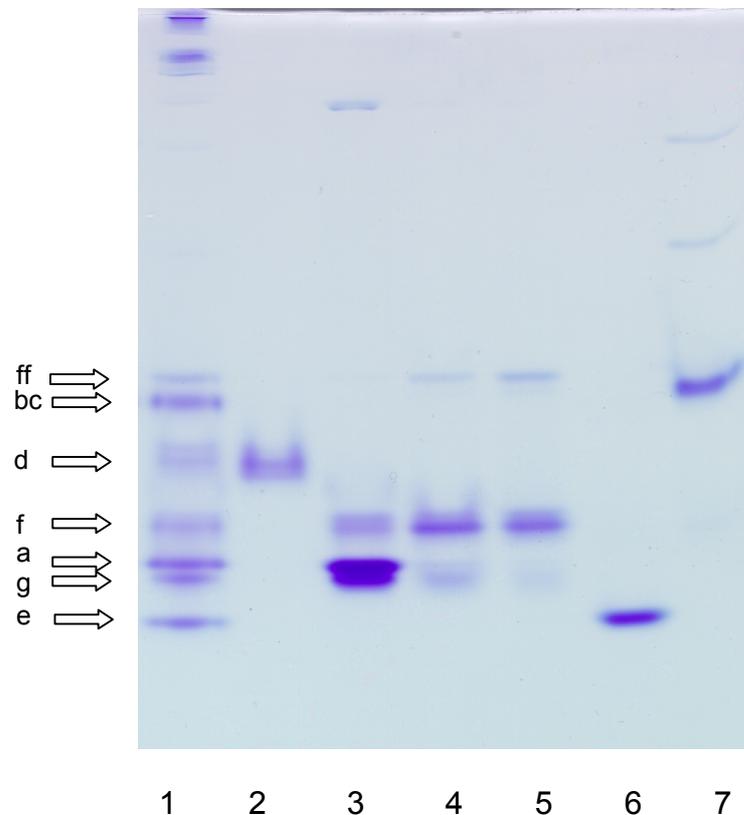


Abb. 2.2: Natives Gradientengel (5-15%) zur Überprüfung der mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigten Untereinheitenfraktionen.

Spur 1 zeigt ein Untereinheitengemisch mit Oligomerresten. Zu erkennen sind das Dimer ff, die Untereinheiten d, f, g, a und als unterste Bande Untereinheit e. In Spur 2 wurde Peak 1 des Eluats aufgetragen (Abb. 2.5.2). Es handelt sich hierbei um Untereinheit d. Spur 3-5 zeigen verschiedene Fraktionen des 2. Peaks des Eluats. Hier sind die Untereinheiten a, f und g vorhanden. Zu erkennen ist auch das Dimer ff. Spur 6 entspricht Peak 3 des Eluats und zeigt eindeutig Untereinheit e. In Spur 7 wurde Peak 4 aufgetragen. Hier handelt es sich um das Heterodimer bc.

Mit diesem Aufreinigungsschritt konnten die Untereinheiten d und e und das Dimer bc von den Untereinheiten a, f und g, welche in einem Peak eluierten, getrennt werden. Nach der Aufreinigung wurden die Untereinheiten gegen 0.05 M GlyOH-Puffer, pH 9.6 dialysiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Native Gradientengelelektrophorese

- **Lösungen**

I. Acrylamidlösung

Rotiphorese Gel 30-Fertiglösung ; 30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid

II. Trenngelpuffer

1.5 M Tris-HCl, pH = 8.8 (20°C)

III. Sammelgelpuffer

0,5 M Tris, pH = 6.8 (22°C)

IV. TEMED (Fluka)

V. APS 0.2%

in 1 ml Aliquots, bei -20°C gelagert

VI. Isobutanollösung (wassergesättigt)

60 ml Isobutanol wurden mit 10 ml H₂O vermischt, geschüttelt und die obere Phase verwendet.

VII. Probenpuffer –nativ-:

50% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau in H₂O

VIII. Laufpuffer –nativ-:

Stammlsg: 0,1 M Tris, 0,75 M Glycin

Für die Elektrophorese wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:4 mit H₂O verdünnt.

IX. Färbelösung:

0.2% Coomassie , 50% Methanol, 40% H₂O, 10% Eisessig.

Hierfür wurden 2 g Coomassie R 250 in 500 ml Methanol, 400 ml H₂O, 100 ml Eisessig gelöst und mit einen Faltenfilter filtriert.

X. Entfärbelösung:

Sie besteht aus 50% H₂O, 40% Methanol und 10% Eisessig

Hierfür wurden 1000 ml H₂O mit 800 ml Methanol und 200 ml Eisessig vermischt.

XI. Marker für native Gele

Als Marker für die nativen Gele wurde andissoziierte Hämolymphe von *Eurypelma californicum* verwendet. Hierfür wurden 10 µl abzentrifugierte Hämolymphe von *Eurypelma californicum* mit 500 µl 0,05 M GlyOH-Puffer, 5 mM EDTA pH = 9.6 gemischt und für circa 1-2 Stunden andissoziiert. Die Lösung wurde danach im Kühlraum aufbewahrt.

Lösungen	Sammelgel 3% [ml]	Trenngel 5% [ml]	Trenngel 15% [ml]
Rotiphorese Gel 30	1.40	2.33	7.00
Trenngelpuffer (Pkt. II)	-	3.50	3.50
Sammelgelpuffer (Pkt. III)	3.50	-	-
H ₂ O	8.89	7.96	3.29
TEMED	0.028	0.014	0.014
APS, 0.2%	0.21	0.21	0.21

Tab. 2.1: Mischungsverhältnisse der Lösungen für Sammel- und Trenngel der nativen PAGE.

- **Durchführung der nativen Gradientengelelektrophorese**

Zunächst wurden die gefetteten Kunststoffspacer auf eine Glasplatte aufgelegt und dann die zweite Glasplatte mit Aussparung für den Probenkamm angedrückt. Die Unterseite ist mit einem Kunststoffspacer mit Metallhülse abgeschlossen, durch die das Gradientengel zwischen die Glasplatten eingefüllt wurde. Die Platten wurden zusätzlich mit Metallklammern fixiert. Die so vorbereitete Gelplatte wurden dann in den Gießständer eingespannt und ein Silikonschlauch zum Befüllen über die Metallhülse geschoben, der über die Schlauchpumpe mit dem Gradientenmischer verbunden wurde. Danach wurde die Gellösungen mit der geringeren Prozentigkeit in die vordere Kammer des Gradientenmischer gefüllt und mit einem Rührfisch versehen. Die Gellösung mit der höheren Prozentigkeit wurde in die hintere Kammer gefüllt. Danach wurden die Lösungen mittels der Schlauchpumpe bis etwa 2 cm vom oberen Rand der Gelplatten gepumpt und dann der Silikonschlauch mittels Schlauchklemme verschlossen. Zur Polymerisation des Trenngels wurde die Geloberfläche mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach etwa 1 Stunde war das Gel auspolymerisiert. Für den Lauf eines nativen Gels wurden die Gele in eine Gelkammer von Hölzel (jetzt Spetec, Erding)

eingespannt und die Pufferreservoirs mit Laufpuffer (Lsg. VIII) befüllt. Der Probenkamm wurde entnommen und die Taschen befüllt. Die Proben mit einer Konzentration von 0.5-1 mg/ml wurden im Verhältnis 3:1 mit einer Bromphenolblau-Saccharoselösung gemischt. Pro zu erwartender Bande wurden etwa 3 µg Protein aufgetragen. Nach dem Beladen des Gels wurde bei 4°C im Kühlraum zunächst eine Spannung von 80 V für das Sammelgel angelegt. Nach dem Durchlaufen der Probe durch das Sammelgel wurde die Spannung für das Trenngel auf 100 V erhöht. Der Lauf war beendet, wenn die BPB-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, vorsichtig von den Glasplatten gelöst und für circa 1 Stunde in der Färbelösung (Lsg. IX) gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel zunächst kurz mit H₂O abgespült und dann in die Entfärbelösung eingelegt, bis der Hintergrund annähernd farblos war. Danach wurde das Gel entnommen, in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation gescannt.

2.7 Zweidimensionale Immungelektrophorese

• Lösungen

I. Veronalstammlösung

Für die Herstellung der Veronalstammlösung wurden zunächst 103 g Natriumveronal in 2 l H₂O gelöst. Danach wurden 20 g Veronal eingewogen, unter Erhitzen in H₂O gelöst und auf 5 l aufgefüllt.

II. Agaroselösung (1%-ig)

Hierfür wurden 2 g Agarose M [Amersham Pharmacia Biotech] in 40 ml Veronalstammlösung (Lsg. I) und 160 ml H₂O unter Aufkochen in Lösung gebracht, bis die Lösung klar erschien.

III. Laufpuffer

Für die Herstellung des Laufpuffers wurde die Veronalstammlösung (Pkt. I) 1:5 mit H₂O verdünnt.

IV. Waschlösung

Als Waschlösung diente eine 0.6%-ige - NaCl-Lösung. Zunächst wurde eine 6%-ige Stammlösung hergestellt. Hierfür wurden zunächst 60 g NaCl eingewogen und auf 1 l H₂O aufgefüllt. Für das Waschen der Gelbands wurde die Lösung 1:10 verdünnt (0.6%).

V. Färbelösung

Die Färbelösung besteht aus 0.5% Coomassie, 40% Methanol und 10% Eisessig. Es wurden 5 g Coomassie G 250 eingewogen und in 400 ml Methanol, 100 ml Eisessig und 500 ml H₂O gelöst.

VI. Entfärbelösung

Die Entfärbelösung bestand aus 40% Isopropanol, 10% Eisessig und 50% H₂O. Hierfür wurden 1000 ml Isopropanol, 250 ml Eisessig und 1250 ml H₂O gemischt.

VII. Antiseren

Die Antiseren für *Eurypelma*-Hämocyanin wurden von der Firma Charles River (Deutschland) bezogen. Für die Herstellung des Antiserums wurde Kaninchen 0.2 ml Hämocyanin (Oligomer, Dissoziat oder Untereinheiten) in 0.1 M Tris-HCl-Puffer pH 7.8 mit einer Konzentration von 1 mg/ml injiziert. Nach etwa 4 Wochen wurde der Antikörpertiter überprüft und gegebenenfalls wurden nochmal 0.2 ml Hämocyaninlösung injiziert. War der Titer hoch genug, wurden die Kaninchen unter Nembutalanästhesie durch Herzpunktion entblutet, die Festbestandteile durch Zentrifugation entfernt und das Serum bei -20°C gelagert.

• Durchführung der zweidimensionalen Immungelektrophorese

Für die 1. Dimension wurde die Agarose (Lsg. II) aufgekocht und davon 12 ml auf eine 6.5 x 15 cm-große gereinigte Glasplatte aufgebracht. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Glasplatte auf die entsprechende Schablone gelegt und die Löcher für die Probenaufgabe mittels speziell dafür präparierter Eppendorff-Pipettenspitzen ausgestanzt. Die Größe der Löcher richtete sich hierbei nach der aufzugebenden Probenmenge (4-20 µl). Die Probenmenge betrug je nach Titer des Antiseums etwa 1 µg pro zu erwartendem Gipfel. In die beiden äußeren Löcher wurden je 2 µl einer Bromphenolblaulösung aufgebracht.

Danach wurde die Gelplatte in eine Flachbettgelkammer Multiphor 2117 (LKB) gelegt. Die Probenlöcher liegen hierbei auf der Minuspoleseite. Dann wurden die beiden Pufferreservoirs der Laufkammer mit Laufpuffer (Lsg. III) gefüllt und die Platte beiderseits etwa 0.5-1 cm mit Filterpapier (Nr. 595, Schleicher und Schüll), welches als Pufferbrücke dient, bedeckt. Nach dem Schließen der Kammer wurde eine Spannung von 600 V angelegt. Der Lauf war beendet, wenn das Bromphenolblau nach etwa 30 min in das Filterpapier der gegenüberliegenden Seite eingelaufen war.

Für die zweite Dimension wurden zunächst mit je 2 ml Agaroselösung gefüllte Reagenzgläser (Lsg. II) auf etwa 90°C erhitzt und die Agarose verflüssigt. Nach

Beendigung der ersten Dimension wurde die Glasplatte aus der Kammer genommen und auf eine vorbereitete Schablone gelegt und die etwa 1 cm breiten Probenstreifen ausgeschnitten und auf eine Seite der 4.5 x 5 cm zugeschnittenen Gelbonds (Biozym Diagnostik GmbH) gelegt. Das Probenloch kam hierbei auf der rechten Seite zu liegen.

Dann wurde die Agaroselösung auf etwa 50°C abgekühlt, mit dem entsprechenden Antiserum (Pkt. VII) versetzt, gemischt und an den Gelstreifen der ersten Dimension angegossen.

Die Gelplättchen wurden dann nebeneinander in die Mitte der Flachbettgelkammer (LKB) gelegt und auf beiden Seiten etwa 0.5 cm mit Filterpapier (Nr. 595, Schleicher und Schüll), das wiederum als Pufferbrücke dient, bedeckt. Nach dem Schließen der Kammer wurde über Nacht eine Spannung von 300 V angelegt. Nach 12-18 Stunden war der Lauf beendet und die Gelplatten konnten herausgenommen und wie folgt gewaschen, getrocknet und gefärbt werden:

- 5 Minuten trocknen der Gelplättchen mit einer Lage Papiertüchern. Diese werden mit einer Glasplatte abgedeckt und mit Gewichten gepresst
- 10 Minuten wässern in 0.6%iger NaCl Lösung
- 5 Minuten trocknen
- 10 Minuten wässern in 0.6%iger NaCl Lösung
- 5 Minuten trocknen
- 10 min wässern in H₂O
- 5 Minuten trocknen

Danach wurden die Plättchen mit Stecknadeln auf eine Styroporplatte aufgesteckt und 15-20 Minuten mit einem Fön getrocknet. Hierauf erfolgte die Färbung für 5 Minuten im Färbebad (Lsg. V). Danach wurden die Gelplättchen mit H₂O abgespült und solange in der Entfärbelösung eingelegt, bis der Hintergrund möglichst vollständig entfärbt war. Nach nochmaligem Abspülen mit H₂O wurden sie auf die Styroporplatte aufgesteckt und mit dem Fön getrocknet.

2.8 Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Für die Berechnung der Konzentration aus der UV-Absorption bei 280 nm wird der molare Extinktionskoeffizient ϵ [$\text{ml} \cdot (\text{mg cm})^{-1}$] bei dieser Wellenlänge benötigt. Neben der Verwendung von Literaturwerten [Ellerton et al., 1970, Nickerson and van Holde, 1971, Ghiretti-Magaldi et al., 1966, Morimoto and Kegeles, 1971, Herskovits et al., 1981b, Loewe, 1978, Loewe and Linzen, 1973] (Tab.: 3.1), wurde der spezifische Extinktionskoeffizient $[\epsilon]$ mit drei verschiedenen Methoden bestimmt .

2.8.1 Bradford-Test

Für die Hämocyanine von *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas*, *Calappa granulata*, *Panulirus interruptus* und *Potamon potamios* wurde der Extinktionskoeffizient $[\epsilon]$ mit dem Bradford-Assay [Bradford,1976] der Firma Bio-Rad (München) bestimmt. Als Färbereagenz dient hierbei Coomassie G 250, welches in seiner anionischen Form einen Komplex mit reaktiven Gruppen des Proteins bildet, der bei 595 nm photometrisch detektiert werden kann [Compton and Jones 1985].

Als Eichprotein diente lyophilisiertes Rinderserumalbumin der Firma Bio-Rad, welches, gemäß des Standard-Assay-Protokolls (Bio-Rad), zu Konzentrationen zwischen 0.2 mg/ml und 1.4 mg/ml mit Tris-HCl Puffer pH 7.8 verdünnt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der Hämocyanine wurde für *Eurypelma californicum* ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1.1 \text{ ml (cm mg)}^{-1}$ [Loewe und Linzen, 1973] und für *Homarus americanus* von $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1.34 \text{ ml (cm mg)}^{-1}$ [Morimoto and Kegeles 1971] verwendet. Auch diese Proteine wurden in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Für die Messung wurde die benötigte Menge des Färbereagenz 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu 200 μl Probe wurden dann je 1 ml des verdünnten Färbereagenz hinzugegeben und die Lösung für etwa 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Messung der Proben erfolgte photometrisch bei 595 nm. Pro Probe wurden drei Ansätze vorbereitet und gemessen. Die Hämocyaninproben wurden mit einer OD bei 278 nm von etwa 0.5–0.6 eingesetzt. Aus den Mittelwerten der gemessenen OD_{595} -Werte wurden mittels der Geradengleichung der linearen Regression (Abb. 3.1) der verwendeten Standardproteine die jeweiligen Extinktionskoeffizienten errechnet.

2.8.2 Modifizierter Lowry-Test

Das Prinzip des Lowry-Tests (Pierce) beruht auf der Reaktion von Kupfer, welches in Form von Kupfersulfat-Ionen in alkalischer wässriger Lösung vorliegt, mit der Peptidbindung. Dieser Komplex reduziert Phosphormolybdat, welches der Lösung in Form des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugegeben wird. Hierbei wird Cu^{2+} , welches an das Protein gebunden ist, zu Cu^+ reduziert. Dieses reagiert dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und ergibt eine tiefblaue Färbung. Der Komplex kann bei 750 nm photometrisch detektiert werden. Die Modifikation des klassischen Lowry Assays liegt in einer speziellem Kupfer-Sulfat-Tartrat Lösung, welche zwei der drei Lösungen im klassischen Lowry-Protokoll ersetzt. Da Tris zu den Substanzen gehört, welche bei einer Konzentration von > 10 mM das Ergebnis verfälschen können [Rej at al., 1974], wurden die Proben in Ringerpuffer verdünnt.

Die Verdünnungen von BSA (Pierce Stammlösung; 2 mg/ml) und die des Hämocyanins wurden wie unter Punkt 2.8.1 beschrieben hergestellt. Das Folin-Ciocalteu- Reagenz wurde in Verhältnis 1:1 mit H_2O verdünnt. Für die Messung wurden 200 μl der Proteinlösung mit 1 ml des modifizierten Lowry-Reagenz versehen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 μl des Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzupipettiert und die Lösung für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben konnten dann bei 750 nm gegen Wasser gemessen werden. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der Hämocyanine erfolgte wie unter Punkt 2.8.1 beschrieben.

2.8.3 Verfahren von Scopes

Dieses Verfahren basiert, anders als die chemischen Assays von Bradford und Lowry, auf der Absorption der Proteinlösung bei 205 nm und 280 nm.

Die Beiträge der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zur gemessenen OD bei 205 und 280 nm sind hierbei abgeschätzt.

Nach Scopes [1974] ist der Extinktionskoeffizient von Tryptophan bei 205 nm 3.6 mal höher als der bei 280 nm, der von Tyrosin 4.6 mal. Vom durchschnittlichen Gehalt der beiden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in Proteinen ausgehend, wird der Beitrag zur Absorption von Tryptophan bei 280 nm dreimal so hoch angenommen wie der von Tyrosin [Reeck, 1970].

Hieraus ergibt sich das durchschnittliche Verhältnis der Absorption der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan im Protein bei 205 nm zu:

$$\frac{OD_{205}(Trp,Tyr)}{OD_{280}(Trp,Tyr)} = \frac{OD_{205}(Trp) + OD_{205}(Tyr)}{OD_{280}(Trp) + OD_{280}(Tyr)} = \frac{3.6 \times OD_{280}(Trp) + 4.6 \times OD_{280}(Tyr)}{OD_{280}(Trp) + OD_{280}(Tyr)} \quad (2.8.I)$$

Der Beitrag von Tryptophan kann nun durch den hypothetischen Beitrag von Tyrosin ersetzt werden:

$$\frac{(3 \times 3.6 \times OD_{280}(Tyr)) + (4.6 \times OD_{280}(Tyr))}{(3 \times OD_{280}(Tyr)) + OD_{280}(Tyr)} = \frac{(3 \times 3.6) + 4.6}{4} = 3.85 \quad (2.8.II)$$

man kann also schreiben:

$$\epsilon_{205} = \epsilon_{280}(Trp,Tyr) \times 3.85 + \epsilon_{205}(\text{Rest}) = \epsilon_{280} \times 3.85 + C \quad (2.8.III)$$

Der Wert C ist hierbei der Extinktionskoeffizient der Polypeptidkette im nativen Zustand inklusive des Beitrages der Aminosäuren Phenylalanin und Histidin, ohne die aromatischen Tryptophan und Tyrosin. Der empirisch ermittelte Wert für C ist 27 [Scopes, 1974].

Ausgehend von Glg. 2.8.III erhält man dann:

$$\epsilon_{205} = \frac{27.0}{1 - 3.85 \left(\frac{OD_{280}}{OD_{205}} \right)} \quad (2.8.IV)$$

Die Proteine, die von Scopes untersucht wurden, weisen ein ϵ_{205} von 31 mit einer Abweichung von wenigen Prozent auf. Dieser Wert ergibt sich aus der Mittelung der Extinktionskoeffizienten für eine Auswahl an Proteinen, die einen großen Bereich an Tryptophan- und Tyrosingehalten abdecken [Scopes, 1974].

Der Wert ϵ_{280} errechnet sich aus:

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{205} \times (OD_{280}/OD_{205}) \quad (2.8.V)$$

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten eines unbekanntes Proteins werden die Werte der Absorption bei 205 nm und 280 nm gemessen und die jeweiligen Extinktionskoeffizienten mittels der Formel 2.8.IV bzw. 2.8.V berechnet.

Da der verwendete Tris-Puffer mit einer Konzentration von 0.1 M bei 205 nm eine bereits sehr hohe Absorption aufweist, wurden die Proben gegen einen niedriger konzentrierten 0.02 M Tris-HCl-Puffer dialysiert. Die verschiedenen Hämocyane wurden jeweils in mehreren Verdünnungen eingesetzt.

2.9 Bestimmung des Brechungsindex-Inkrement

Das Brechungsindex-Inkrement $[dn/dc]$ wurde mit einem Scanning-Michelson-Interferometer [Becker, et al., 1995] am Institut für Physikalische Chemie in der Abteilung von Prof. Dr. Schmidt bestimmt (Abb. 2.3).

Das Scanning-Interferometer arbeitet mit einem He/Ne-Laser bei 632.8 nm. Der Laserstrahl wird durch einen Beamsplitter geteilt. Ein Teil des Strahles wird durch die Probenzelle geleitet und erfährt durch das optisch dichtere Medium eine Phasenverschiebung. Beide Laserstrahlen werden durch Spiegel reflektiert und die Intensität der zwei interferierenden Laserstrahlen von einer Photodiode gemessen. Um den Phasenunterschied zu bestimmen, wird ein Spiegel über einen Piezokristall um $\lambda/2$ auf und ab bewegt. Die Intensität der beiden interferierenden Laserstrahlen wird typischerweise an 40 verschiedenen Positionen des Spiegels von der Diode gescannt. Trägt man das Diodensignal gegen die Piezospannung auf erhält man eine Schwingungsperiode.

Die Phasendifferenz Φ zwischen zwei Laserstrahlen ist durch den Wellenvektor des Laserlichtes ($k=2\pi/\lambda$) und durch die optische Weglängendifferenz s der beiden Interferometerarme gegeben:

$$\Phi = 2ks \quad (2.9.I)$$

Die Messung der Konzentrationsabhängigkeit bei konstanter Temperatur und konstantem Druck ist somit einfach, da der Brechungsindex n die einzige Größe ist, die sich verändert:

$$d\Phi = 2kl \, dn \quad (2.9.II)$$

l = Schichtdicke der Probe

Das Brechungsindexinkrement dn/dc bei konstanter Temperatur und konstantem Druck ergibt sich somit nach Becker et al. [1995] zu:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{p,T} = (2kl)^{-1} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial c}\right)_{p,T} \quad (2.9.III)$$

Abb. 2.3 zeigt den schematischen Aufbau des Scanning-Michelson-Interferometers.

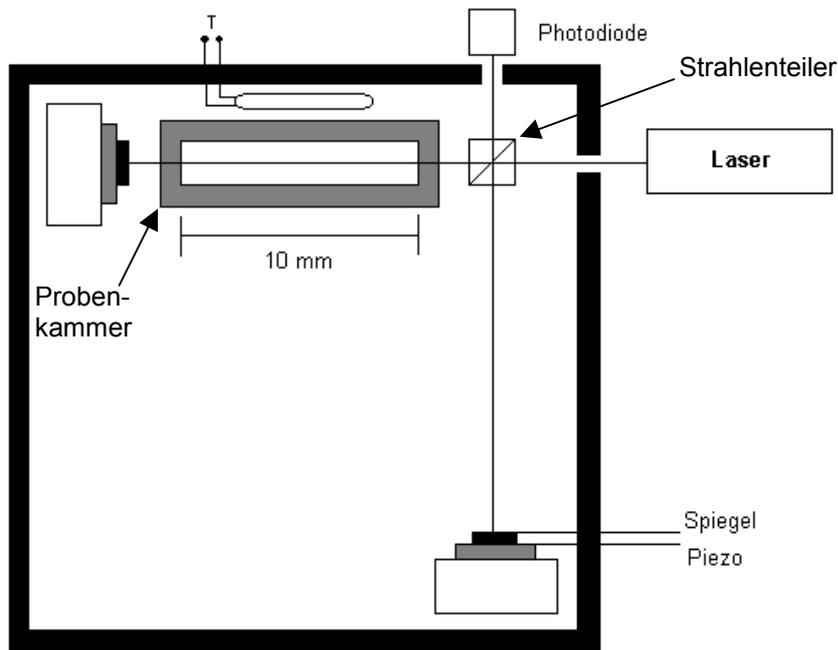


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Scanning Michelson Interferometers.

T: Temperatursteuerung [nach Becker et al., 1995].

Zur Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementes der verschiedenen Hämocyanine wurden die Phasenverschiebungen für Hämocyanin-Konzentrationen zwischen 0.5 und 6 mg/ml gemessen. Jede Konzentration wurde dreimal in die Probenzelle injiziert und das Signal von der Photodiode etwa 2-3 Minuten gemessen, bis sich ein Plateauwert gebildet hatte. Zwischen den Ansätzen wurde Puffer injiziert, um eine jeweils unabhängige Baseline zu erhalten.

2.10 Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropodenhämocyanin

2.10.1 Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung

Im Rahmen der Bestimmung des Dissoziationsgrades und des Molekulargewichtes von Arthropodenhämocyaninen wurde die Methode der elastischen Lichtstreuung verwendet. Die Lichtstremessungen wurden mit einem Dawn DSP Laser Lichtstreuphotometer der Firma Wyatt Technology [Deutschland] durchgeführt.

2.10.1.1 Theorie der Lichtstreuung

Neben der Absorption erfährt Licht beim Durchstrahlen einer Probe auch eine Abschwächung durch Lichtstreuung. Hierbei spielen verschiedene physikalische Phänomene wie Brechung, Beugung und Reflexion eine Rolle, die den ursprünglichen Lichtstrahl von seinem Weg ablenken. Bleibt die Wellenlänge beim Streuvorgang gleich, spricht man von elastischer Lichtstreuung.

- **Elastische Lichtstreuung**

Bei der elastischen Lichtstreuung erregt der elektrische Feldvektor E einer linear polarisierten Welle in einem Streuer eine erzwungene Sinusschwingung der Elektronenwolke. Die "Leichtigkeit" mit der diese Verschiebung der Elektronenwolke stattfindet, wird mit der Polarisierbarkeit α ausgedrückt. Konsequenz dieser Verschiebung ist ein zeitabhängiges elektrisches Dipolmoment μ .

Das elektrische Feld einer Lichtwelle E lässt sich beschreiben als:

$$E = E_0 \cos \left(2\pi\nu \left(t - \frac{X}{c} \right) \right) \quad (2.10.I)$$

Glg. 2.10.I : E_0 : maximale Amplitude der elektrischen Feldstärke; X : Ausbreitungsrichtung; $2\pi\nu$: Kreisfrequenz des Lichtes; c : Lichtgeschwindigkeit; t : Zeit.

Betrachtet man die Änderung des elektrischen Feldes E am Streuzentrum ($x=0$) mit der Zeit t so gilt:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (2.10.II)$$

Bei Teilchen, deren Größe deutlich kleiner als die Lichtwellenlänge ist, stellt diese oszillierende Ladung einen Hertz'schen Dipol mit charakteristischem Abstrahlungsmuster dar.

Nach der Maxwell'schen Theorie gilt für die elektrische Feldstärke E des gestreuten Lichtes in der Entfernung r (Punkt r auf der Achse r mit einem Winkel Φ zum elektrischen Dipol μ) [Schmidt, 1994]:

$$E_r = \left(\frac{\alpha E_0 4 \pi^2 \sin \Phi}{r \lambda^2} \right) \cos 2 \pi \nu (t - r / c) \quad (2.10.III)$$

Die Streulichtintensität $[I_s]$ ergibt sich aus dem Quadrat der Amplitude. Bezieht man diese auf die Intensität des einfallenden Lichtes $[I_0]$, so erhält man die Rayleigh-Gleichung:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{E_r^2}{E_0^2} = \frac{\left(\frac{\alpha E_0 4 \pi^2 \sin \Phi}{r \lambda^2} \right)^2}{E_0^2} = \frac{16 \pi^4 \alpha^2 \sin^2 \Phi}{r^2 \lambda^4} \quad (2.10.IV)$$

Aus der Rayleighgleichung ist zu ersehen, daß die Streuintensität mit dem Quadrat der Entfernung $[r]$ und mit der vierten Potenz der Wellenlänge $[\lambda]$ abnimmt. Ferner hängt die Streustrahlung $[I_s]$ nur von $\sin^2 \Phi$ und nicht vom Azimuthwinkel θ ab.

- **Molekulargewichtsbestimmung**

Betrachtet man eine ideale Lösung unabhängiger Teilchen ohne Wechselwirkung, ist die Polarisierbarkeit $[\alpha]$ dieser Teilchen über die Clausius-Mosotti-Gleichung mit dem Brechungsindex n verknüpft:

$$n^2 - 1 = 4 \pi N \alpha \quad (2.10.V)$$

Glg. 2.10.V: N : Anzahl der gelösten Moleküle

Durch Umformen und Auflösen nach α erhält man:

$$\alpha = \frac{(n + n_0)}{4\pi} * \frac{(n - n_0) C}{C N} \quad (2.10.VI a)$$

Glg. 2.10.VIa: n_0 : Brechungsindex des Lösungsmittels; C : Konzentration des gelösten Stoffes (g cm^{-3})

Durch die Einführung der Konzentration des gelösten Stoffes C (g cm^{-3}) und des Brechungsindexinkrements $n-n_0/C \approx dn/dc$ und unter der Ausnutzung der Tatsache, das $C/N=M/A$ und $n+n_0 \approx 2n_0$ ergibt sich:

$$\alpha = \frac{n_0}{2\pi} \left(\frac{dn}{dc} \right) \frac{M}{A} \quad (2.10.VI b)$$

Glg. 2.10VIb: M: Molekulargewicht; A: Avogadrokonstante.

Setzt man Gleichung (2.10.VI b) in die Rayleigh-Gleichung (2.10.IV) ein (modifiziert für unpolarisiertes Licht) erhält man den Streuteil I_s für einen Partikel:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 M^2}{\lambda^4 r^2 A^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.10.VII)$$

Für N Partikel erhöht sich die Streuintensität um $N = C \cdot A / M$:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 M (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2 A} * C \quad (2.10.VIII)$$

Weiterhin ist das Rayleigh-Verhältnis ist definiert durch:

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_0} * \frac{r^2}{1 + \cos^2 \theta} \quad (2.10.IX)$$

Die Abkürzung K, die alle optischen Konstanten zusammenfaßt, lautet:

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{A \lambda^4} \quad (2.10.X)$$

Für eine ideale Lösung, in der die Moleküle keine Wechselwirkung untereinander haben, erhält man dann:

$$R_\theta = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{A \lambda^4} * M * C = K * M * C \quad (2.10.XI)$$

daraus folgt für das Molekulargewicht in einer für Lichtstreuung typischen Schreibweise :

$$\frac{1}{M} = \frac{KC}{R_\theta} \quad (2.10.XII)$$

2.10.1.2 Auswertung der Lichtstreudaten

Zur Abschätzung der Molekülgröße dient der sogenannte Gyrationradius $[R_G]$, der den mittleren quadratischen Abstand der Massenpunkte eines Moleküls vom Molekülschwerpunkt darstellt. Er beschreibt somit die Massenverteilung im Molekül und hängt von dessen Form und Größe ab.

$$R_G^2 = \frac{\sum_i m_i r^2}{\sum_i m_i} = \frac{1}{2N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N R_{ij}^2 \quad (2.10.XIII)$$

mit m_i = Masse eines Elements i und dem Abstand r vom Massenschwerpunkt des Partikels.

Für die verwendeten Hämocyanine konnte der Gyrationradius aufgrund ihrer im Verhältnis zur Wellenlänge geringen Größe ($\ll 1/20 \lambda$) allerdings nicht bestimmt werden.

Zur Auswertung der Lichtstreudaten wurde die Methode von Debye verwendet, bei der man R_θ/K^*c gegen $\sin^2\theta/2$ aufträgt. Der Ausdruck $\sin^2\theta/2$ rührt von der Lichtstreuung an größeren Teilchen her, wo keine isotrope Streuung mehr vorliegt. In diesem Fall kommt es zu Interferenzen der Streustrahlung. Um diese Interferenzen zu berücksichtigen, wird ein sogenannter Formfaktor $P(\theta)$ eingeführt. Für $P(\theta)$ gilt näherungsweise [Schmidt, 1994]:

$$P(\theta) \cong 1 - \frac{h^2}{6N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N R_{ij}^2 \quad (2.10.XIV)$$

mit $h = 4\pi/\lambda \sin \theta/2$, N = Anzahl der Teilchen; und R_{ij} = Abstand zwischen zwei beliebigen Streuzentren.

Bezieht man den Formfaktor $P(\theta)$ in Gleichung 2.10.XII zur Bestimmung des Molekulargewichtes mit ein, so ergibt sich:

$$\frac{Kx C}{R_\theta} = \frac{1}{P_\theta} \times \frac{1}{M} \quad (2.10.XV)$$

bezieht man weiterhin Gleichung 2.10.XIV mit ein, so erhält man:

$$\frac{K * C}{R_\theta} = \left(1 + \frac{16\pi^2 R_G^2}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right) \times \frac{1}{M} \quad (2.10.XVI)$$

2.10.1.3 Aufbau und Meßprinzip des Laser-Lichtstreuphotometers

Das Lichtstreuphotometer DAWN DSP der Firma Wyatt verfügt über einen He/Ne-Laser [632.8 nm]. Die Flußzelle, durch die die Proben im Batch-Modus injiziert (Pkt. 2.10.1.7) bzw. im GPC-Modus gepumpt werden (Pkt. 2.10.1.8), ist parallel zum Laserstrahl angeordnet. Die Lichtstreuintensitäten werden von 18, im Kreis um die Flußzelle angeordneten Photodioden registriert, wie Abb. 2.4 und Tab. 2.2 deutlich machen.

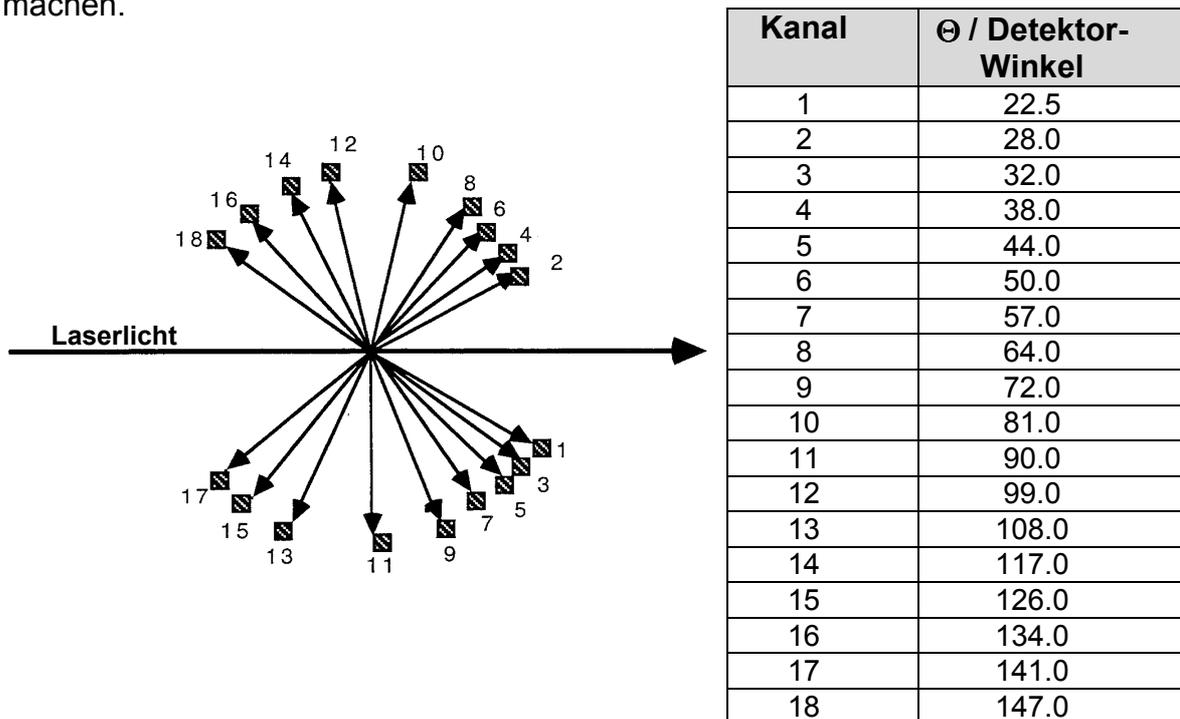


Abb. 2.4 / Tab 2.2: Anordnung und dazugehörige Winkel der Detektoren um die Flußzelle des Laser-Lichtstreuphotometers.

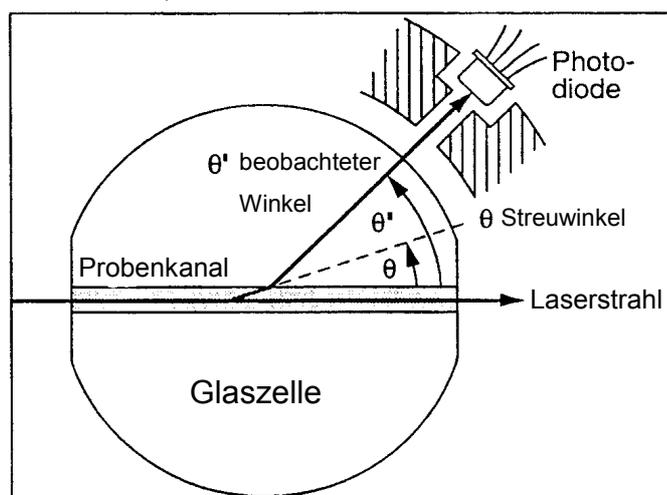


Abb. 2.5: Schematische Aufsicht auf die Flußzelle

Flüssigkeits-Glas-Grenzflächen und das von einer Probe gestreute Laserlicht [nach Wyatt Technology Corporation].

2.10.1.4 Eichung und Normalisierung der Detektoren

Die winkelabhängige Lichtstreuung wird wie unter Punkt 2.10.1.1 beschrieben durch das Rayleigh-Verhältnis bestimmt. Unter Einbeziehung des Streuvolumens in der Flußzelle des Dawn DSP (Wyatt Instruction Manual) ergibt sich dies zu:

$$R_{\theta} = \frac{I_{\theta} r^2}{I_0 V} \quad (2.10.XVII)$$

wobei I_{θ} die Intensität des gestreuten Lichtes, I_0 die einfallenden Lichtes ist. V stellt das Streuvolumen und r den Abstand des Streuvolumens vom Detektor dar.

Bei der Untersuchung von Lösungsmittel und darin gelösten Stoffen interessiert das sogenannte `Excess`-Rayleigh-Verhältnis:

$$R_{\theta} = \frac{(I_{\theta} - I_{\theta, \text{Lösungsmittel}}) * r^2}{I_0 V} \quad (2.10.XVIII)$$

Die Eichung des Laser-Lichtstreuphotometers erfolgt zunächst für den 90°-Detektor mit Toluol. Das Rayleighverhältnis für reines Toluol bei 632.8 nm ist $1.406 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. Die Kalibration mit Toluol ergibt eine Kalibrationskonstante, die von der verwendeten Flußzelle und dem Lösungsmittel abhängt.

$$R_{90} = A_{CSCC} \left(\frac{V_{90} - V_{90, \text{dunkel}}}{V_{\text{Laser}} - V_{\text{Laser, dunkel}}} \right) \quad (2.10.XIX)$$

V_{90} und $V_{90, \text{dunkel}}$ bezeichnet die Detektor-Signalspannung bzw. den Dunkel-Offset und V_{Laser} und $V_{\text{Laser, dunkel}}$ das Signal des Laser-Monitors bei angeschaltetem bzw. ausgeschaltetem Laser in Volt.

Um nach einer Eichung mit Toluol trotzdem mit anderen Lösungsmitteln messen zu können, wird diese in eine spezifische Kalibrationskonstante umgewandelt, welche nur eine Funktion des Gerätes und der Flußzellegeometrie darstellt. Hier gehen die Brechungsindizes des Glases und des verwendeten Lösungsmittels ein.

Aus der konfigurationsspezifischen Kalibrationskonstanten (A_{CSCC}) ergibt sich dann die instrumentelle Kalibrationskonstante wie folgt:

$$A_{CSCC} = A_{\text{inst}} \left(\frac{n_s n_g}{F} \right) \quad (2.10.XX)$$

n_s und n_g stellen die Brechungs-Indizes des Lösungsmittels und des Glases dar. F steht für den Fresnel-Faktor (Glg. 2.10.XXI), der die Verluste durch Reflexion an den verschiedenen Grenzflächen darstellt.

Der Fresnel-Faktor ist wie folgt definiert:

$$F = \left[1 - \left(\frac{n_g - n_s}{n_g + n_s} \right)^2 \right]^2 \left[1 - \left(\frac{n_g - 1}{n_g + 1} \right)^2 \right] \quad (2.10.XXI)$$

Um die übrigen Detektoren, die produktionsbedingt ihre eigene Sensitivität und geometrischen Faktoren besitzen, auf den 90°-Detektor beziehen zu können, muß eine sogenannte Normalisierung erfolgen. Diese wird mit einem isotropen Streuer (R_θ unabhängig vom Streuwinkel) durchgeführt. Hierzu verwendet man entweder ein Dextran (80 kD) oder monomeres Rinderserumalbumin (A1900) der Firma Sigma-Aldrich. Für die Normalisierung gilt dann:

$$R_\theta = N_\theta A_{CSCC} \left(\frac{V_\theta - V_{\theta, \text{Baseline}}}{V_{\text{Laser}} - V_{\text{Laser, dunkel}}} \right) \quad (2.10.XXII)$$

N_θ ist der Normalisierungskoeffizient bei dem entsprechenden Winkel. Für $N = 90^\circ$ gilt der Wert 1. In Abb. 2.6 ist das Ergebnis einer Normalisierung im Debye-Plot aufgetragen. Die Werte R_θ/K^*C die man für jeden Winkel erhält, werden hier gegen $\sin^2\theta/2$ aufgetragen. Gibt man vor, daß die gemessene Streuung isotrop ist, also keine Winkelabhängigkeit vorliegt, so besitzt die Gerade die Steigung 0. Extrapoliert man nach $\theta=0$ und erhält man R_θ/K^*c bzw. das Molekulargewicht (Glg. 2.10.XII, 2.10.XIV)

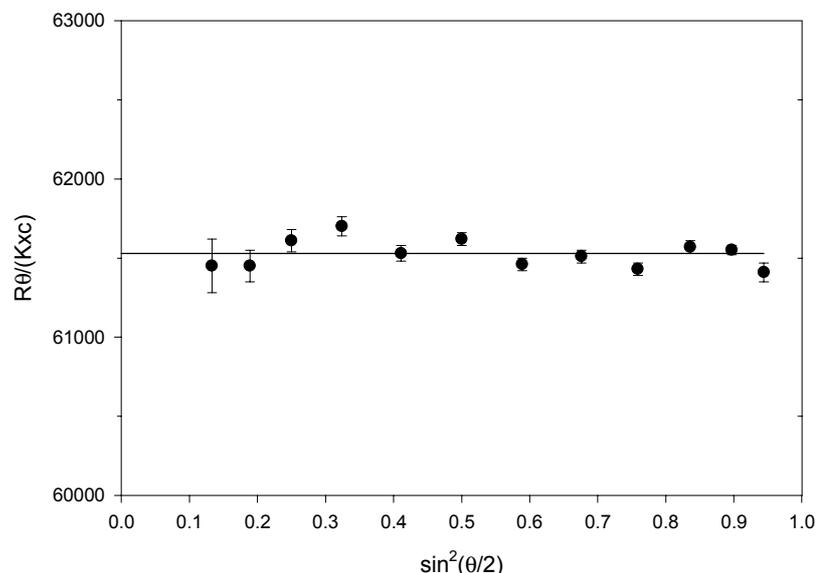


Abb 2.6: Debye-Plot für Rinderserumalbumin.

Diese Messung diente zur Angleichung (Normalisierung) der verschiedenen Detektoren an den 90° Detektor (Pkt. 2.10.1.1). Die Fehlerbalken stellen den experimentellen Fehler dar, welcher durch das Signal-Rausch-Verhältnis zustande kommt.

Die Detektoren 1 (22.5°) und 2 (28.0°) sind bei Messungen mit Wasser als Lösungsmittel aufgrund des Brechungsindex prinzipiell nicht verwendbar, da hier Totalreflexion an der Wasser-Glas-Grenzfläche vorliegt (Abb. 2.4, Tab 2.2). Die weitere Einbeziehung kleiner Winkel (Abb. 2.4, Tab. 2.2) richtete sich nach dem Signal/Rausch-Verhältnis. Es zeigte sich, daß die Winkel 3-7 (Pkt.: 2.10.1.3 Abb. 2.4; Tab. 2.2) aufgrund des zum Teil sehr ungünstigen Signal zu Rausch-Verhältnisses häufig nicht für die Berechnung des Molekulargewichtes verwendet werden konnten.

2.10.1.5 Berechnung der Konzentration und des Molekulargewichts

Detektiert man die Konzentration der Proben ausschließlich mit einem UV-Vis-Detektor ist es notwendig, für die Auswertung der Lichtstreudaten eine Kalibrationskonstante zu errechnen, die die Kalibrationskonstante des vorgesehenen RI-Detektors ersetzt:

$$B_{UV,effektiv} = \frac{dn/dc}{\epsilon * l} B_{UV} \quad (2.10.XXIII)$$

$B_{UV,effektiv}$: errechnete Kalibrationskonstante; B_{UV} : gemessene OD bei 280 nm.

Die mit Lichtstreuung bestimmten Molekulargewichte stellen jeweils das Massenmittel über den mittels GPC eluierten Proteinpeak dar:

$$M_w = \frac{\sum(c_i M_i)}{\sum c_i} \quad (2.10.XXIV)$$

c_i und M_i stellen die Konzentration bzw. die Molekulargewichte der Proteine jeweils eines Datenpunktes dar.

- **Messungen im Batch-Modus**

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurde der Aggregationsgrad des Hämocyanins unter der Einwirkung von GdnHCl untersucht. Die Messungen wurden im Batchmodus durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit einer 1 ml Spritze über einen 0.2 µm Anotop Plus Filter der Firma Whatman in die Flußzelle injiziert. Die Werte für die Korrektur des Brechungsindex ΔN wurden aus Nozaki und Tanford [1963, 1970] entnommen. Die Konzentration der Hämocyanine betrug 0.1 mg/ml.

- **Messungen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)**

Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurde das Lichtstreuophotometer im GPC-Modus betrieben. Für die Auftrennung der Proben war dem Lichtstreuophotometer ein ECR 3215 Degasser, eine HPLC-Pumpe HP 1100 von Hewlett Packard und eine Superose 6 HR 10/30 Size Exclusion Säule (Amersham Pharmacia Biotech) vorgeschaltet. Die Puffer wurden mit einem Anodisc 25/0.02 µm Inline-Membranfilter (Millipore) filtriert.

Die für die Molekulargewichtsbestimmung notwendige Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines UV-Vis-Detektors 1806 (Bio-Rad, München), der dem Lichtstreuophotometer vorgeschaltet war.

2.10.2 Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Bei der im Jahr 1987 von Michael Karas und Franz Hillenkamp entwickelten Technik, der sogenannten Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Time of Flight [MALDI-TOF], werden die zu analysierenden Moleküle in einer Matrix eingebettet und durch kurze Laserpulse (N₂-Laser; 337 nm) aus dem Matrixverband herausgelöst und dabei ionisiert. Die hohe Anregungsenergie relaxiert in extrem kurzer Zeit [etwa 100 ns] in das Festkörpergitter [Vertes et al., 1993] und führt zur Ausdehnung und letztlich zum Phasenübergang. Die so ionisierten Teilchen werden durch ein elektrostatisches Feld auf einige keV beschleunigt und durchlaufen nach dem Verlassen dieser Quelle eine feldfreie Driftstrecke.

Als Detektor dient ein sogenannter Sekundärelektronenvervielfacher mit einer vorgeschalteten Konversionsdynode und eine Vielkanal-Platte. Die Auftrennung der Teilchen erfolgt durch das Masse /Ladungsverhältnis:

$$m/z = (2 e U / L^2) t^2$$

m=Masse des Ions; z=Ladungszahl; e=Elementarladungszahl; U=Beschleunigungsspannung; L = Länge der feldfreien Driftstrecke; t=Flugzeit

Die Messungen wurden unter Leitung von Dr. Michael Maskos am Institut für Physikalische Chemie in der Abteilung von Prof. Schmidt mit dem Massenspektrometer ToFSpec SE der Firma Micromass durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einem N₂-UV-Laser, der einen 4 ns Puls bei einer Wellenlänge von 337 nm erzeugt. Die Energie eines Pulses beträgt hierbei 180 Mikrojoule. Die Beschleunigungs-

spannung betrug 20 kV. Die Messungen wurden im linearen Modus durchgeführt, in dem die Ionen eine 1.5 m lange feldfreie Strecke zum Detektor durchfliegen. Die Massenkalisierung des Gerätes erfolgte mit BSA. Sie ergab für das doppelt geladene Molekül $[M^{2+}]$ 33.230,2 Da und für das einfach geladene $[M^+]$ 66.233,6 Da. Damit ergibt sich gegenüber dem mittleren Molekulargewicht von 66.432,3 Da [Micromass] eine Abweichung von +0.04% für das doppelt geladene und von +0.3% für das einfach geladene Molekül.

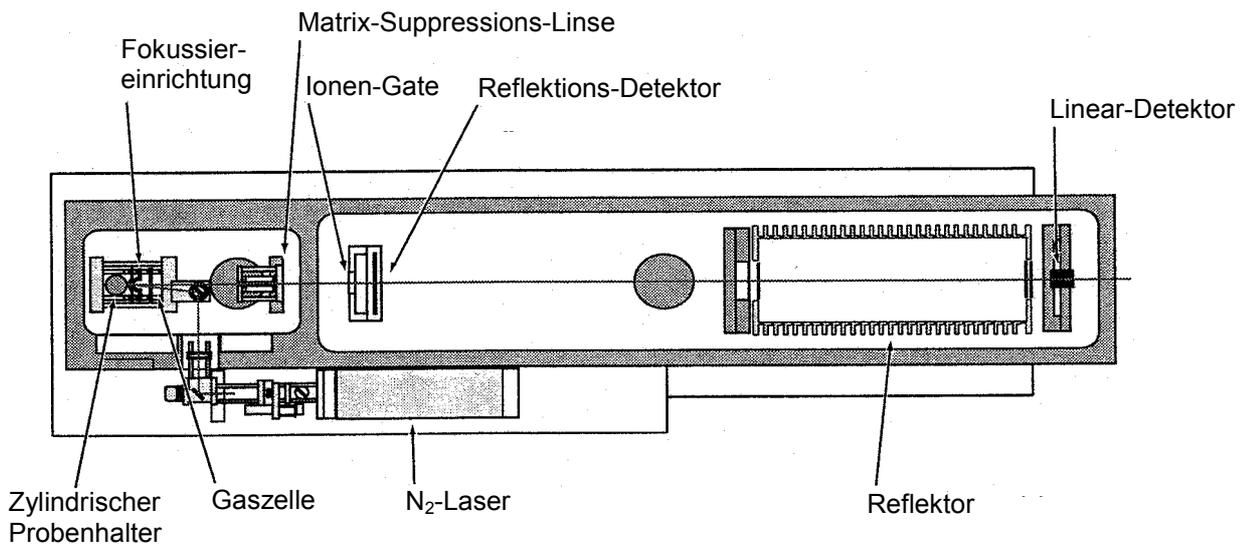


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Geometrie des ToFSpec SE von Micromass.

Als Matrix diente die für Proteine gängige 3,5 Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sinapinsäure). Für die Herstellung einer übersättigten Lösung wurden 10 mg Sinapinsäure in einer H_2O /Acetonitril-Mischung (60/40, Vol/Vol) mit 0.1% Trifluor-Essigsäure gelöst. Von dieser übersättigten Lösung wurde der Überstand verwendet. Es wurden Hämocyanin-Proben in 0.05 M Glycin-OH-Puffer, 1 mM EDTA, pH 9.6 und gegen H_2O dialysiert verwendet. Die Konzentration des Hämocyanins betrug zwischen 0.8 und 1 mg/ml.

Die Hämocyanin-Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit der Matrixlösung gemischt und danach wenige Mikroliter auf den Edelstahlträger aufgebracht. Durch Verdampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur werden die Proteine in den kristallinen Festkörper der Matrix eingebaut.

2.11 Durchführung der Denaturierungsexperimente

Die Stabilitätsuntersuchungen des 24-meren Hämocyanins wurden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer mit 5 mM CaCl_2 und MgCl_2 bei pH 7.8 durchgeführt. Die Konzentrationen betragen, je nach verwendeter Methode, 0.05-0.4 mg/ml. Im Falle der aufgereinigten Untereinheit \underline{e} erfolgten die Experimente in 0.05 M GlyOH Puffer mit 5 mM EDTA bei pH 9.6. Die Konzentrationen der Untereinheit \underline{e} betragen 0.05-0.2 mg/ml. Als Absorptionskoeffizient ϵ_{278} [$\text{ml} (\text{cm} \cdot \text{mg})^{-1}$] diene 1.1 [Loewe and Linzen, 1973]. Die spektroskopischen Messungen erfolgten nach 4 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden Inkubationszeit im Denaturierungsmittel.

2.11.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsmessungen wurden mit einem Spektralphotometer U-3000 der Firma Hitachi durchgeführt. Das Gerät war mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Bei dem Thermostaten handelte es sich um ein Colora WK 1000. Als Probengefäße dienten Halbmikroküvetten der Firma Hellma (Deutschland).

2.11.2 Fluoreszenzspektroskopie

• Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Hitachi F-4500 Fluoreszenz Spectrometer, ausgestattet mit einem thermostatisierbaren Küvettenhalter, durchgeführt. Der Detektor war standardmäßig in einem Winkel von 90° zum Anregungslicht angeordnet. Die Spaltbreite des Excitationsmonochromators betrug 5 nm, die des Emissionsmonochromators 2.5 nm. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen von 280 nm und 295 nm gewählt und das Emissionsspektrum zwischen 290 nm und 490 nm, bzw. 305 nm und 490 nm gemessen.

Ein Problem bei Fluoreszenzmessungen kann das Auftreten der Absorption der Anregungs- und der Reabsorption emittierter Strahlung, der sogenannte Innere-Filter-Effekt darstellen [Schmidt, 1994]. Um ihn zu vermeiden, wurde die Konzentration der Proben mit 0.05 mg/ml gering gehalten. Sämtliche Spektren wurden gegen die Raman-Streuung des Wassers korrigiert.

• **Fluoreszenzanisotropie**

Für die Bestimmung der Anisotropie strahlt man zunächst vertikal polarisiertes Licht auf eine Probe und mißt das emittierte Fluoreszenzlicht im rechten Winkel zum Anregungslicht durch einen Polarisationsfilter. Ist der Polarisationsfilter parallel zum anregenden Licht, erhält man $I_{||}$, ist er senkrecht dazu orientiert, erhält man die Intensität I_{\perp} . Die Anisotropie ist definiert als :

$$A = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.11.I)$$

Der Emissionsmonochromator weist eine unterschiedliche Empfindlichkeit für die beiden Polarisationsrichtungen auf. Zur Korrektur muß vor der Messung, der sogenannte Gitterfaktor bestimmt werden.

Hierzu benutzt man horizontal polarisiertes Anregungslicht. Die horizontal und die vertikal polarisierte Komponente des emittierten Lichtes sind jeweils proportional zu I_{\perp} , weil beide Orientierungen senkrecht zur Polarisation der Anregung sind. Die Unterschiede, die man so mißt, müssen gerätespezifisch sein. Für den Gitterfaktor gilt:

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = G \quad (2.11.II)$$

mit I=Intensität, H=horizontal, V=vertikal. Der erste Index bezeichnet jeweils das Anregungs-, der zweite das Emissionslicht.

Die Anisotropie ist dann gegeben durch:

$$A = \frac{I_{||} - GI_{\perp}}{I_{||} + 2GI_{\perp}} \quad (2.11.III)$$

Bereits bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm beginnt ein Abweichung des horizontalen Verlaufs der Anisotropie aufgrund des Wasser Raman-Peaks, die mit zunehmender Excitationswellenlänge zunimmt. Deshalb wurde eine Anregungswellenlänge von 290 nm gewählt, die Emission wurde bei 335 nm detektiert.

Zunächst wird die Fluoreszenzintensität der Proben bei vier verschiedenen Orientierungen der der Anregungs- (Ex) und der Emissions-Polarisationsfilter (Em) gemessen: $Ex_v Em_v$; $Ex_v Em_h$, $Ex_h Em_h$ und $Ex_h Em_v$ (h=horizontal; v = vertikal). Zur Korrektur des Untergrundes wird der Puffer gemessen: $Ex_v Em_v$; $Ex_v Em_h$ und abgezogen. Nach der Bestimmung des Gitterfaktors konnte die Anisotropie nach Formel 2.12.III bestimmt werden.

2.11.3 Berechnung des Förster-Transfers zwischen Tryptophanen und dem oxygenierten aktiven Zentrum

Der Fluoreszenzenergietransfer der Anregungsenergie zwischen einem Donor und Akzeptor läuft strahlungslos ab und ist das Ergebnis von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

Die Transferrate hängt vom Grad der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und der Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor und deren Entfernung zueinander ab [Lakovicz, 1986].

Für die Berechnung des Förstertransfers ist somit die Kenntnis mehrerer Größen notwendig.

- **Theorie**

Das Überlappungsintegral J ist definiert als:

$$J = \frac{\int \text{FI} \cdot \varepsilon \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int \text{FI} \cdot d\lambda} \quad (2.11.IV)$$

FI (λ) = Fluoreszenzintensität

ε (λ) = spezifischer Extinktionskoeffizient

λ = Wellenlänge

Zur die Bestimmung des Überlappungsintegrals [J] wurden jeweils Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Probe gemessen.

Der Försterabstand R_0 ist definiert als [van der Meer, 1994]:

$$R_0^6 = \frac{8,79 \times 10^{-5}}{10^6} \cdot \frac{J \kappa^2 \Phi_0}{n^4} \quad (2.11.V)$$

J = Überlappungsintegral

κ^2 = Orientierungsfaktor

n = Brechungsindex

Der Wert $\kappa^2 = 2/3$ repräsentiert den statistischen Mittelwert des Orientierungsfaktors der Übergangsdipolmomente bei einer statistischen Verteilung der Donor-Akzeptorpaare. Da der Brechungsindex (n) für Hämocyanine nicht bekannt ist, wurde ein für Proteine typischer Wert von $n=1.4$ angenommen [van der Meer, 1994].

Die Quantenausbeute Φ_0 eines Fluorophors ist definiert als:

$$\Phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_R} \quad (2.11.VI)$$

wobei k_F und k_R die Übergangsraten für die Fluoreszenz und alle übrigen Prozesse darstellen, die für eine Entvölkerung des angeregten Zustandes verantwortlich sind.

Für die Quantenausbeute eines Fluorophors nach Löschung durch Förstertransfer gilt [Dewey und Hammes, 1980]:

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{1 + \left(\frac{R_0}{r}\right)^6} \quad (2.11.VII)$$

Φ_0 = Quantenausbeute im ungelöschten Zustand

Φ = Quantenausbeute im gelöschten Zustand

R_0 = Förster-Abstand

r = Abstand von Donor zu Akzeptor

Im Falle eines oligomeren Proteins, wo mehrere Donoren (D) von mehreren Akzeptoren (A) gelöscht werden können, erhält man :

$$\langle \Phi \rangle = \frac{1}{D} \sum_i^D \frac{\Phi_0}{1 + \sum_j^A \left(\frac{R_0}{r_{ij}}\right)^6} \quad (2.11.VIII)$$

$i = 1 - D$; $j = 1 - A$; r_{ij} = Abstand zwischen Donor i und Akzeptor j .

Diese Herleitung basiert auf der Gleichheit jeweils jedes Donors und jedes Akzeptors. Dies bedeutet, daß die ungelöschte Quantenausbeute Φ_0 und der Försterabstand R_0 konstant sind.

- **Bestimmung der Abstände der Tryptophane zu den aktiven Zentren**

Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades und der hohen Sequenzhomologie von Arthropodenhämocyaninen [Voit et al, 2000] wurden die Abstände der Tryptophane (r_i) zu den aktiven Zentren (r_{ij}) für das Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* auf Basis der Röntgenstruktur von Untereinheit II des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* bestimmt [1lla.pdb, Hazes et al., 1993; 1oxy.pdb, Magnus et al., 1994]. Um die homologen Positionen der Tryptophane bei *Limulus polyphemus* zu bestimmen, wurde das Sequenzalignment der Untereinheiten von *Eurypelma*

californicum mit Untereinheit II von *Limulus polyphemus* aus Voit et al. (2000) herangezogen. Es wurden jeweils die Abstände zwischen den C_{δ2}-Atomen und der Mitte der Kupfer-Atome zwischen den aktiven Zentren bestimmt. Für die Tryptophane, die gegenüber Untereinheit II von *Limulus polyphemus* nicht konserviert sind, wurden zur Bestimmung der Abstände die Seitenketten der Aminosäuren an den homologen Positionen übernommen.

In der Struktur der oxygenierten Untereinheit II von *Limulus polyphemus* fehlen die Aminosäuren 18-32, da sie in einem Loopbereich der Untereinheit liegen und infolgedessen mittels Röntgenstruktur nicht aufgelöst werden konnten. Für Tryptophan 30 von Untereinheit g von *Eurypelma californicum* konnte so nicht die Seitenkette des in Voit et al. [2000] alignierten Histidins 30 für die Abstandsbestimmung verwendet werden, sondern die von Arginin 33.

2.12 CD-Spektroskopie

Messungen des Circular dichroismus wurden mit einem CD-Spectrophotometer CD 6 von Jobin Yvon bei 20°C durchgeführt. Die Spektren wurden in 0.5 nm Schritten zwischen 200 nm und 260 nm aufgenommen. Die Integrationszeit pro Datenpunkt betrug 1 Sekunde, die Bandbreite des Doppelmonochromators 2 nm. Für die Messungen der Denaturierung des 24-meren Hämocyanins wurde eine Küvette mit 0.1 cm Kantenlänge benutzt. Die Konzentration des oligomeren Hämocyanins betrug 0.2 mg/ml. Für die Messung der Denaturierung von Untereinheit e wurde eine Spezialküvette von 0.01 cm verwendet, um das Probenvolumen und die Schichtdicke möglichst klein zu halten. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.4 mg/ml. Sämtliche Spektren wurden jeweils um den Pufferwert korrigiert.

2.13 `Differential-Scanning`-Kalorimetrie

Die Temperaturstabilitätsmessungen der Hämocyanine wurde im Labor von Dr. Doris Vollmer (AG Prof. Dr. Schmidt, Inst. für Physikalische Chemie, Universität Mainz) mit einem VP-DSC Mikro-Kalorimeter der Firma Microcal durchgeführt.

• **Aufbau des VP-DSC Mikrokalorimeters**

Das VP-DSC ist ein hochempfindliches Kalorimeter, das die Verwendung geringer Probenmengen erlaubt. Es besitzt zwei münzförmige Probenzellen aus Tantalum 61 mit einem Volumen von etwa 0.5 ml, die von einem zylindrischen, adiabatischen Mantel umgeben sind. Abb. 2.8 zeigt den schematischen Aufbau des Kalorimeters.

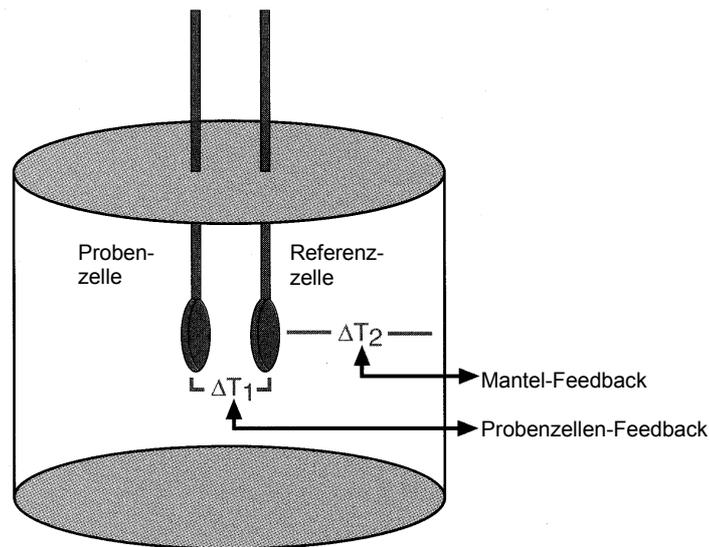


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau des VP-DSC von MicroCal

Die Proben und Referenzzelle werden kontinuierlich aufgeheizt. Findet eine temperaturinduzierte Reaktion der Probe statt, so kommt es zu einer Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Referenzzelle.

Die Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Referenzzelle mißt ein thermoelektrisches Element. Ein weiteres thermoelektrisches Element mißt die Temperaturdifferenz zwischen Zellen und Mantel. Durch Aufheizen der Proben- und Referenzzelle kommt es zu einer temperaturinduzierten Reaktion der Probe. Zur Kompensation der Temperaturdifferenz (ΔT_1 , Abb. 2.8) erfolgt eine Erniedrigung bzw. Erhöhung des Heizstromes.

Das Integral der Wärmemenge über die Messzeit, das benötigt wird um $\Delta T_1=0$ zu halten (Abb. 2.8), ist ein Maß für die gesamte Wärmemenge der Reaktion in den Zellen. Für DSC-Messungen mit wässriger Lösung über 100°C besitzt das VP-DSC ein Druck-System, welches Drücke bis zu 35 psi erlaubt.

- **Durchführung der Temperaturdenaturierungen**

Die Hämocyaninproben wurden für die Messungen zunächst gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Die Konzentration des Hämocyanins betrug in der Regel 1 mg/ml. Im Falle der Experimente mit 24-merem Hämocyanin in GlyOH Puffer wurde die Probe kurz vor der Messung im Verhältnis 1:9 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, um eine vorzeitige Dissoziation zu verhindern. Die Konzentration betrug hier 0.13 mg/ml. Die Heizrate bei den Messungen betrug 60°C/h.

Vor jeder Messung mit Hämocyanin wurde zunächst eine Messung mit dem entsprechenden Puffer durchgeführt, um eine Basislinie zu erhalten. Nach Messungen, bei denen das Protein aggregierte, mußten die Zellen intensiv gespült werden. Hierzu wurde entweder das Detergenz DECON 90 (Zinser Analytic GmbH, Frankfurt) oder bei größeren Verschmutzungen HNO₃ verwendet.

Die Daten [cal/min] wurden um den jeweiligen Pufferwert korrigiert und das Signal auf die Heizrate normalisiert [cal/°C]. Dies erfolgte mit dem Programm `Origin für DSC`.

- **Auswertung der Messungen**

Aus der Wärmekapazitätsfunktion (Cp(T)) der Proteine können, nach Abziehen der Basislinie von der Meßkurve, folgende thermodynamische Größen bestimmt werden: die Entfaltungstemperatur (T_m), die Wärmekapazität des gefalteten und des entfalteten Proteins (Cp, ΔCp) und die Reaktionsenthalpie (H_{cal}) der Entfaltung.

Die Halbumwandlungstemperatur (T_m) entspricht hierbei der Temperatur am Peakmaximum. Die Reaktionsenthalpie (ΔH_{cal}) der Entfaltung entspricht der Fläche des kalorimetrischen Peaks. Hierfür gilt:

$$\Delta H^{cal} = \int \Delta C_p * \partial T$$

Bei der Denaturierung der Hämocyaninproben konnte durch die Irreversibilität der Denaturierungen allerdings keine weitergehende thermodynamische Analyse vorgenommen werden. Die Anwendung des Lumry und Eyring Models [Lumry und Eyring, 1954), das von Sanches-Ruiz et al. [1988] zur Analyse irreversibler Denaturierung vorgeschlagen wurde, bezieht die Abhängigkeit der Denaturierung von der Scan-Rate mit ein, die im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurde. So wurden aus den Wärmekapazitätsverläufen (Cp) lediglich die Denaturierungstemperatur T_m entnommen.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung der Molekulargewichte mittels Lichtstreuung ist die genaue Kenntnis der Konzentration der Probe. Diese kann im Durchflußbetrieb (Pkt. 2.10.1.5) entweder durch einen Refraktionsindex- oder einen UV-Vis-Detektor ermittelt werden. Bei meinen Lichtstremessungen wurde die Konzentration anhand der Absorption der Hämocyanine bei 280 nm ermittelt. Für die Berechnung der Konzentration aus der UV-Absorption bei 280 nm wird der spezifische Extinktionskoeffizient (ϵ) bei dieser Wellenlänge benötigt. Dieser ist für einige Hämocyanine bereits bestimmt worden (Tab. 3.1). Da die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung einen großen Einfluß auf die aus den Lichtstreudaten errechneten Molekulargewichte hat (Glg. 2.10.XII), wurden die spezifischen Extinktionskoeffizienten der verwendeten Hämocyanine mit drei verschiedenen Methoden bestimmt.

Species	ϵ [ml * (cm*mg) ⁻¹]	λ [nm]	Referenz
Crustacea			
<i>Carcinus maenas</i>	1.42	280	[1]
	1.24	280	[2]
<i>Homarus americanus</i>	1.34	278	[3], [4]
<i>Panulirus interruptus</i>	1.38	280	[5]
Chelicerata			
Merostoma			
<i>Limulus polyphemus</i>	1.39	280	[1]
Arachnida			
<i>Eurypelma californicum</i>	1.10	278	[6]

Tab. 3.1: Extinktionskoeffizienten der Arthropodenhämocyanine aus der Literatur.

Die Extintionskoeffizienten wurden jeweils mit verschiedenen Methoden ermittelt. [1] Nickerson and van Holde, 1971; [2] Richelli et al., 1980; [3] Morimoto and Kegeles, 1971; [4] Herskovits et al., 1981b; [5] Antonini et al., 1983; [6] Loewe and Lintzen, 1973.

3.1.1 Bradford-Test

Für die Hämocyanine von *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Calappa granulata*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas*, *Potamon potamios* und *Panulirus interruptus* wurden die Extinktionskoeffizienten mit dem Bradford-Assay der Firma Bio-Rad (München) bestimmt [Bradford,1976].

Als Eichproteine dienten Rinderserumalbumin und die Hämocyanine von *Eurypelma californicum* und *Homarus americanus* (Abb. 3.1).

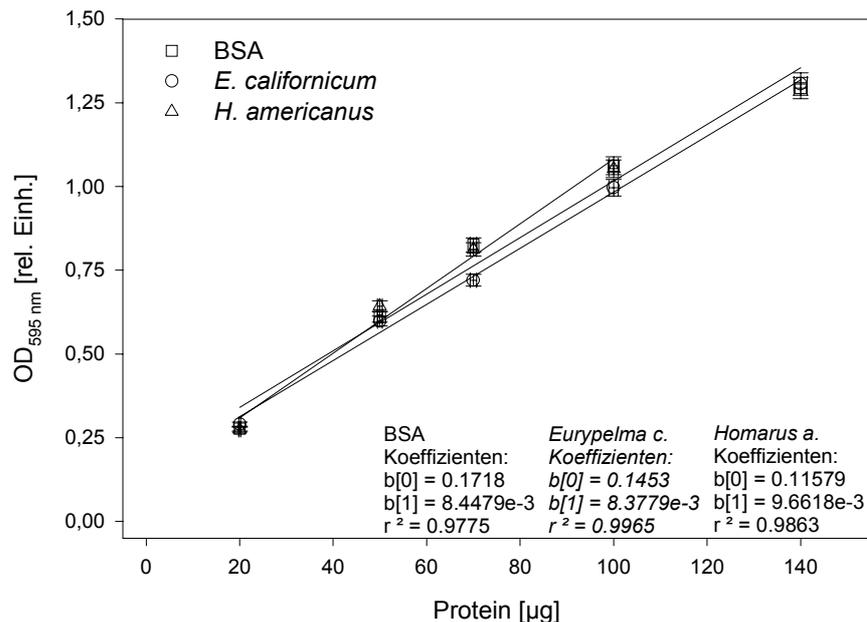


Abb. 3.1: Eichgeraden des Bradford-Assays (Bio-Rad) der drei als Standard verwendeten Proteine BSA (Bio-Rad), Hämocyanin von *Eurypelma californicum* und *Homarus americanus*.

Die OD bei 595 nm ist gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die relativ kleinen Fehler setzen sich aus dem Pipettierfehler, und dem Rauschen des OD Signals zusammen.

Die Ergebnisse in Tabelle 3.2 zeigen, daß die Unterschiede zwischen BSA und den zusätzlich als Eichproteinen verwendeten Hämocyaninen bei der angewendeten Standard-Assay-Prozedur bezüglich der OD_{595} maximal bei $\pm 6\%$ liegen. Die größte Abweichung gegenüber BSA zeigt das Hämocyanin von *Eurypelma californicum*.

Spezies	ϵ_{280} [ml (cm*mg) ⁻¹]:		
	BSA*	<i>E. californicum</i> *	<i>H. americanus</i> *
<i>A. astacus</i>	1.32 ± 0.13	1.24 ± 0.12	1.36 ± 0.12
<i>A. leptodactylus</i>	1.20 ± 0.09	1.13 ± 0.09	1.25 ± 0.09
<i>C. granulata</i>	1.22 ± 0.06	1.15 ± 0.06	1.26 ± 0.05
<i>C. pagurus</i>	1.23 ± 0.06	1.16 ± 0.07	1.28 ± 0.07
<i>C. maenas</i>	1.24 ± 0.07	1.17 ± 0.06	1.28 ± 0.07
<i>P. interruptus</i>	1.19 ± 0.05	1.12 ± 0.04	1.24 ± 0.05
<i>P. potamios</i>	1.25 ± 0.09	1.17 ± 0.08	1.29 ± 0.08

Tabelle 3.2: Spezifische Extinktionskoeffizienten (ϵ) der verschiedenen Arthropoden-Hämocyanine, ermittelt mit dem Bradford-Assay (Bio-Rad).

*: Als Standardproteine wurden BSA und die Hämocyanine von *E. californicum* und *H. americanus* verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens vier Messungen.

Die mit dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* als Eichprotein errechneten Extinktionskoeffizienten liegen durchweg etwa 6% unter den mit BSA als Eichprotein errechneten Werten. Die Ergebnisse, die mit der Eichgerade des Crustaceen-hämocyanin von *Homarus americanus* errechnet wurden, liegen dagegen zwischen 3% und 4% über den mit BSA errechneten Werten. Innerhalb einer Art unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten um bis zu 10%.

3.1.2 Modifizierter Lowry-Test

Für die Hämocyanine von *Astacus astacus*, *Calappa granulata*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas* und *Potamon potamios* wurde der Extinktionskoeffizient zusätzlich mit dem modifizierten Lowry-Assay der Firma Pierce (Rockford, USA) bestimmt [Lowry, 1951]. Auch hier dienten Rinderserumalbumin und die Hämocyanine von *Eurypelma californicum* und *Homarus americanus* als Eichproteine (Abb. 3.2).

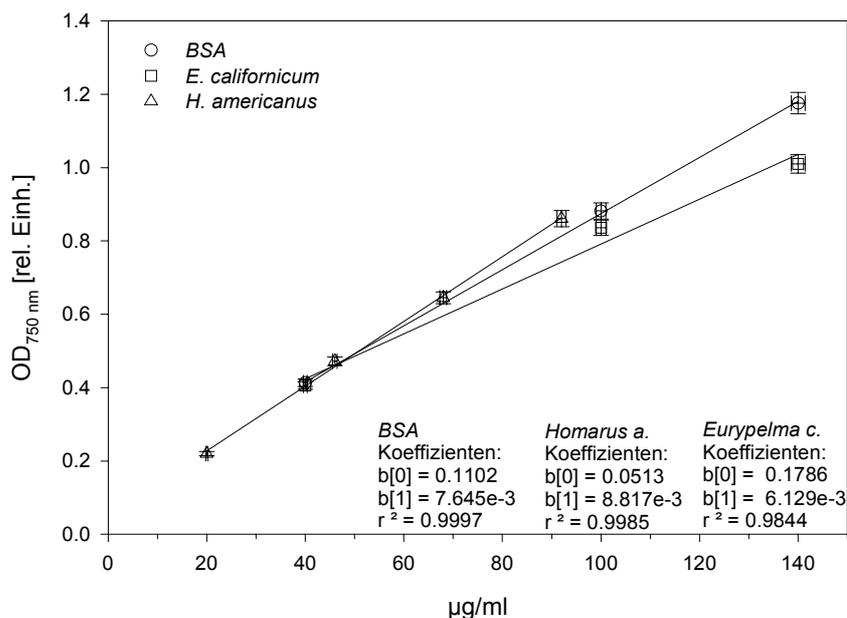


Abb. 3.2: Eichgeraden des modifizierten Lowry-Assays (Pierce) der drei als Standard verwendeten Proteine BSA (Bio-Rad), Hämocyanin von *Eurypelma californicum* und *Homarus americanus*.

OD bei 750 nm aufgetragen gegen die Proteinkonzentration der drei Standardproteine. Die Fehler setzen sich aus dem Pipettierfehler, und dem Rauschen des OD Signals zusammen.

Spezies	ϵ_{280} [ml (cm*mg) ⁻¹]		
	BSA*	<i>E. californicum</i> *	<i>H. americanus</i> *
<i>A. astacus</i>	1.43 ± 0.04	1.28 ± 0.04	1.47 ± 0.04
<i>C. granulata</i>	1.43 ± 0.06	1.28 ± 0.05	1.47 ± 0.06
<i>C. pagurus</i>	1.34 ± 0.03	1.20 ± 0.02	1.38 ± 0.03
<i>C. maenas</i>	1.40 ± 0.03	1.26 ± 0.03	1.43 ± 0.03
<i>P. potamios</i>	1.35 ± 0.02	1.21 ± 0.02	1.38 ± 0.02

Tabelle 3.3: Spezifische Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Arthropoden-Hämocyanine, ermittelt mit dem modifizierten Lowry-Assay (Pierce).

*: Als Standardproteine wurden BSA und die Hämocyanine von *E. californicum* und *H. americanus* verwendet. Angegeben die Mittelwerte und Standardabweichungen, denen jeweils eine Dreifachbestimmung zugrundeliegt.

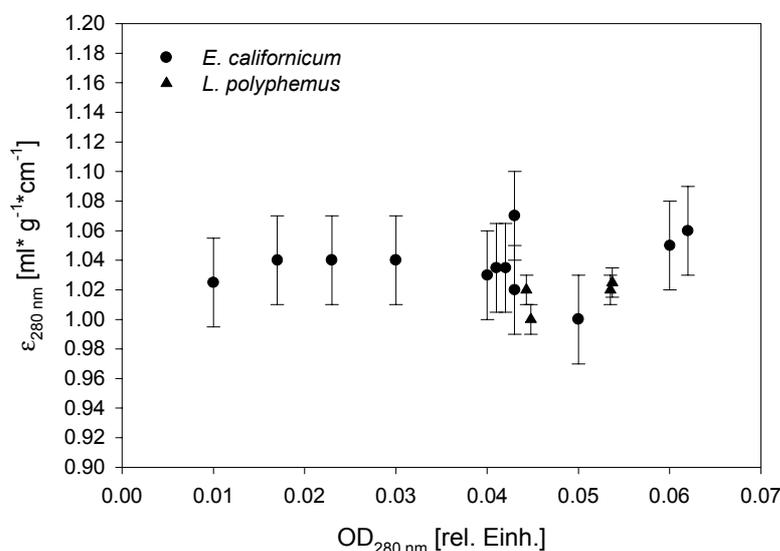
Auch im modifizierten Lowry Assay liegen die mit dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* als Eichprotein errechneten Extinktionskoeffizienten deutlich unter den Werten, die mit BSA ermittelt wurden (Tab. 3.3). Sie liegen um durchschnittlich 10% niedriger. Die mit dem Hämocyanin von *Homarus americanus* errechneten Extinktionskoeffizienten sind den mit BSA errechneten Werten sehr ähnlich und liegen lediglich um 2-3% höher. Innerhalb einer Art schwanken die Extinktionskoeffizienten um bis zu 13%.

Vergleicht man die Ergebnisse beider Protein-Assays so zeigt sich, daß die mit *H. americanus* als Eichprotein errechneten Extinktionskoeffizienten des modifizierten Lowry-Assays zwischen 4% (*P. potamios*) und 12% (*C. granulata*) über denen des Bradford-Assays liegen. Mit BSA als Eichprotein liegen die Werte mit Ausnahme derer für *A. astacus* und *P. potamios* um bis zu 10% höher. Die mit dem Hämocyanin aus *E. californicum* errechneten Werte sind in beiden Assays niedriger als die jeweils mit BSA und *H. americanus* ermittelten Extinktionskoeffizienten.

3.1.3 Verfahren von Scopes

Die spektroskopische Methode von Scopes [1974] basiert auf der Absorption der Proteine bei 205 nm und 280 nm.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Hämocyanine wurde mit mehreren Verdünnungen durchgeführt. Die OD_{205} lag hierbei zwischen 0.4 und 1.8, die OD_{280} zwischen 0.012 und 0.017 (Abb. 3.3). Höher konzentrierte Lösungen konnten aufgrund der sehr hohen OD bei 205 nm nicht verwendet werden.



A

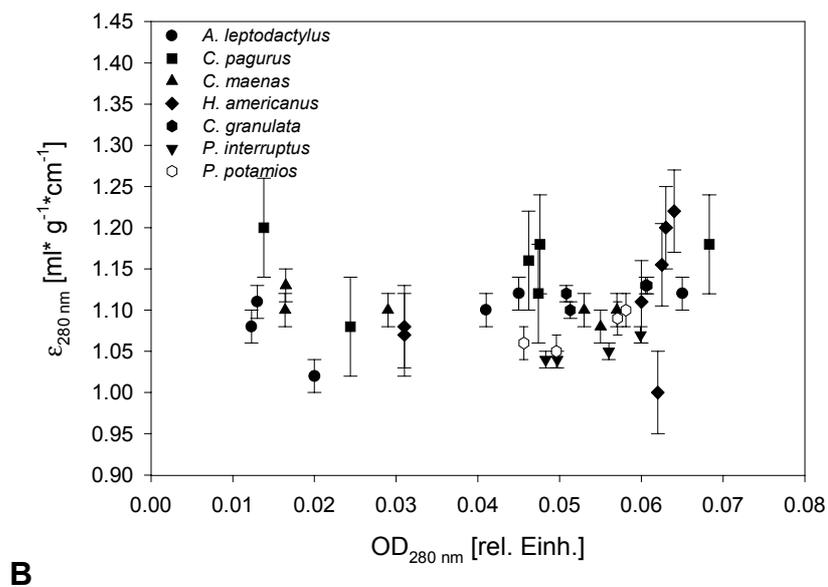


Abb. 3.3: Gemessene OD bei 280 nm aufgetragen gegen das hieraus errechnete ϵ [$\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{cm}^{-1})^{-1}$] der Hämocyanine von *Eurypelma californicum*, *Limulus polyphemus* (A) und verschiedener Crustaceen-Hämocyanine (B), bei verschiedenen Konzentrationen.

Aufgetragen sind die Mittelwerte aus mindestens vier Messungen. Die Fehlerbalken stellen jeweils die Standardabweichung dar.

Spezies	ϵ_{205} [$\text{ml} (\text{cm} \cdot \text{mg})^{-1}$]	ϵ_{280} [$\text{ml} (\text{cm} \cdot \text{mg})^{-1}$]
Chelicerata		
<i>E. californicum</i>	31.1 ± 0.1	1.04 ± 0.03
<i>L. polyphemus</i>	31.2 ± 0.1	1.02 ± 0.01
Crustacea		
<i>A. leptodactylus</i>	30.9 ± 0.2	1.11 ± 0.02
<i>C. granulata</i>	31.5 ± 0.1	1.12 ± 0.01
<i>C. pagurus</i>	31.6 ± 0.2	1.15 ± 0.06
<i>C. maenas</i>	31.5 ± 0.1	1.11 ± 0.02
<i>H. americanus</i>	31.4 ± 0.2	1.15 ± 0.05
<i>P. interruptus</i>	31.3 ± 0.1	1.05 ± 0.01
<i>P. potamios</i>	31.4 ± 0.1	1.08 ± 0.02

Tabelle 3.4: Spezifische Extinktionskoeffizienten (ϵ) der verschiedenen Arthropoden-Hämocyanine, ermittelt mit der Methode von Scopes [1974]

Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens vier Messungen und die Standardabweichung.

Die mit der Methode von Scopes [1974] errechneten Extinktionskoeffizienten liegen mit Ausnahme dessen für das Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* um bis zu 25 % niedriger als die mit den chemischen Protein-Assays ermittelten Werte (Tab. 3.4). Auch gegenüber den für die Crustaceen-Hämocyanine aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten (Tab. 3.1) liegen sie deutlich niedriger.

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

Spezies	Bradford ϵ_{280}	Lowry mod. ϵ_{280}	Scopes ϵ_{280}	Literatur ϵ_{280}
Chelicerata				
<i>E. californicum</i>	EP*	EP*	1.04 ± 0.03	1.10 [6]
<i>L. polyphemus</i>	-	-	1.02 ± 0.01	1.39 [1]
Crustacea				
<i>A. astacus</i>	1.30 ± 0.06	-		
<i>A. leptodactylus</i>	1.19 ± 0.06	1.38 ± 0.10	1.11 ± 0.02	
<i>C. granulata</i>	1.21 ± 0.06	1.38 ± 0.10	1.12 ± 0.01	
<i>C. pagurus</i>	1.22 ± 0.06	1.29 ± 0.09	1.15 ± 0.06	
<i>C. maenas</i>	1.23 ± 0.06	1.35 ± 0.09	1.11 ± 0.02	1.42 [1]
<i>H. americanus</i>	EP*	EP*	1.15 ± 0.05	1.34 [2, 3]
<i>P. interruptus</i>	1.18 ± 0.06	-	1.05 ± 0.01	1.38 [4]
<i>P. potamios</i>	1.23 ± 0.06	1.30 ± 0.09	1.08 ± 0.02	

Tab. 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der ϵ -Bestimmung mit verschiedenen Methoden.

Angegeben ist jeweils die Mitte und relative Größe des Intervalls der mit drei verschiedenen Standardproteinen bestimmten Extinktionskoeffizienten des Bradford- und des Lowry-Assays sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier Messungen der Werte von Scopes-Verfahrens. *: Im Assay als Eichprotein verwendet.

3.2 Bestimmung des Brechungsindex-Inkrement

Das Brechungsindex-Inkrement (dn/dc) ist neben dem spezifischen Extinktionskoeffizient (ϵ) eine weitere wichtige Größe, die in die Berechnung der Molekulargewichte eingeht. Deshalb wurden neben der Verwendung von Literaturwerten die Brechungsindex-Inkrementen für die Hämocyanine der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und der Crustaceen-Arten *Homarus americanus*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas* und *Astacus leptodactylus* mit einem Scanning-Michelson Interferometer vorgenommen.

Hierzu wurden die Phasenwinkel (ϕ) mit dem Scanning-Michelson-Interferometer bei verschiedenen Hämocyaninkonzentrationen gemessen (Pkt. 2.9) und zur Bestimmung von dn/dc gegen die Konzentration des gelösten Stoffes aufgetragen [Abb. 3.4; Becker et al., 1995].

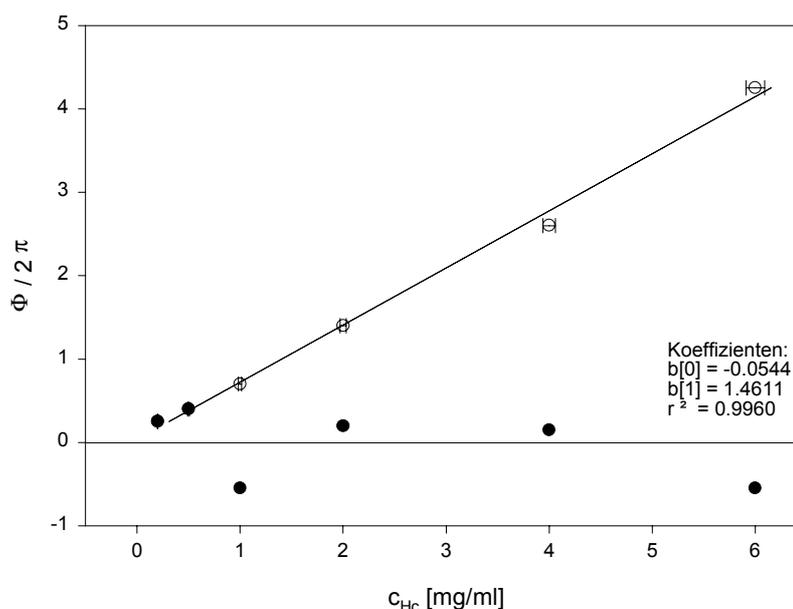


Abb. 3.4: Phasenwinkel in Abhängigkeit der Konzentration des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Die Messung erfolgte in 0.1 M Tris-Puffer mit 5 mM $CaCl_2$ und $MgCl_2$ bei pH 7.8. Die geschlossenen Symbole (●) stellen die gemessenen Phasenwinkel dar. Die offenen Symbole (○) erhält man durch Hinzufügen von ganzzahligen Vielfachen von 2π zu den gemessenen Werten. Diese Punkte werden für die lineare Regression verwendet, um dn/dc zu erhalten [Becker et al., 1995].

In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der dn/dc-Bestimmung der Hämocyanine in verschiedenen Puffern dargestellt.

Hämocyanin	dn/dc [L/g]				Puffer
	Literatur	Bradford	Lowry	Scopes	
<i>E. californicum</i>	0.181*	-	-	0.170	0.05 M Na-Phosphat, pH 7.5 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8
	0.182*	-	-	0.171	
<i>H. americanus</i>	0.197*	-	-	0.169	0.05 M Na-Phosphat, pH 7.5 0.05 M Na-Phosphat, pH 7.5
	0.198*	-	-	0.170	
<i>A. leptodactylus</i>	-	0.208	-	0.187	0.1 M Tris-HCl, pH 7.8
<i>C. pagurus</i>	-	0.208	0.219	0.183	0.1 M Tris-HCl, pH 7.8
<i>C. maenas</i>	0.238	0.220	0.240	0.186	0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8
	0.208				

Tab. 3.6: Brechungsindex-Inkrementen [dn/dc] des Hämocyanins von *E. californicum* und von verschiedenen Crustaceen-Hämocyaninen in unterschiedlichen Puffern.

Für die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Hämocyaninlösungen wurden für *E. californicum* und *H. americanus* die Extinktionskoeffizienten aus der Literatur [Loewe und Linzen, 1973; Morimoto und Kegeles, 1971], dem Bradford- und Lowry-Assay und dem spektroskopischen Verfahren von Scopes verwendet. Die Temperatur betrug 20°C und der pH lag je nach verwendetem Puffer zwischen 7.5 und 7.8.

Die Brechungsindex-Inkrementen liegen, je nach verwendetem Extinktionskoeffizienten und Tierart, zwischen 0.170 und 0.240 und zeigen somit eine große Streuung (Tab 3.6).

Die für die Crustaceenhämocyanine bestimmten Brechungsindex-Inkrementen liegen mit einer Ausnahme deutlich über dem des 24-meren Cheliceratenhämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*, das mit 0.181 bzw. 0.170 bestimmt wurde (Tab. 3.6). Das für das Hämocyanin von *Homarus americanus* bestimmte Brechungsindex-Inkrement liegt mit 0.198 um 10% über dem Literaturwert von 0.180 [Herkovits et al., 1981], obwohl zur Bestimmung der Konzentration der gleiche Extinktionskoeffizient verwendet wurde [Morimoto and Kegeles, 1971]. Verwendet man zur Konzentrationsbestimmung den Extinktionskoeffizienten des Scopes-Assays, liegen die Werte mit 0.170 bzw. 0.171 gut 5% unter dem Literaturwert.

Auffällig ist, daß die Brechungsindex-Inkrementen der Hämocyanine von *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus* und *Carcinus maenas* mit bis zu 33% (Tab. 3.6) weit

über dem Literaturwert des Crustaceenhämocyanins von *Homarus americanus* [Herkovits et al., 1981] liegen. Allerdings wurden diese Werte jeweils aus Einzelmessungen ermittelt. Aufgrund der großen Menge an Protein von etwa 60 mg, die für eine einzelne Messung benötigt wurde, wurden diese nicht wiederholt.

Die Brechungsindex-Inkrementen der Crustaceen-Hämocyanine, bei denen die Konzentrationen mit dem Extinktionskoeffizienten des Scopes-Assays ermittelt wurden, zeigen die beste Übereinstimmung mit dem Literaturwert von *Homarus americanus* [Herskovits et al, 1981]. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß die mit diesem Verfahren ermittelten Extinktionskoeffizienten um bis zu 25% unter entsprechenden Werten aus der Literatur und den mit colorimetrischen Assays ermittelten Werten liegen (Tab. 3.5). So errechnen sich dementsprechend höhere Hämocyaninkonzentrationen, die wiederum zu niedrigeren dn/dc -Werten führen (Pkt. 2.9).

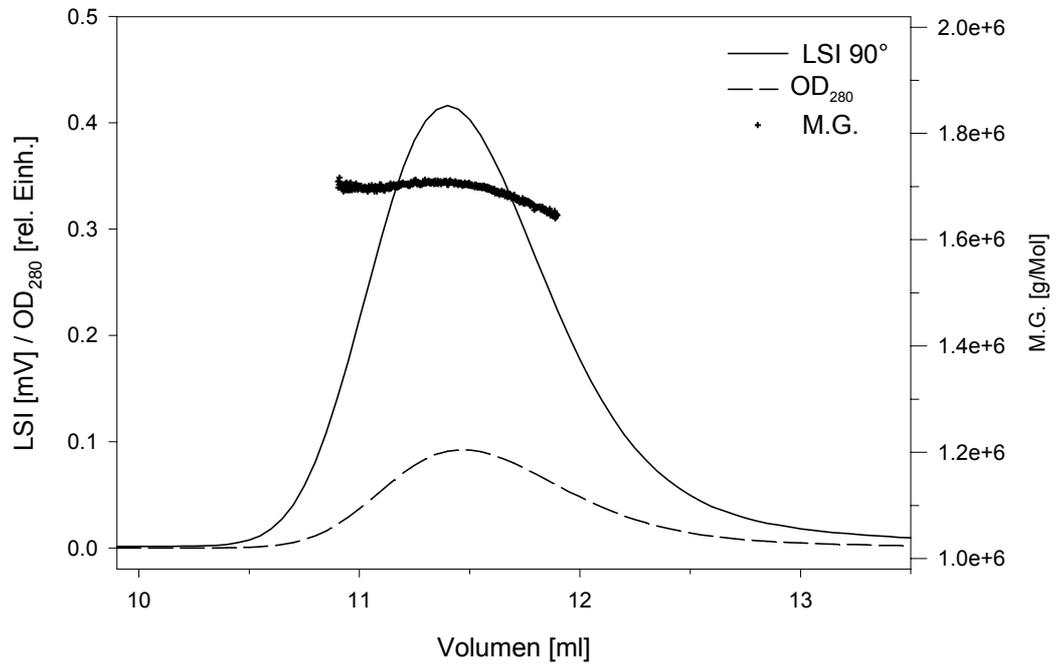
Die Untersuchung hat deutlich gemacht, daß die Limitierung der Genauigkeit der Bestimmung von dn/dc nicht in der Methode selbst liegt, sondern in der Genauigkeit der spezifischen Extinktionskoeffizienten (ϵ), die zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden (Pkt. 2.9).

3.3 Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropoden-Hämocyaninen

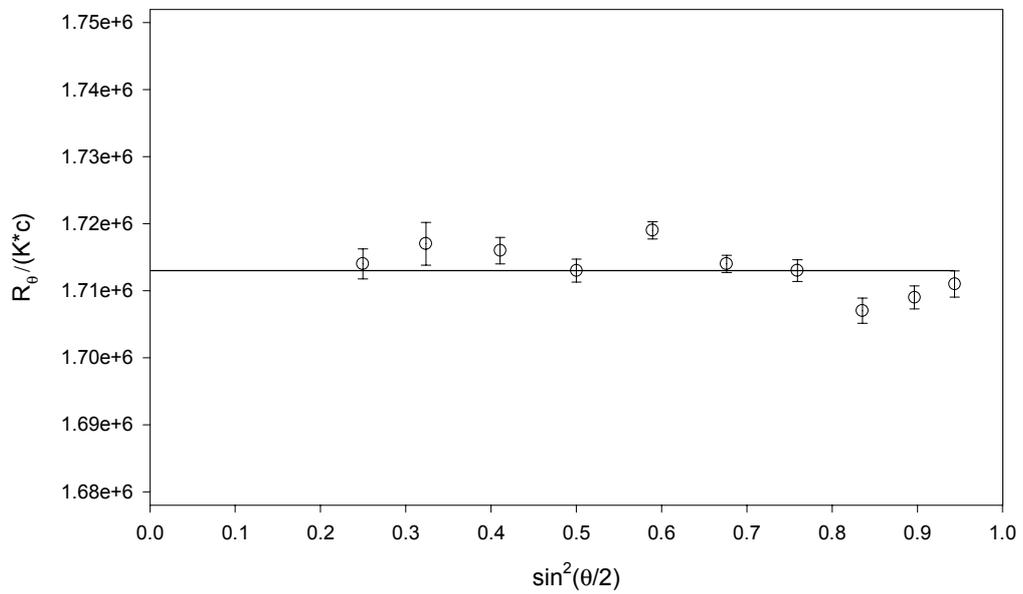
3.3.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung

Im Rahmen meiner Arbeit wurden die Molekulargewichte verschiedener Arthropodenhämocyanine mittels Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung bestimmt. Hierfür wurden ausschließlich Hämocyanine verwendet, die mittels präparativer Gelfiltration aufgereinigt wurden.

Das Laser-Lichtstreuphotometer war mit einer HPLC-Pumpe und einer analytischen Size-Exclusion-Säule verbunden. Diese Art der Probenpräparation gewährleistet eine Charakterisierung der Moleküle unter nahezu nativen Bedingungen. Die folgenden Abbildungen auf den nächsten Seiten zeigen die Elutionsdiagramme der Cheliceraten- und Crustaceen-Hämocyanine mit den dazugehörigen Molekulargewichten (Abb 3.5 A-1-J-1) und dem jeweiligen Debye-Plot (Abb 3.5 A-2-J-2; Legende: siehe S. 59).

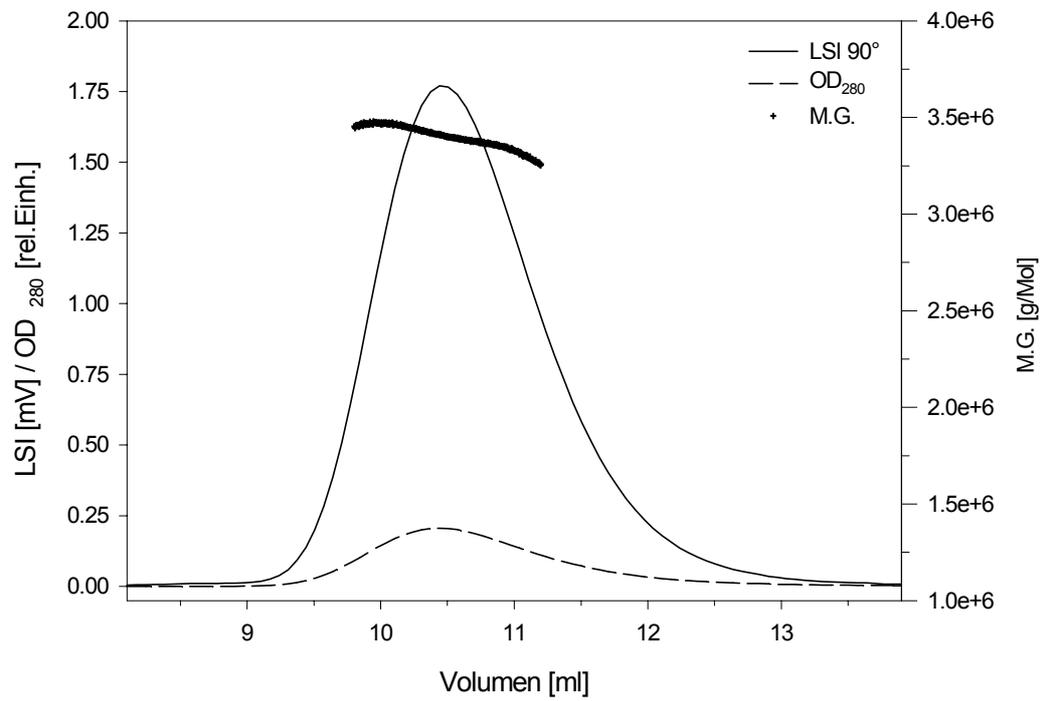


3.5 A-1

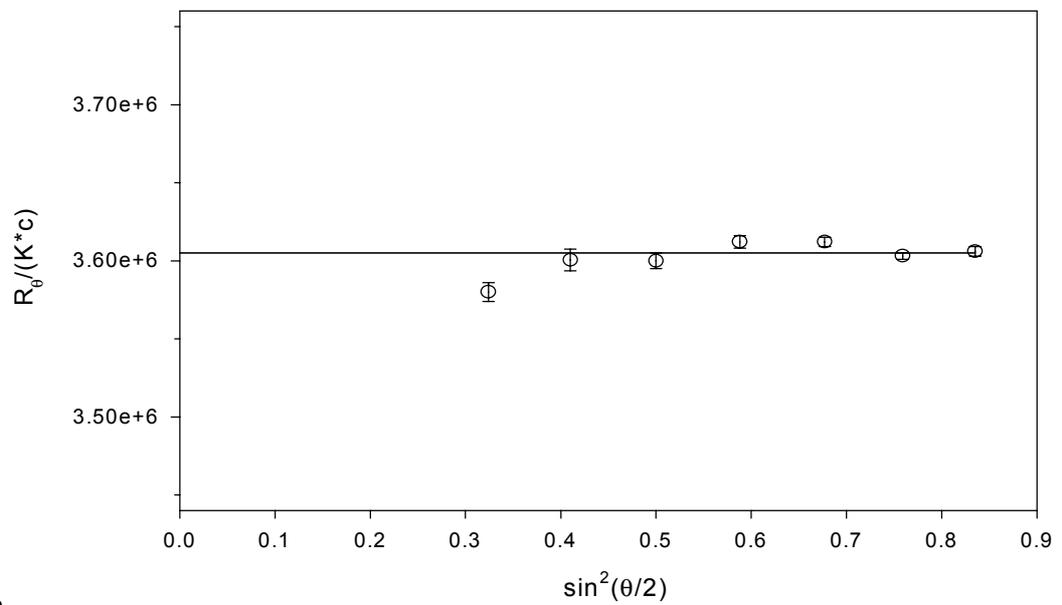


3.5 A-2

E. californicum

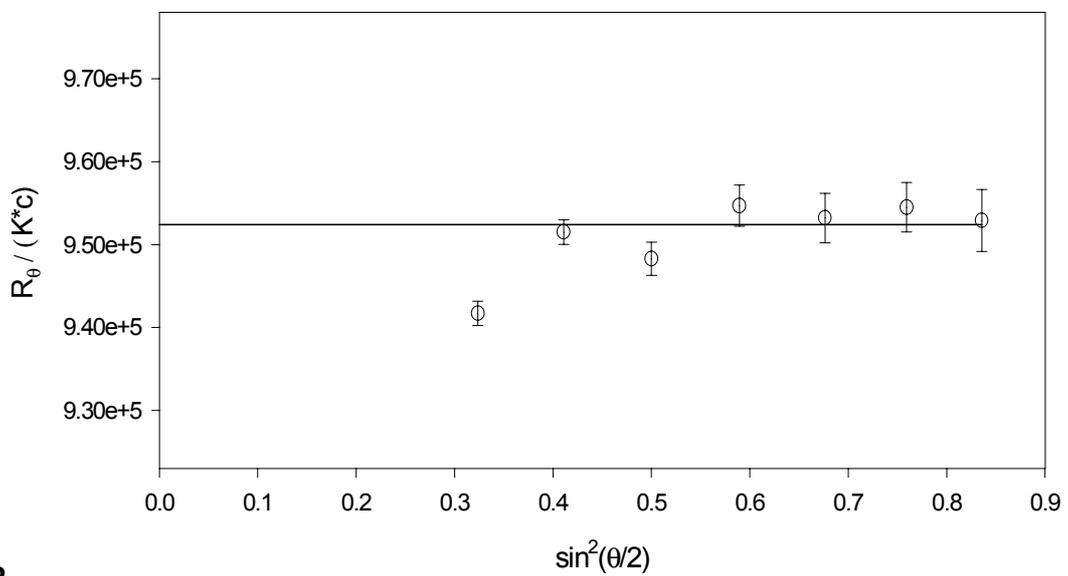
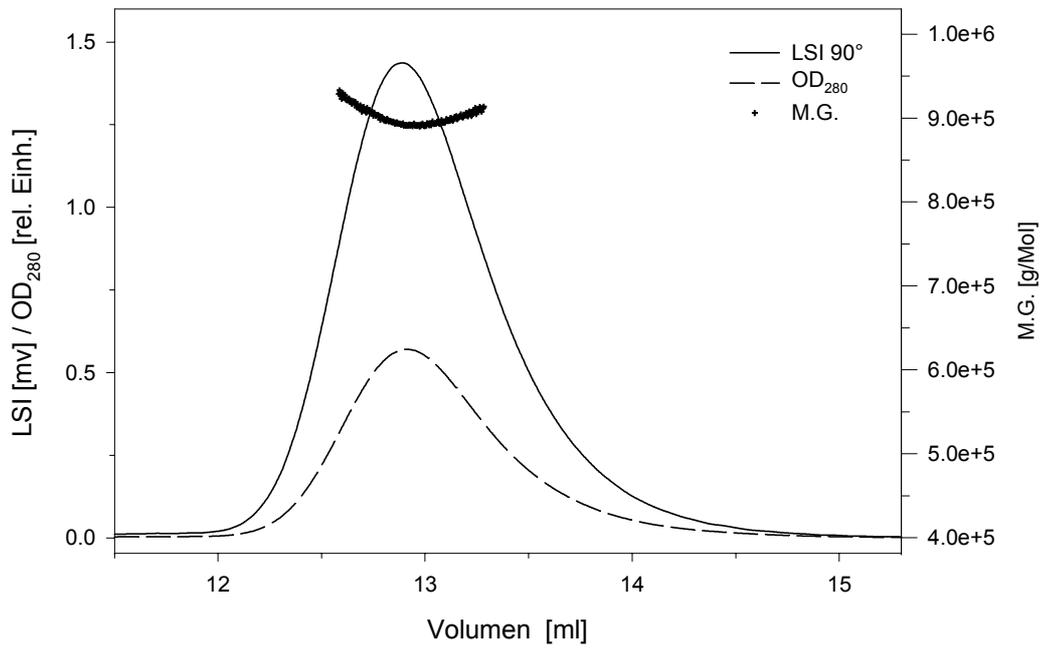


3.5 B-1

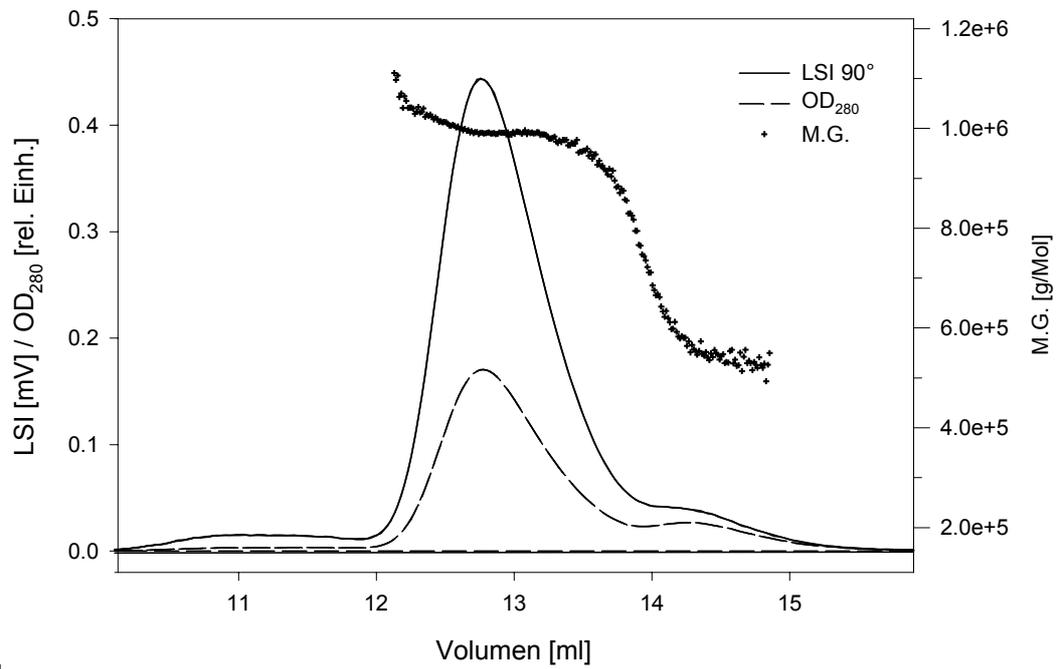


3.5 B-2

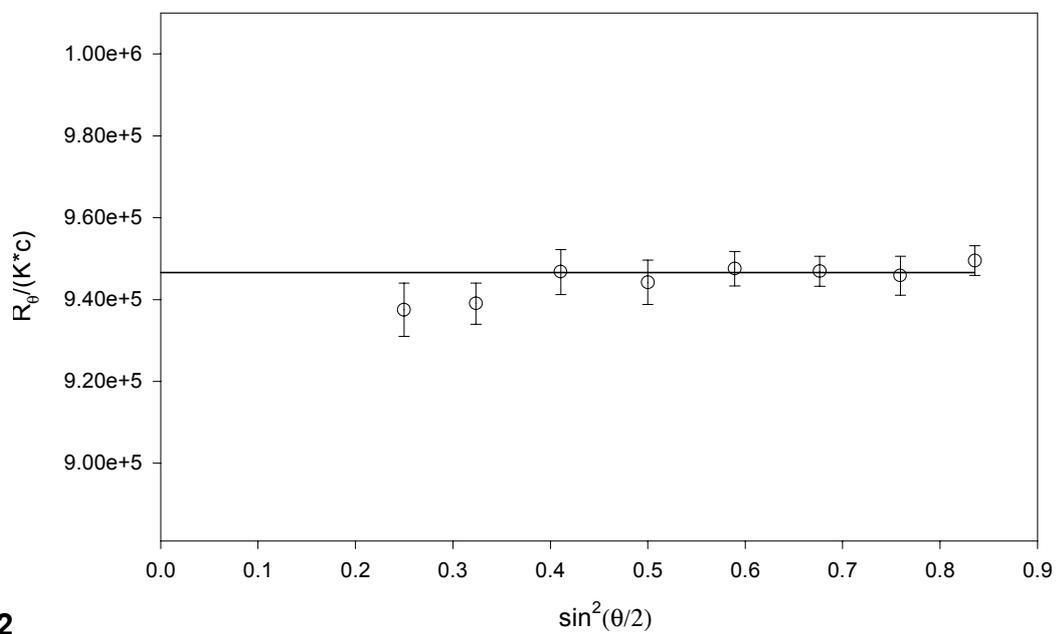
L. polyphemus



A. leptodactylus

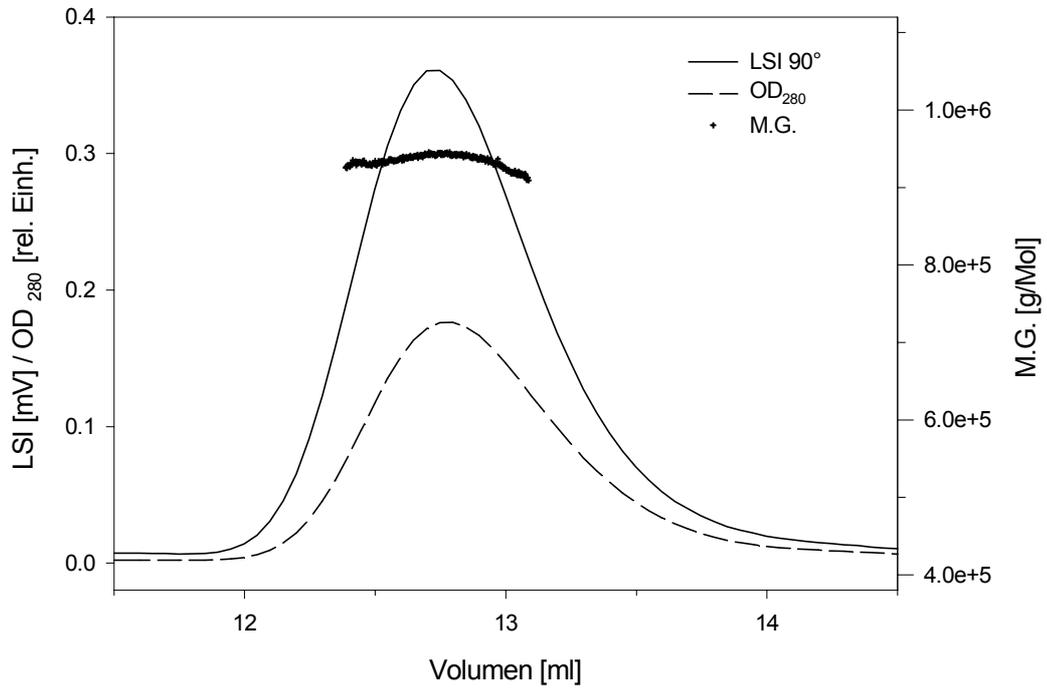


3.5 D-1

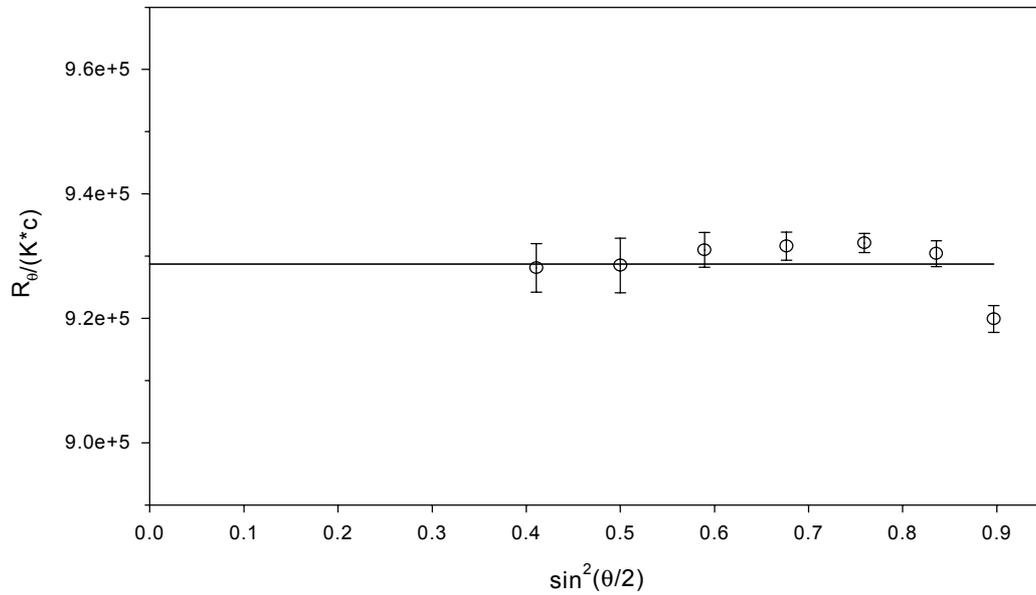


3.5 D-2

C. granulata

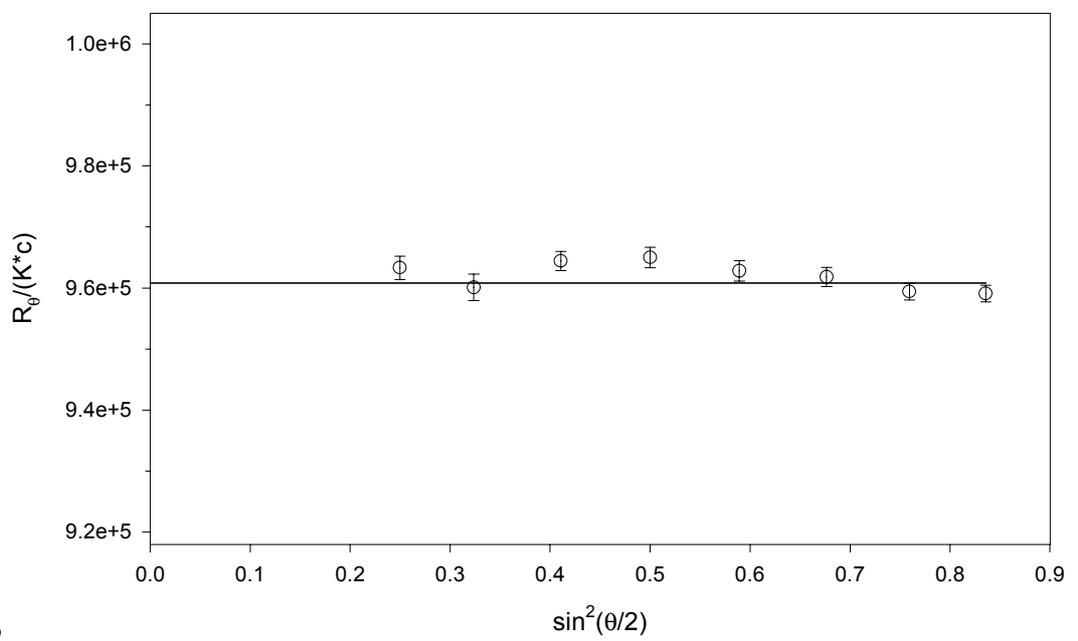
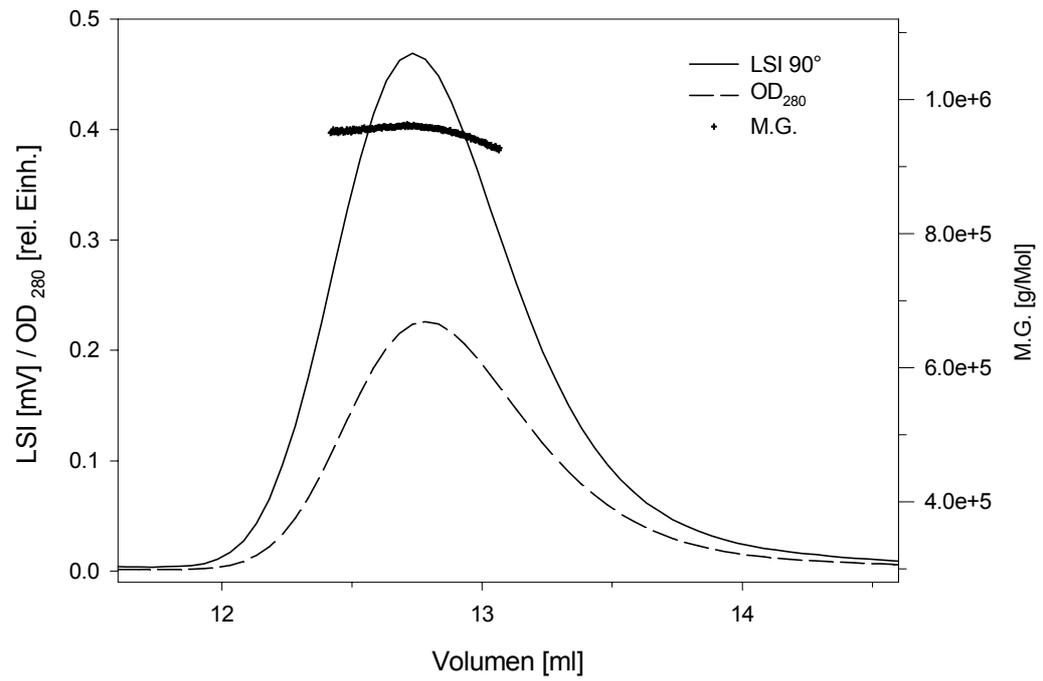


3.5 E-1

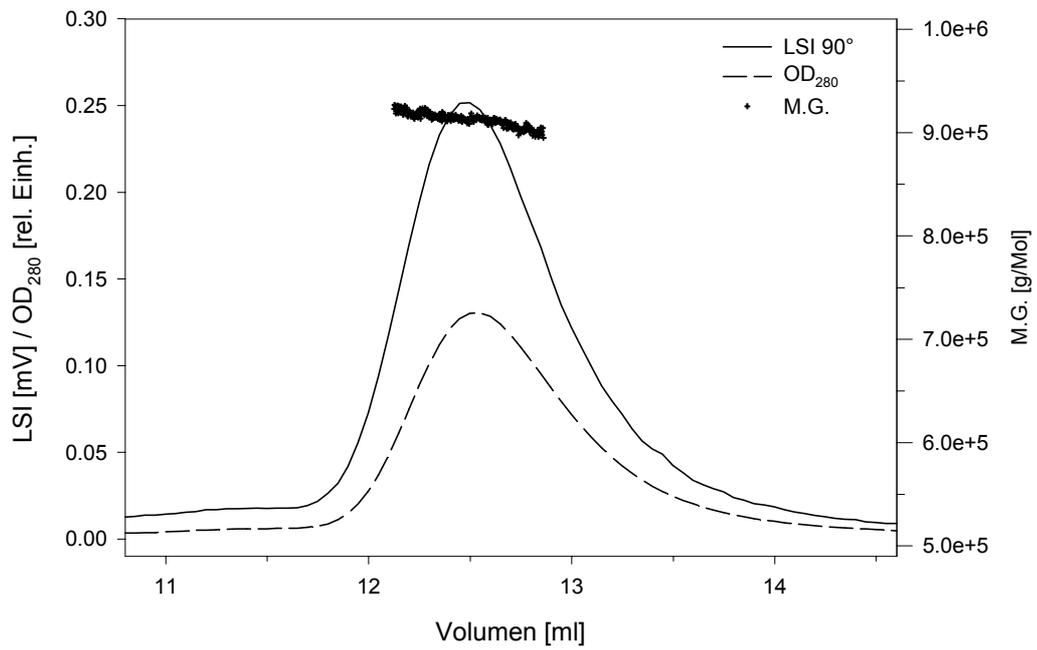


3.5 E-2

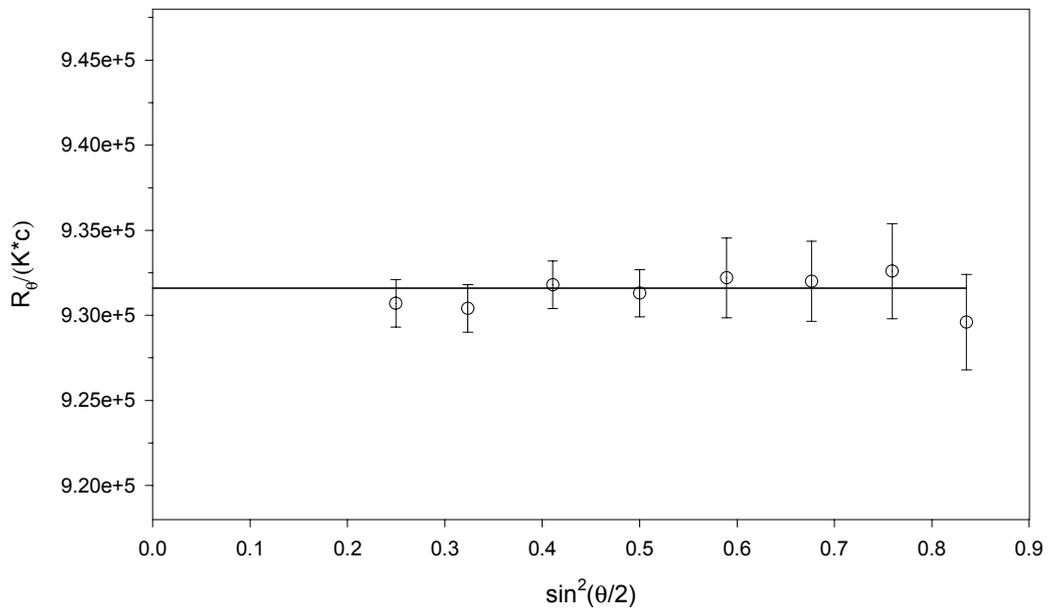
C. pagurus



C. maenas

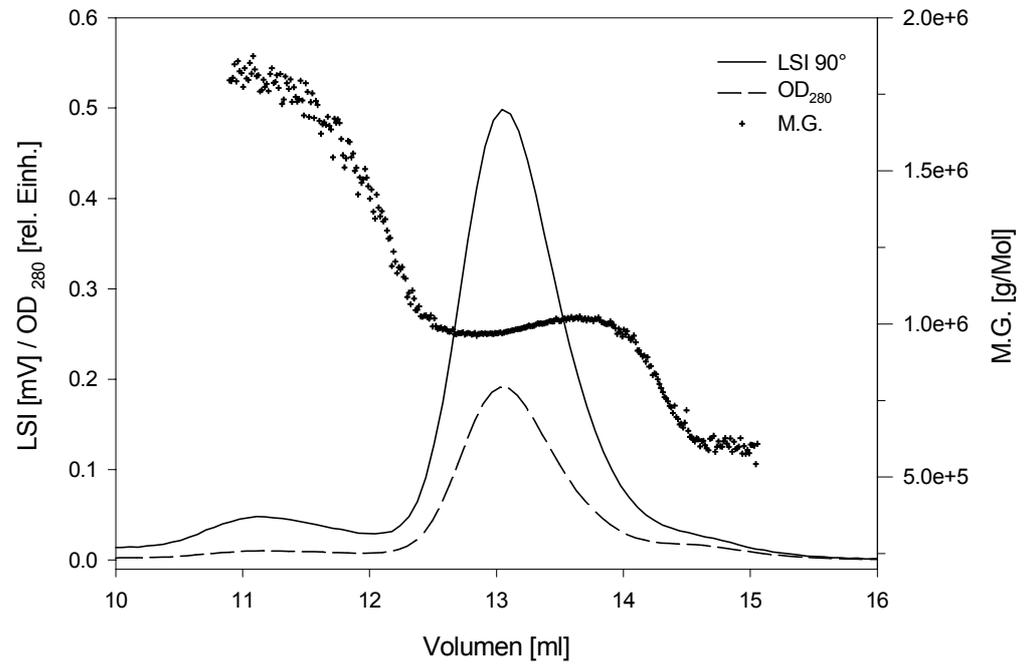


3.5 G-1

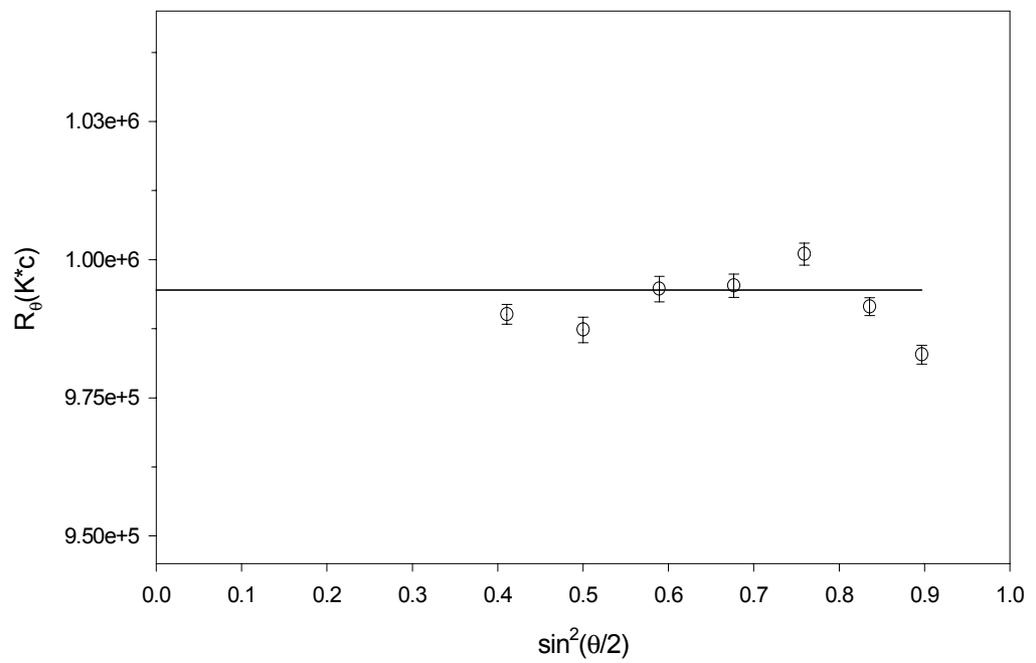


3.5 G-2

H. americanus

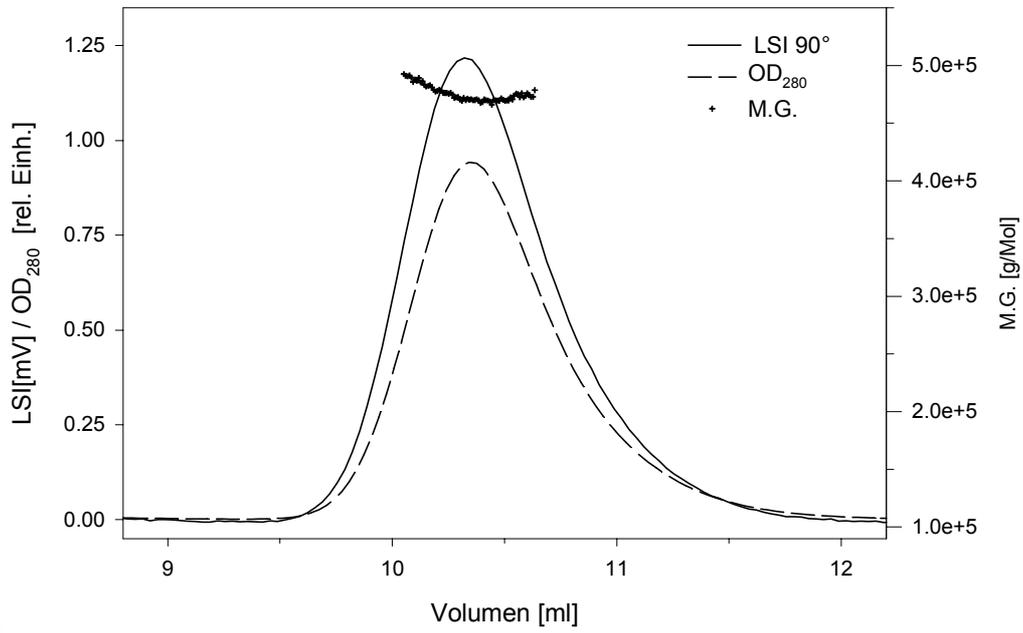


3.5 H-1

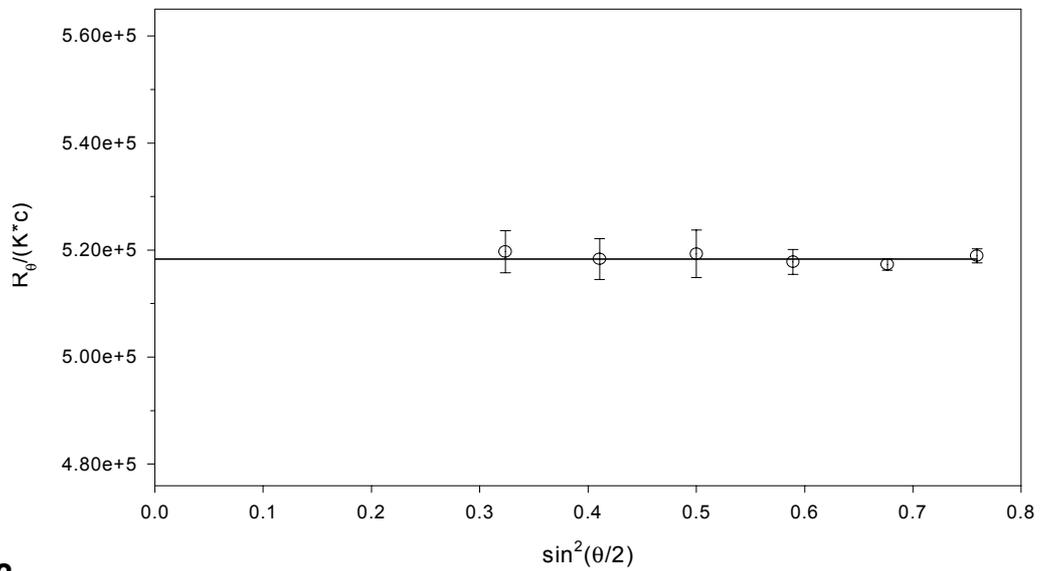


3.5 H-2

H. vulgaris

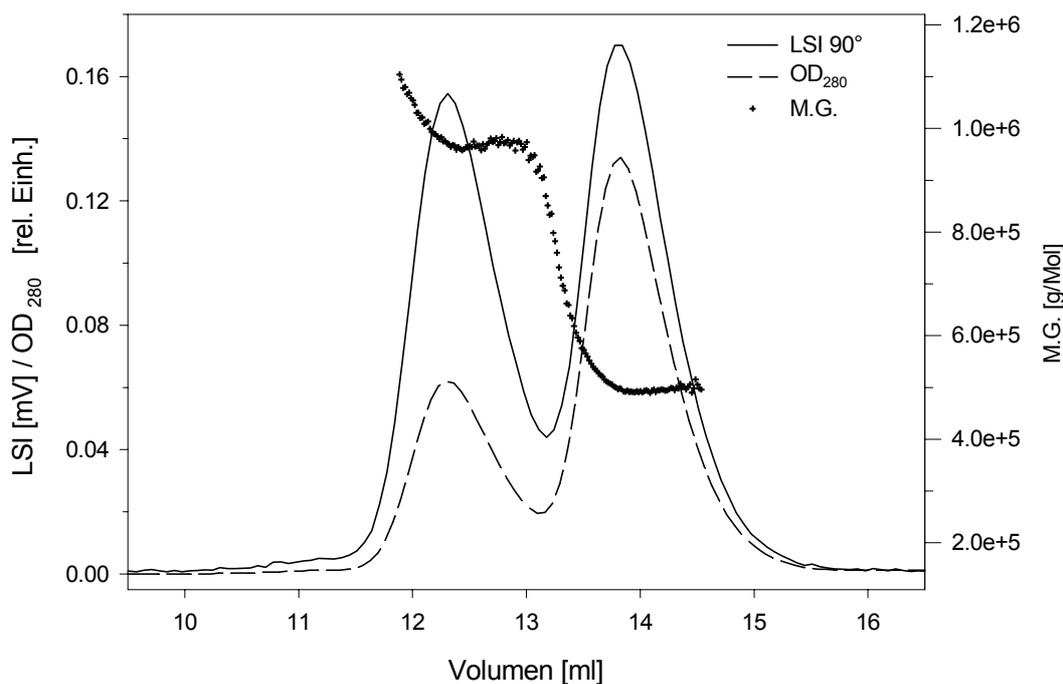


3.5 I-1

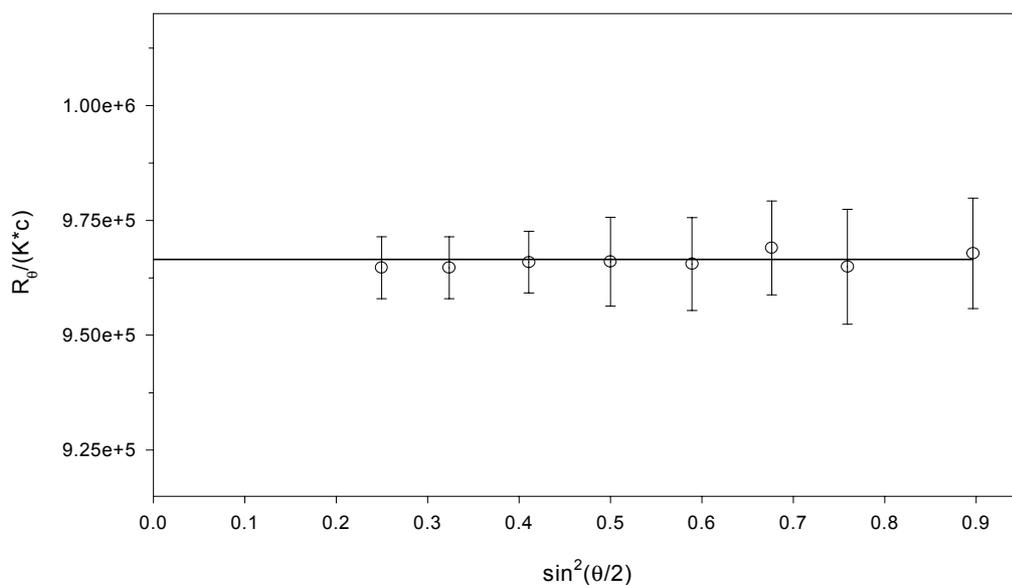


3.5 I-2

P. interruptus



3.5 J-1



3.5 J-2

P. potamios

Abb. 3.5: Elutionsdiagramme der Chelizeraten- und Crustaceen-Hämocyanine (A-1 – J-1) und Debye-Plots für jeweils einen Messpunkt im Elutionsdiagramm (A-2 – J-2).

Die Elutionsdiagramme zeigen die Streulichtintensität (LSI), die OD bei 280 nm und das Molekulargewicht (M.G.) aufgetragen gegen das Elutionsvolumen von einer Messung. In den Debye-Plots ist $R_\theta / K \cdot c$ gegen $\sin^2(\theta/2)$ exemplarisch für einen Messpunkt des Elutionspeaks aufgetragen. Die Steigung der Geraden wird Null gesetzt, da bei einer Wellenlänge von 632.8 nm für Moleküle in der Größe der Hämocyanine mit einem Durchmesser deutlich kleiner als 1/20 der Wellenlänge isotrope Streuung vorliegt. Das Programm ASTRA bestimmt die statistische Fluktuation jedes Detektorssignals am Anfang und am Ende der Baseline und bestimmt hieraus einen Gewichtungsfaktor für den Fit. Die Fehlerbalken stellen den experimentellen Fehler dar, der durch das Signal-Rausch-Verhältnis zustandekommt.

Die Elutionsdiagramme zeigen, daß die Hämocyaninproben hauptsächlich eine oligomere Molekülspezies enthalten (Abb. 3.5 A-1–J-1). Das Hämocyanin von *Limulus polyphemus* liegt als 48-mer, das von *Eurypelma californicum* als 24-mer vor. Die Crustaceenhämocyanine sind 12-mer, mit Ausnahme des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* (I-1), das als 6-mer vorliegt. Bei der Bestimmung des Molekulargewichtes in Na-P-Puffer, ohne den Zusatz von CaCl_2 und MgCl_2 , war beim Hämocyanin der Spezies *Potamon potamios* ein Anteil von etwa 75 % der 12-meren zu 6-meren dissoziiert (J-1). Bei den Hämocyaninen von *Calappa granulata* und *Homarus vulgaris* ist ein weitaus geringerer Anteil an 6-merem Hämocyanin zu erkennen (D-1; H-1). Im Elutionsdiagramm von *Homarus vulgaris* zeigt sich zusätzlich ein geringer Anteil an 24-merem Hämocyanin. Dies wurde durch analytische Gelfiltration auch für das Hämocyanin des nahe verwandten *Homarus americanus* gezeigt [Jaenicke, 1998].

Der nahezu horizontale Verlauf der Molekulargewichtskurven (Abb. 3.5 A-1–J-1) in der Peakmitte zeigt, daß es sich um eine monodisperse Probenverteilung handelt. Die zum Teil leicht gekrümmte Form dieser Kurven kann ihre Ursache in der Verbreiterung der Peaks haben, die zwischen den Flußzellen des UV-Vis und des Lichtstreuendetektors auftritt [Wyatt and Papazian, 1993]. Eine weitere Ursache für ein Abweichen vom horizontalen Verlauf kann ein unzureichendes Alignment des UV-Vis-Detektors mit dem Lichtstreuphotometer sein.

Zur Berechnung der Konzentration der Hämocyanine wurden die mit verschiedenen Methoden bestimmten Extinktionskoeffizienten herangezogen (Tab. 3.2, 3.3, 3.4). Als Brechungsindex-Inkrement diente für die Berechnung der Molekulargewichte der Cheliceraten-Hämocyanine der für *Eurypelma californicum* sowohl in Tris- als auch in Na-P-Puffer mit 0.181 ml/g bestimmte Wert (Pkt. 3.2) und für die der Crustaceen-Hämocyanine das von Herskovits et al. [1981] für *Homarus americanus* ermittelte Brechungsindex-Inkrement von 0.180. In Tabelle 3.7 sind die Molekulargewichte der verschiedenen Arthropoden-Hämocyanine gezeigt. Sie stellen jeweils das Massenmittel im Bereich der Peakmitte dar (Pkt. 2.10.1.5, Glg. 2.10.XXIV).

Spezies	Molekulargewicht [kDa]			Anzahl d. Mess.
	ϵ_{280} : Bradford	ϵ_{280} : mod. Lowry	ϵ_{280} : Scopes	
Chelicerata				
<i>E. californicum</i>	1709* \pm 78	*	1616 \pm 74	(10)
<i>L. polyphemus</i>	3501* \pm 115	*	2569 \pm 84	(2)
Crustacea				
<i>A. leptodactylus</i>	944 \pm 20	-	838 \pm 17	(2)
<i>C. granulata</i>	929 \pm 26	1084 \pm 31	826 \pm 23	(2)
<i>C. pagurus</i>	934 \pm 16	1008 \pm 18	840 \pm 15	(4)
<i>C. maenas</i>	944 / 1047* / 915*	1055	819	(1)
<i>H. americanus</i>	965* \pm 49	*	828 \pm 42	(2)
<i>H. vulgaris</i>	999	-	-	(1)
<i>P. interruptus</i>	502 \pm 5 / 559* \pm 5	-	425 \pm 4	(3)
<i>P. potamios</i> 12-mer	935 \pm 16	992 \pm 17	783 \pm 13	(3)
6-mer	481.0 \pm 13	510 \pm 14	403 \pm 11	

Tab. 3.7: Mittels Laser-Lichtstreuung ermittelte Molekulargewichte der einzelnen Hämocyane. Die Konzentration der Hämocyane wurden mit verschiedenen Extinktionskoeffizienten berechnet (Pkt. 3.1). Für die mit * gekennzeichneten Werte wurde ϵ_{280} [$\text{ml} (\text{g} \cdot \text{cm})^{-1}$] aus der Literatur (Tab. 3.1) verwendet. Die Molekulargewichte, die aus mehreren Messungen ermittelt wurden, stellen die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen dar.

Die Molekulargewichte zeigen aufgrund der verschiedenen zur Berechnung verwendeten Extinktionskoeffizienten eine große Schwankungsbreite. Auffällig sind hierbei die mit dem ϵ -Wert des Scopes-Verfahrens errechneten sehr niedrigen Molekulargewichte. Sie liegen zwischen 10% (*C. pagurus*) und 24% (*C. granulata*) niedriger als die M_r , die mit den Extinktionskoeffizienten der beiden chemischen Assays ermittelt wurden.

Eine sehr gute Übereinstimmung mit Molekulargewichten aus Sequenzdaten (Tab. 3.12) zeigen hingegen die mit dem Extinktionskoeffizienten aus der Literatur errechneten Werte der Cheliceraten-Hämocyane von *Eurypelma californicum* und *Limulus polyphemus* (Tab. 3.7).

Auch bei der Bestimmung der Molekulargewichte der Crustaceenhämocyanine ergeben sich, je nach der Methode der ϵ -Bestimmung, deutlich unterschiedliche M_r (Tab. 3.7). Die beste Übereinstimmung mit Molekulargewichten aus der Literatur (Tab. 3.12) zeigen die Werte, die mit den Extinktionskoeffizienten des Bradford-Assays errechnet wurden.

Für die Hämocyanine von *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas* und *Homarus americanus* wurde das Molekulargewicht zusätzlich mit den Brechungsindex-Inkrementen, die mit dem Scanning-Michelson-Interferometer ermittelt wurden errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Spezies	Molekulargewicht [kDa]			Anzahl d. Mess.
	ϵ_{280} : Bradford	ϵ_{280} : mod. Lowry	ϵ_{280} : Scopes	
Chelicerata				
<i>E. californicum</i>	1709* \pm 78	-	1.831 \pm 84	(10)
Crustacea				
<i>A. leptodactylus</i>	707 \pm 15	-	776 \pm 17	(2)
<i>C. pagurus</i>	700 \pm 13	681 \pm 13	813 \pm 15	(4)
<i>C. maenas</i>	632 / 599.*	593	767	(1)
<i>H. americanus</i>	798* \pm 41	-	929 \pm 48	(2)

Tab. 3.8: Molekulargewichte der einzelnen Hämocyanine unter Verwendung der mittels des Scanning-Michelson-Interferometers ermittelten Brechungsindex-Inkmente.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden die mit drei verschiedenen Methoden bestimmten Extinktionskoeffizienten und Werte aus der Literatur, die mit * gekennzeichnet sind, verwendet.

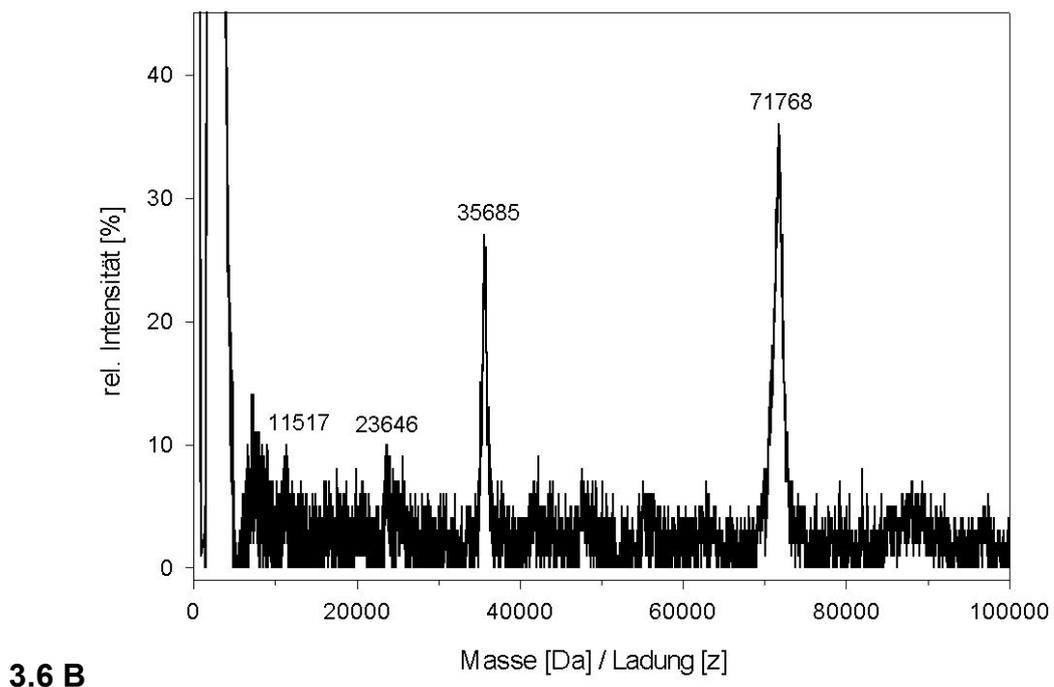
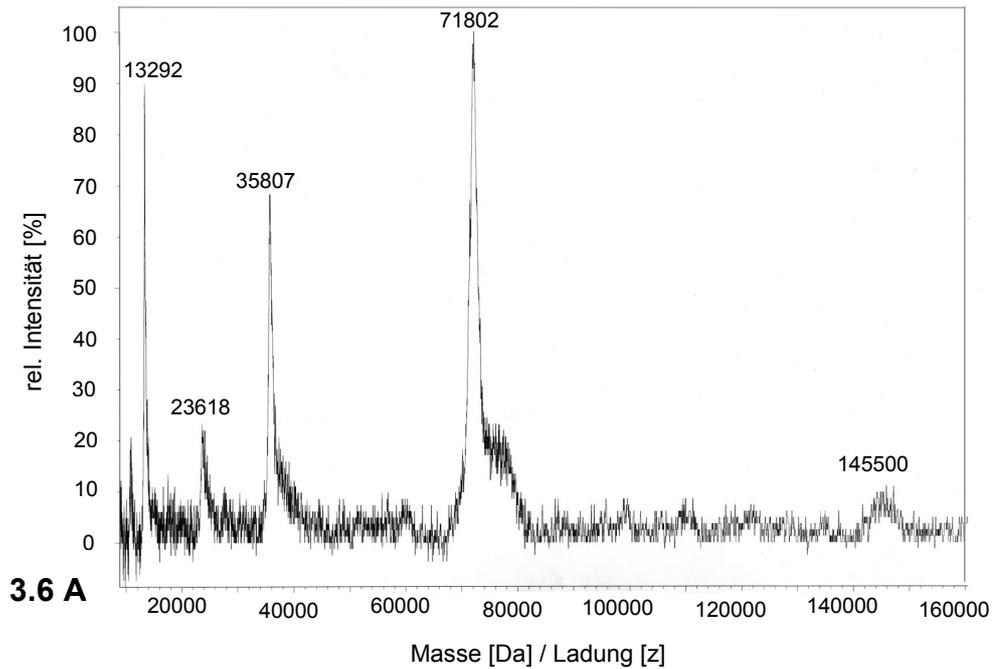
Bei der Bestimmung des Molekulargewichts mittels Lichtstreuung ist das Brechungsindex-Inkrement (dn/dc) in der optischen Konstanten K enthalten (Pkt. 2.10.1.1, Glg. 2.10.X) und geht quadratisch in die Berechnung ein (Pkt. 2.10.1.1, Glg. 2.10.XI). Dies erklärt, daß die bei Verwendung der Extinktionskoeffizienten der beiden chemischen Assays mit dem Scanning Michelson Interferometer relativ hoch bestimmten Brechungsindex-Inkmente (Tab. 3.6) zu deutlich niedrigeren Molekulargewichten führen, im Falle von *Carcinus maenas* sogar um bis zu 44% (Tab. 3.8).

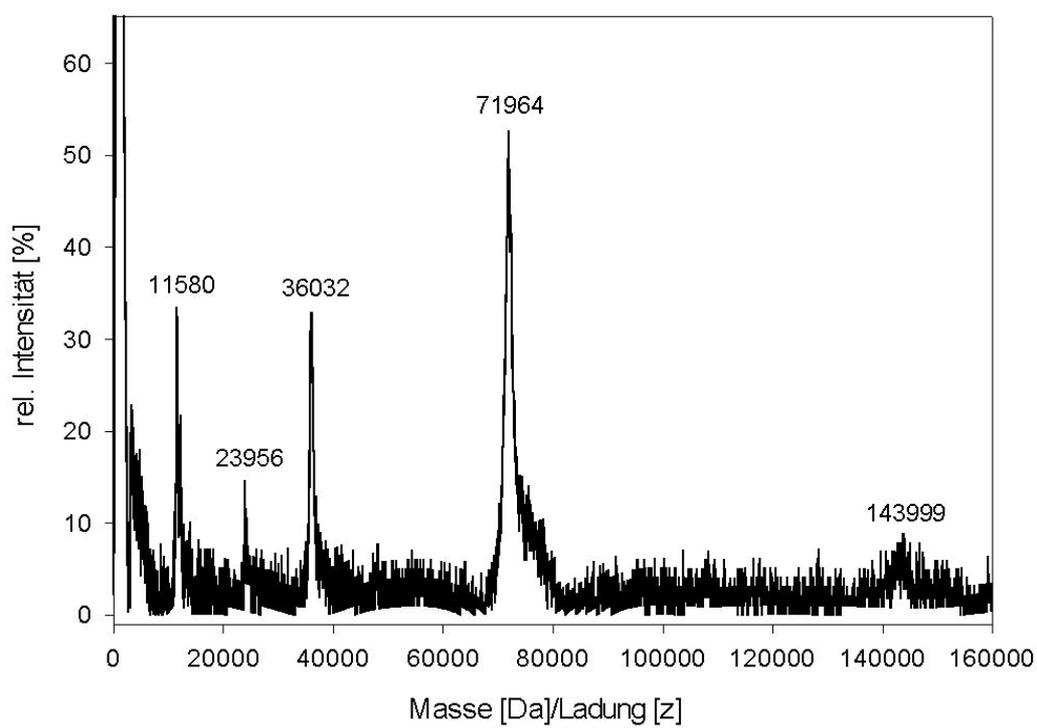
Bei Verwendung der dn/dc -Werte, die mit den Extinktionskoeffizienten des Scopes-Verfahrens errechnet wurden ergeben sich für die Hämocyanine von *E. californicum* und *H. americanus* 7% bzw. 12% höhere M_r . Für die restlichen Crustaceen-hämocyanine liegen sie, entsprechend den höher bestimmten dn/dc -Werten, um bis zu 7% (*A. leptodactylus*) niedriger.

Wie auch bei der Berechnung der Molekulargewichte bildet der Extinktionskoeffizient bei 278 nm eine wichtige Grundlage für die Berechnung der Brechungsindexinkremente. Zwischen der Konzentration des Hämocyanins und dem Brechungsindex-Inkrement besteht ein linearer Zusammenhang (Pkt. 2.9). Fehler in der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten pflanzen sich somit in der Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementes und letztlich in der des Molekulargewichtes fort. Ferner ist zu berücksichtigen, daß die Brechungsindex-Inkremente von *A. leptodactylus*, *C. maenas* und *C. pagurus* aufgrund der großen Proteinmengen, die für eine Messung benötigt wurde, aus Einzelmessungen ermittelt und nicht wiederholt wurden.

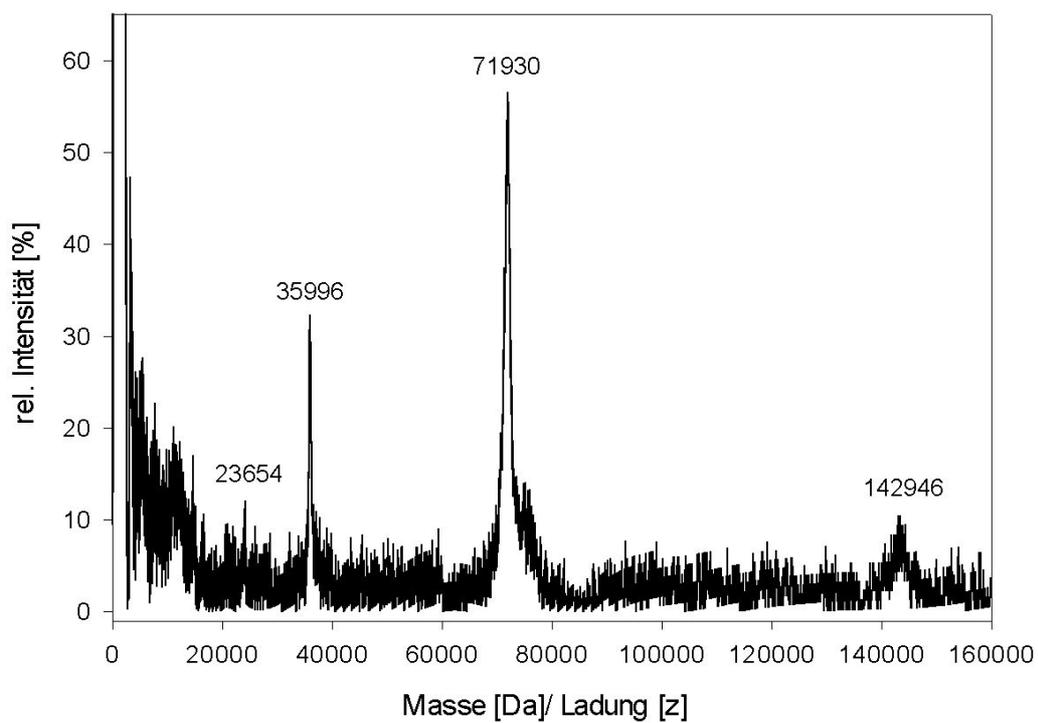
3.3.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-TOF

Neben der Molekulargewichtsbestimmung oligomerer Hämocyanine in Lösung mittels Lichtstreuung wurde die Methode der Massenspektrometrie angewandt. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde für ein Untereinheitengemisch und einzelne Untereinheiten durchgeführt (Abb. 3.6; Legende: siehe S. 66.).

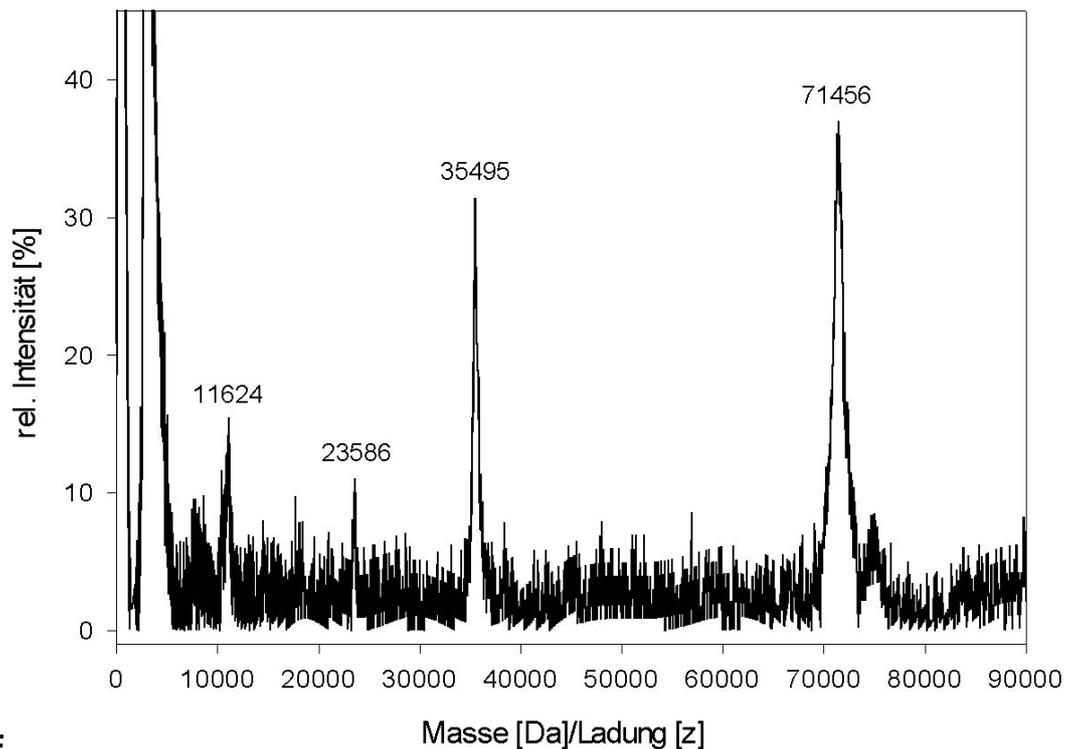




3.6 C



3.6 D



3.6 E

Abb. 3.6: MALDI-Spektren eines Dissoziats (A), eines Gemisches der Untereinheiten a, g und f (B), des Dimeres bc (C) und der einzelnen Untereinheiten d (D) und e (E) des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Als Matrix diente Sinapinsäure. Das dissoziierte Hämocyanin in GlyOH-Puffer pH 9.6 bzw. die Untereinheiten in H₂O (a, g, f; bc; d; e) mit einer Konzentration von jeweils 0.8 mg/ml, wurden im Verhältnis 1:1 mit der Matrixlösung gemischt.

Die zunächst in GlyOH-Puffer aufgenommen Massenspektren zeigten, mit Ausnahme des Untereinheitengemisches (Abb. 3.6 A), ein relativ schwaches Signal und somit ein sehr ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis. Ferner waren die Ergebnisse schlecht reproduzierbar. Ein möglicher Grund könnten hohe Salzkonzentrationen sein, die sich auf die Messungen nachteilig auswirken [Siuzdak, 1996; Lottspeich und Zorbas, 1998]. Sie können die Kokristallisation von Matrix- und Analytmolekülen beeinträchtigen [Kaufmann, 1995]. Die Reinheit der Probe ist somit von entscheidender Bedeutung. Um diesen negativen Effekt zu minimieren, wurden die Proben drei Tage vor der Messung gegen H₂O dialysiert.

Die Massenspektren aller Ansätze (Abb. 3.6 A-E) zeigen neben den jeweils ausgeprägten einfach geladenen Molekülen $[M-H]^+$ auch die doppelt $[M-2H]^{2+}$ und die dreifachgeladenen Proteinmoleküle $[M-3H]^{3+}$.

Untereinheiten	M_r [Da] MALDI	M_r [Da] Sequenzdaten	Differenz [%]
Dissoziat in 0.05 M GlyOH	71.802 ± 354	71.941*	0.20
<u>a</u> , <u>g</u> , <u>f</u> in H ₂ O	71.762 ± 18	71.966*	0.30
<u>bc</u> in H ₂ O	71.956 ± 12	72.208*	0.35
<u>d</u> in H ₂ O	71.838 ± 80	71.999	0.20
<u>e</u> in H ₂ O	71.476 ± 82	71.544	0.10

Tab. 3.9: Mittels MALDI ermittelte Molekulargewichte der Untereinheiten von *Eurypelma californicum* im Vergleich mit aus Sequenzdaten errechneten M_r [Voit et al., 2000].

*: mittleres M_r aus Sequenzdaten.

Die aus dem Masse/Ladungsverhältnis berechneten Molekülmassen für die unterschiedlichen Ansätze liegen zwischen 71.476 Da und 71.956 Da (Abb. 3.6 A-E, $[M-H]^+$; Tab. 3.9). Beim Gesamtdissoziat ist im Bereich zwischen 74.000 Da und 80.000 Da eine Schulter zu erkennen (Abb. 3.6 A). Einzelne Untereinheiten mit unterschiedlichen Molekulargewichten, wie sie durch SDS Gelelektrophorese [Schneider et al., 1977] und Sequenzierung [Voit et al., 2000] nachgewiesen wurden, konnten bei den Gemischen aus Untereinheiten nicht aufgelöst werden (Abb. 3.6 A-C).

In den Spektren (Abb.: 3.6 A-E) sind neben den einfach geladenen $[M-H]^+$, auch die doppelt $[M-2H]^{2+}$ und die dreifachgeladenen Proteinmoleküle $[M-3H]^{3+}$ zu erkennen. Zusätzlich ist im Molekulargewichtsbereich bei etwa 143.000 Da -144.000 Da ein Dimer mit einer Ladung $[M_2-H]^+$ zu erkennen. Die Messungen des Heterodimeres bc allerdings lassen bei 144.000 Da nur einen schwachen Peak erkennen. Der einfach geladene Hauptpeak $[M-H]^+$ liegt bei 71.956 Da.

Tabelle 3.10 auf der folgenden Seite zeigt einen zusammenfassenden Vergleich der Molekulargewichte der Arthropodenhämocyanine, die von mir mittels MALLS und MALDI und von Jaenicke [1998] mittels SDS-PAGE an unserem Institut bestimmt wurden, mit den Molekulargewichten aus der Literatur.

	Oligomer	Molekulargewicht [kD]	Methode	Referenz
Crustacea				
<i>P. interruptus</i>	6-mer	502 ± 5 450 453*	MALLS S.E. Sequenz	Hübler Kuiper et al., 1975 Bak et al., 1987, Jekel et al., 1988; Neuteboom, 1992
<i>P. vulgaris</i>	6-mer	454**	Sequenz	Jekel et al., 1996
<i>A. leptodactylus</i>	12-mer	944 ± 20 1.000 ± 91	MALLS SDS Page	Hübler Jaenicke, 1998
<i>C. granulata</i>	12-mer	929 ± 26	MALLS	Hübler
<i>C. magister</i>	12-mer	938 ± 20 898*	S.E. Sequenz	Ellerton et al, 1970 Durstewitz and Terwilliger, 1997
<i>C. pagurus</i>	12-mer	934 ± 16 915.5 ± 46	MALLS SDS Page	Hübler Jaenicke, 1998
<i>C. maenas</i>	12-mer	944 945 ± 62	MALLS SDS-Page	Hübler Jaenicke 1998
<i>C. destructor</i>	12-mer	950	S.E.	Jeffrey et al., 1978
<i>H. americanus</i>	12-mer	965 ± 49 918 ± 73 940	MALLS SDS-Page LS	Hübler Jaenicke 1998 Herskovits et al., 1983a
<i>P. potamios</i>	12-mer 6-mer	935 ± 16 481 ± 13	A.E. MALLS MALLS	Morimoto and Kegeles, 1971 Hübler Hübler
Chelicerata				
Arachnida				
<i>A. australis</i>	24-mer	1.723*	Sequenz	Buzy A: et al. 1995
<i>E. californicum</i>	24-mer	1.709 ± 78 1.723 1.726	MALLS MALDI Sequenz	Hübler Hübler Voit et al., 2000
<i>L. quinquestriatus</i>	24-mer	1.700	S.E.	Klarman et al., 1979
Merostoma				
<i>L. polyphemus</i>	48-mer	3501 ± 115 3160 3920 3486*	MALLS S.E. LS Sequenz	Hübler Johnson and Yphantis, 1978 van Holde and Miller 1982 Loeffler et al., 1978 Nakashima et al. 1986

Tabelle 3.10: Vergleich der mit MALLS und SDS-PAGE [Jaenicke, 1998] ermittelten Molekulargewichte der Arthropodenhämocyanine mit Werten aus der Literatur.

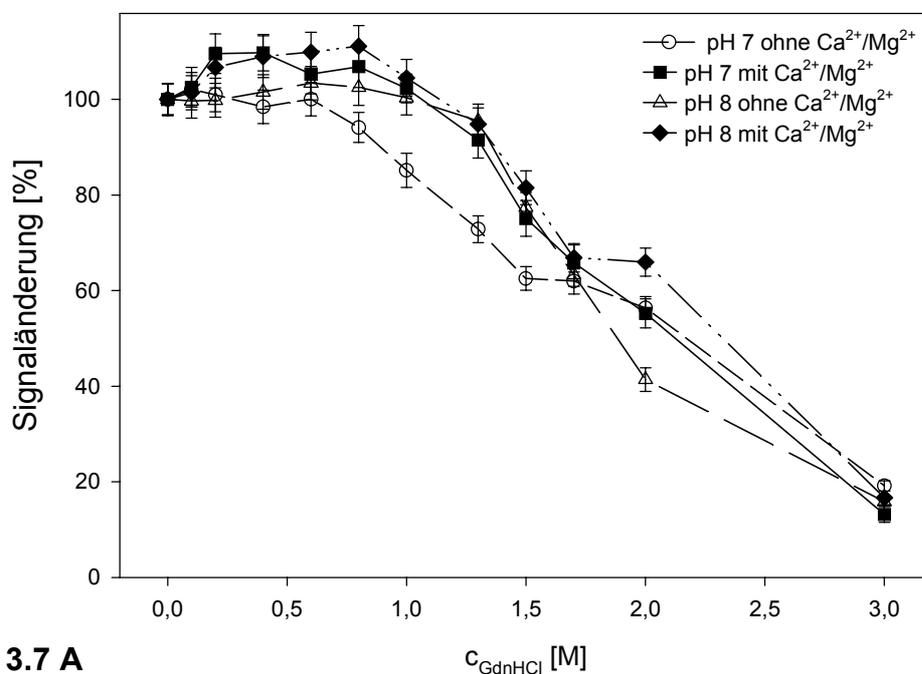
Dargestellt sind die auf der Basis der Extinktionskoeffizienten aus der Literatur (*) bzw. des Bradford-Assays mittels MALLS bestimmten M_r . Die zahlreichen Molekulargewichte aus der Literatur, die mit SDS-Page ermittelt wurden, sind nicht aufgeführt. Die mittels MALLS bzw. MALDI von mir bestimmten M_r sind fett gedruckt. * bzw. **: M_r , die ausgehend von der Sequenz einer Untereinheit bzw. einem Untereinheitengemisch auf das M_r des Oligomers hochgerechnet wurden.

3.4 Stabilität des oligomeren Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*

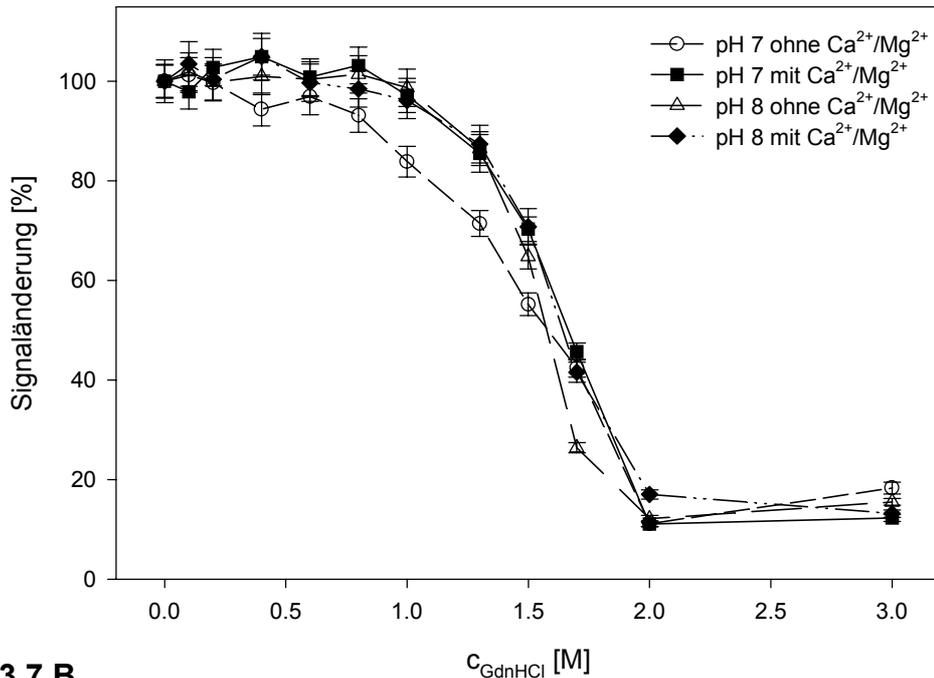
3.4.1 Einfluß von GdnHCl auf den Oligomerisierungsgrad

Viele Arthropodenhämocyanine dissoziieren unter Abwesenheit zweiwertiger Kationen und bei einem alkalischen aber noch physiologisch tolerierbarem pH in ihre Untereinheiten [van Holde et al., 1982, 1992, 1995; Ellerton et al., 1983; Salvato et al., 1990; Markl et al., 1992]. Im folgenden wurde der Einfluß von GdnHCl auf den Dissoziationsgrad des oligomeren Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum* bei verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Variiert wurde die Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} und der pH des Puffers.

Abbildung 3.7 zeigt die relative Änderung der Lichtstreuintensität des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* in verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen (Legende: siehe folgende Seite).



3.7 A



3.7 B

Abb 3.7: Relative Änderung der Lichtstreuintensität des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* in verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen.

A: nach 4-minütiger Inkubationszeit; **B:** nach 24-stündiger Inkubationszeit. Die offenen Symbole kennzeichnen die Abwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 . Die Signaländerungen wurden aus den molaren Massen errechnet und jeweils auf den Wert bei 0 M GdnHCl (=100%) normiert. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.2 mg/ml. Die Fehlerbalken stellen den experimentellen Fehler dar.

Bereits nach 4 Minuten beginnt der Prozess der Dissoziation des oligomeren Hämocyanins. Nach der Inkubation von 24-merem Hämocyanin in GdnHCl beobachtet man bei Konzentrationen zwischen 0 M und 1 M zunächst einen Anstieg der Streuintensitäten um bis zu 10 % gegenüber der nativen Probe (Abb. 3.7 A). Einen Anstieg der Lichtstreuintensität konnte auch Hoff [1990] bei Denaturierungsexperimenten mit dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* verzeichnen. Bei dem Denaturierungsansatz mit pH 7 und 8 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ist dieser Anstieg nicht zu beobachten. Mit Ausnahme des Ansatzes bei pH 7 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ist ab einer Konzentration von 1 M GdnHCl eine Abnahme der Lichtstreuintensität und somit der Molekulargewichte bis 3 M GdnHCl zu verzeichnen. Der Ansatz bei pH 7 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigt bereits ab 0.8 M GdnHCl eine beginnende Abnahme der Molekulargewichte, was auf eine geringere Stabilität des Oligomers bei diesen Bedingungen hinweist. Die Ansätze bei pH 7 ohne und bei pH 8 mit Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigen zwischen 1.5 M und 1.7 M bzw. zwischen 1.7 M und 2 M GdHCl

eine leichte Zwischenstufe, die nach 24 Stunden verschwunden ist (Abb. 3.7 B). Generell ist nach 4 Minuten noch kein scharfer Übergang zwischen oligomerem und dissoziiertem Hämocyanin zu beobachten, sondern eine kontinuierliche Abnahme der Lichtstreuintensität bis 3 M GdnHCl.

Nach 24 Stunden zeigen die Ansätze mit 5 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} und der Ansatz bei pH 8 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} einen sehr ähnlichen Verlauf. Nach einem leichten Anstieg der Lichtstreuintensität zwischen 0.2 M und 0.8 M GdnHCl erfolgt eine Abnahme innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 1.0 M bis 2.0 M GdnHCl. Ab 2 M verändert sich die Intensität nicht mehr. Der Denaturierungsansatz mit pH 7 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigt eine etwas geringere Stabilität. Die Abnahme der Lichtstreuintensität beginnt ab 0.8 M GdnHCl somit bei niedrigeren Konzentrationen. Die Lichtstreuintensität liegt bis 1.5 M GdnHCl deutlich unter der der übrigen Ansätzen. Der zum Teil leichte Anstieg der Lichtstreuintensitäten bei 3 M GdnHCl könnte auf die Bildung von Aggregaten zurückzuführen sein. Auch dieser Anstieg konnte von Hoff [1990] bei Lichtstreuexperimenten mit *Eurypelma*-Hämocyanin verzeichnet werden.

3.4.2 Einfluß von GdnHCl auf das aktive Zentrum

Oxygeniertes Hämocyanin zeigt neben einem für Proteine typischen Absorptionsmaximum bei 280 nm, das von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan (280 nm) und Tyrosin (274 nm) hervorgerufen wird, eine Absorption bei 340 nm. Diese Absorption wird durch den Kupfer-Sauerstoff-Komplex des aktiven Zentrums hervorgerufen und verschwindet bei Deoxygenierung des Hämocyanins.

Damit stellt die OD bei 340 nm ein Maß für die Beladung mit Sauerstoff und somit für die Intaktheit des aktiven Zentrums dar.

Für die Messungen wurde Hämocyanin (c_{Hc} : 0.2 mg/ml) in 0.1 M Tris-HCl Puffer pH 7.8 mit 5 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2 bei unterschiedlichen GdnHCl-Konzentrationen von 0-5 M bei 20°C für 4 Minuten und 24 h inkubiert. Abbildung 3.8 auf der folgenden Seite zeigt die Absorptionsspektren des 24-meren Hämocyanins in Anhängigkeit von GdnHCl nach 24 Stunden.

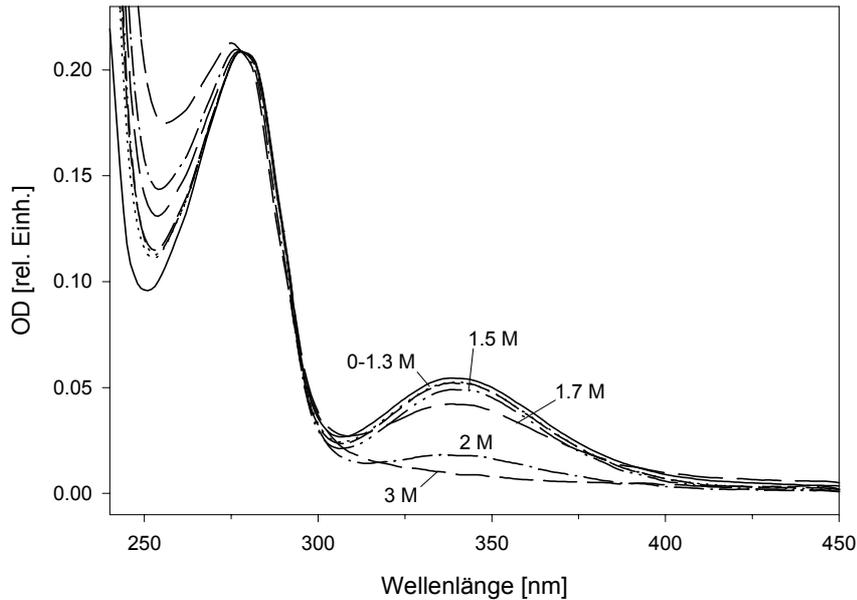


Abb. 3.8 : Absorptionsspektren von 24-merem *Eurypelma*-Hämocyanin in GdnHCl.

Die Spektren wurden auf 280 nm normiert. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.2 mg/ml. Die Messungen wurden in 0.1 M Tris-HCl Puffer pH 7.8 mit 5 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2 bei unterschiedlichen GdnHCl-Konzentrationen durchgeführt. Die Spektren wurden bei 20°C gemessen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

Abb. 3.9 zeigt die Änderung der Absorption bei 340 nm in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach 4 Minuten und nach 24 Stunden.

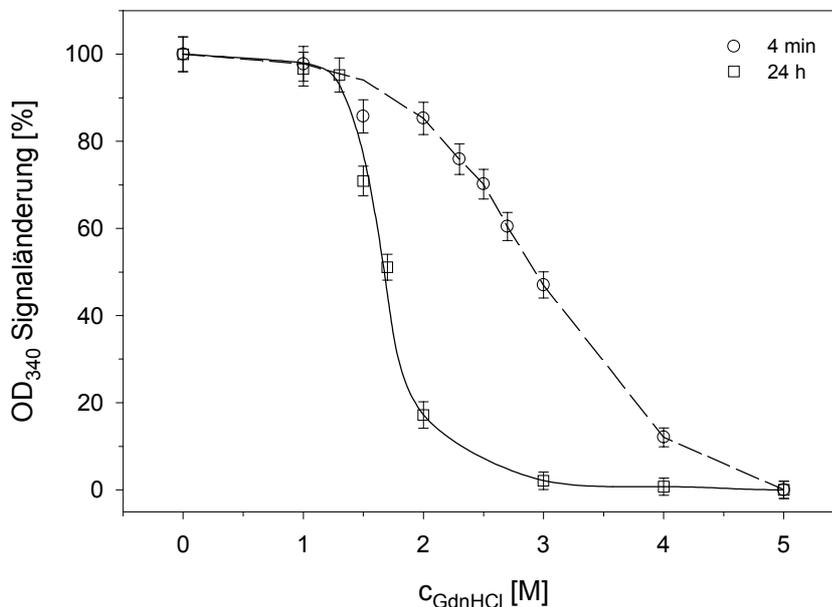


Abb 3.9: Relative Änderung der Absorption des oligomeren Hämocyanins bei 340 nm unter dem Einfluß von GdnHCl nach 4 min und nach 24 h.

Die 24 h-Werte stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar. Bei der 4 Minuten-Messung handelt es sich um eine Einzelmessung. Die Werte wurden auf den Anfangswert normiert. (Bedingungen siehe Abb. 3.8). Die Fehler setzen sich aus dem Signalausgang und dem experimentellen Fehler zusammen.

Nach 4 Minuten beginnt die Deoxygenierung ab etwa 1.5 M GdnHCl und ist erst ab 4 M GdnHCl weitestgehend abgeschlossen. Die größte Abnahme von etwa 85% auf 12% der O₂-Beladung findet zwischen 2 M und 4 M GdnHCl statt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit findet die Abnahme in einem deutlich kleineren Konzentrationsbereich ab einer GdnHCl-Konzentration von 1.3 M GdnHCl statt. Die größte Abnahme der Oxygenierung des Hämocyanins von 95% auf etwa 17% kann man innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereiches bis 2 M GdnHCl beobachten.

3.4.3 Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Das Fluoreszenzeigenschaften des 24-meren Hämocyanins wurde in Gegenwart verschiedener GdnHCl-Konzentrationen untersucht. Es soll Aufschluß über das Denaturierungsverhalten des oligomeren Hämocyanins in Anwesenheit von GdnHCl geben. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzspektren bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubationszeit.

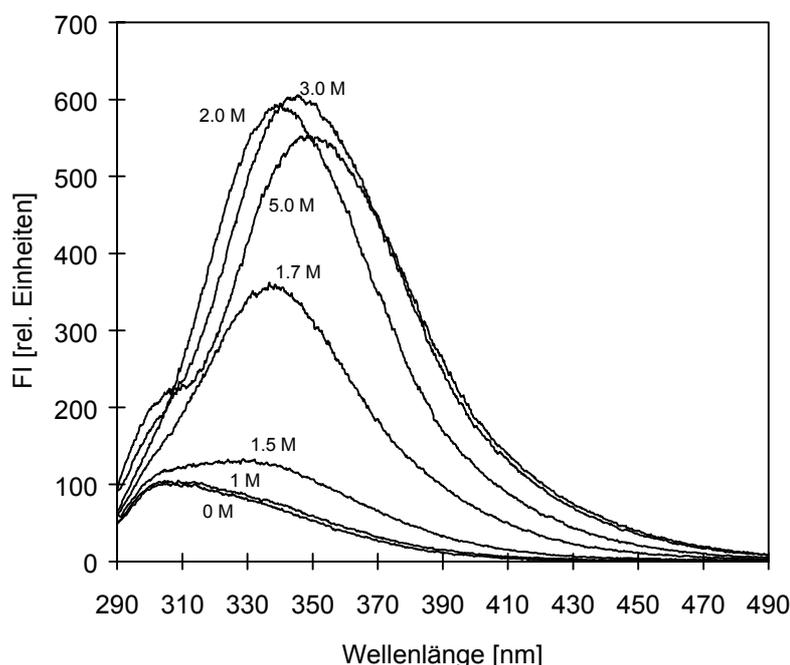


Abb. 3.10: Fluoreszenzemission des 24-meren *Eurypelma*-Hämocyanins bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen nach 24 Stunden.

Die Anregungswellenlänge war 280 nm. Die Spektren wurden bei 20°C aufgenommen. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.05 mg/ml.

Abb. 3.11 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten bei maximaler Emissionswellenlänge und des Fluoreszenzemissionsmaximums des 24-meren Hämocyans in Anwesenheit verschiedener GdnHCl-Konzentrationen nach 4 Minuten und 24 Stunden.

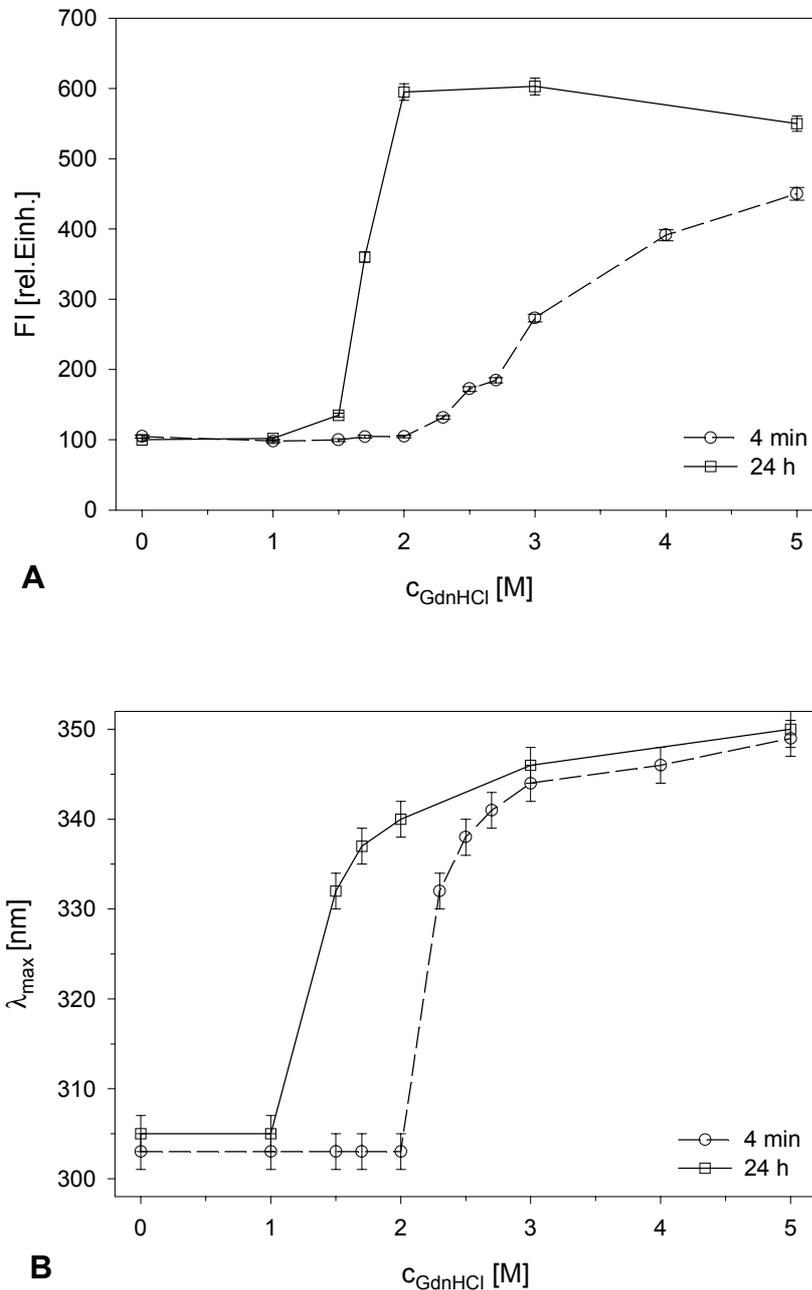


Abb. 3.11: Fluoreszenzintensitäten und Verlauf des Fluoreszenzemissionsmaximums des 24-meren *Erypelma*-Hämocyans in Abhängigkeit von GdnHCl.

[A] Intensitäten bei maximaler Emissionswellenlänge und [B] Verlauf von λ_{max} nach 4 min und 24 h Inkubationszeit in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration. Die Fehler setzen sich aus dem Rauschen der Spektren und dem angenommenen Pipettierfehler von 2% zusammen. Übrige Bedingungen siehe Abb. 3.10.

Das 24-mer native Hämocyanin zeigt nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm ein Fluoreszenzmissionsmaximum bei etwa 305 nm (Abb. 3.10). Mit steigender Denaturierungsmittelkonzentration wird die Löschung der Tryptophanfluoreszenz aufgehoben und die Fluoreszenzintensität bei 335 nm nimmt zu (Abb. 3.10; Abb. 3.11). Nach 4 Minuten beginnt der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei λ_{\max} ab 2.3 M GdnHCl (Abb. 3.11 A). Dieser Anstieg ist zunächst auf die Dissoziation des 24-mers zurückzuführen, was am Verlauf von λ_{\max} zu erkennen ist (Abb. 3.11 B), da sowohl das Emissionsmaximum des deoxygenierten 24-mers als auch das eines Untereinheitengemisches bei 335 nm liegt (Abb. 4.3., 4.11). Nach 24 h erfolgt die Dissoziation bereits bei 1.5 M GdnHCl. Ab 1.7 M GdnHCl zeigt die Verschiebung der Wellenlänge bei λ_{\max} in den längerwelligen Bereich die zunehmende Denaturierung der Untereinheiten an (Abb. 3.11 B). Das Emissionsmaximum bei einer Konzentration von 5 M GdnHCl liegt sowohl nach 4 min als auch nach 24 h bei 348 nm und zeigt die fortgeschrittene Denaturierung an.

3.4.4 Stabilität der Sekundärstruktur in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Zur Untersuchung der Stabilität der Sekundärstruktur wurde 24-meres Hämocyanin von *Eurypelma californicum* für 4 Minuten und 24 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen von GdnHCl inkubiert und danach ein CD-Spektrum von 210 nm bis 260 nm aufgenommen (Abb. 3.12).

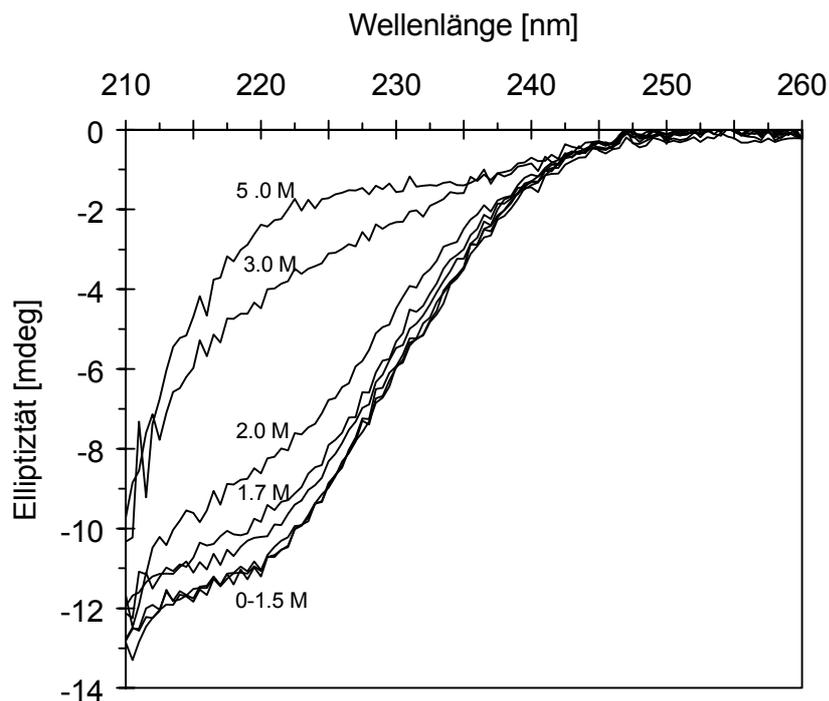


Abb 3.12: CD-Spektren des 24-meren *Eurypelma*-Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach 24 Stunden.

Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.2 mg/ml. Die Spektren wurden bei 20°C aufgenommen.

Die von α -Helices dominierten Spektren zeigen mit zunehmender Konzentration des Denaturierungsmittels eine Abnahme des Minimums der Elliptizität bei 222 nm (Abb. 3.12). Abb. 3.13 auf der gegenüberliegenden Seite zeigt den Verlauf der Elliptizität $[\theta]$ bei 222 nm in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration.

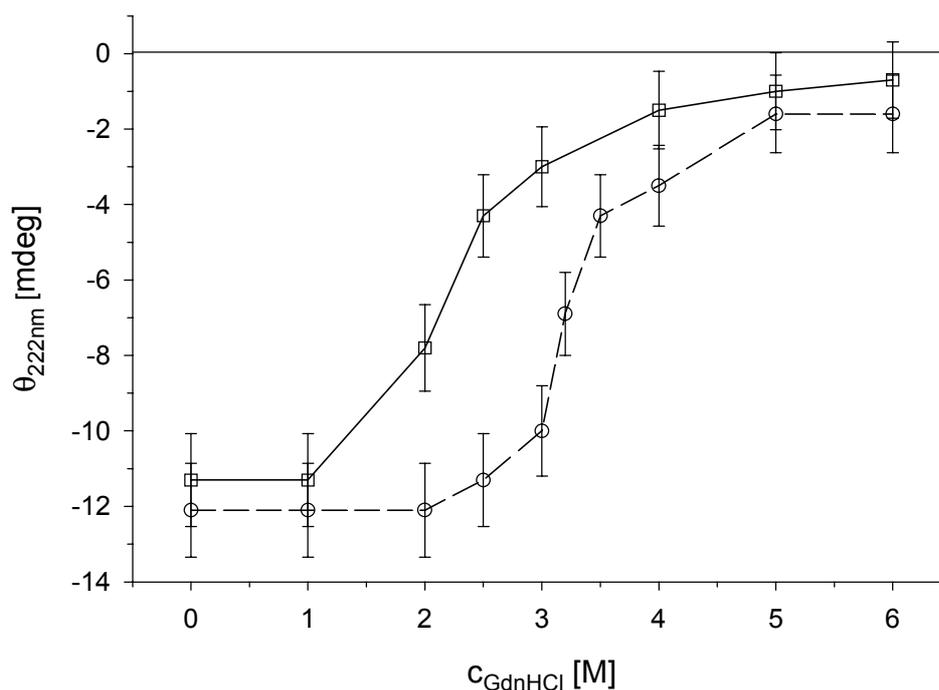


Abb. 3.13: Elliptizität [θ] des 24-meren *Eurypelma*-Hämocyanins bei 222 nm in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach 4 min und nach 24 h.

Bedingungen siehe Abb. 3.12. Die Fehler setzen sich aus dem Signalrauschen und dem angenommenen Pipettierfehler von 2 % zusammen.

Die Denaturierung der Sekundärstrukturelemente beginnt nach 4 Minuten ab 2.5 M GdnHCl (Abb. 3.13) und bei 5 M GdnHCl wird bereits ein Plateauwert erreicht, der sich nicht signifikant von dem 24 h-Wert unterscheidet. Nach 24 h beginnt der Verlust der Sekundärstruktur ab einer Konzentration von 1.7 M GdnHCl und ist bei 4 M GdnHCl weitestgehend abgeschlossen.

Selbst bei den hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen wie 6 M GdnHCl liegt das Signal mit -0.7 mdeg bei 6 M GdnHCl noch leicht im negativen Bereich. Es ist somit davon auszugehen, daß zumindest noch Reste von Sekundärstrukturelementen vorhanden sind und kein reines Zufallsknäuel vorliegt, für welches die Elliptizität bei 222 nm im positiven Bereich liegt [Davidson and Fasman, 1967, 1969].

3.5 Stabilität der Untereinheit e der Spinne *Eurypelma californicum*

3.5.1 Einfluß von GdnHCl auf das aktive Zentrum der Untereinheit e

Neben dem Einfluß von GdnHCl auf den Oxygenierungsgrad und die Stabilität des oligomeren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* wurde dieser auch auf der Ebene einer einzelnen Untereinheit am Beispiel von Untereinheit e untersucht.

Alle Proben waren vor Beginn der Denaturierung vollständig oxygeniert und wiesen ein Verhältnis der Absorption von 280 nm zu 340 nm von 4.75 ± 0.25 auf. Für die Messungen wurde gereinigte Untereinheit e bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen inkubiert und die Absorption bei 340 nm nach 4 min, 1 h und 24 h gemessen (Abb. 3.14).

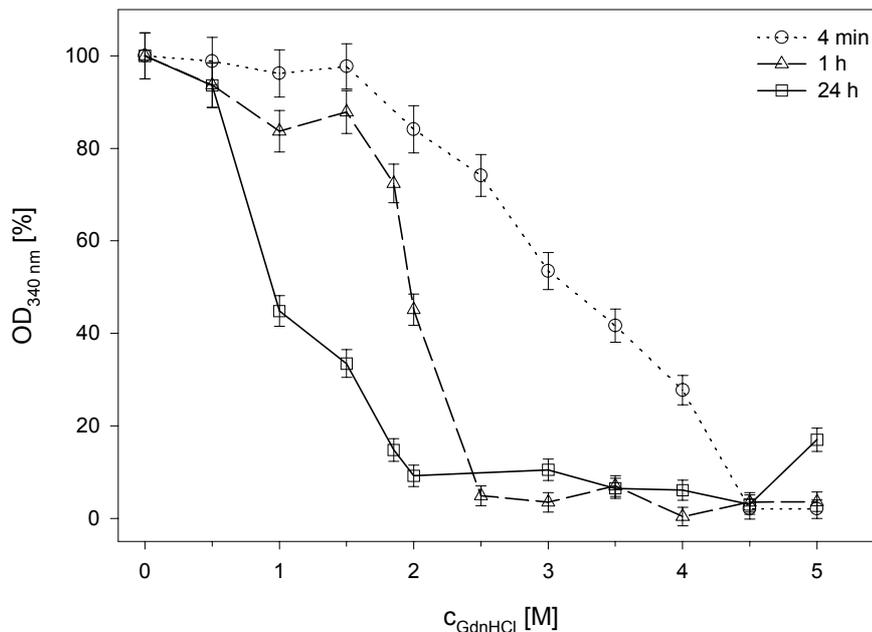


Abb. 3.14: Relative Änderung der Absorption bei 340 nm von Untereinheit e unter Einwirkung von GdnHCl nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden.

Die Werte der OD₃₄₀ wurden auf den Anfangswert bei 0 M GdnHCl normiert. Die drei Kurven stellen das Mittel aus jeweils drei Einzelmessungen dar. Die Messungen erfolgten in 0.05 M GlyOH Puffer, pH 9.6 bei 20°C. Die Konzentration der Untereinheit e betrug 0.1 mg/ml.

Die Beobachtung der Absorption bei 340 nm zeigt, daß bereits nach 4-minütiger Inkubationszeit die Sauerstoffbeladung mit zunehmender Denaturierungsmittelkonzentration abnimmt. Die Änderung der OD₃₄₀ tritt ab 1.5 M GdnHCl ein. Sie nimmt bis zu einer Konzentration von 4.5 M GdnHCl fast linear ab und ändert sich dann

nicht mehr. Die Deoxygenierung ist hier bereits vollständig. Eine stabile Zwischenstufe ist nicht zu erkennen. Nach einer Stunde Inkubationszeit beginnt die Abnahme der OD_{340} bei etwa 1 M GdnHCl (Abb. 3.14). Der Konzentrationsbereich in dem der Übergang stattfindet, ist weitaus kleiner und die Deoxygenierung ist bereits bei 2.5 M GdnHCl abgeschlossen. Nach 24 h verschiebt sich der Beginn der Abnahme der OD_{340} (Abb. 3.14) nach 0.5 M GdnHCl. Die Deoxygenierung ist bei 2 M GdnHCl abgeschlossen.

3.5.2 Fluoreszenzeigenschaften der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Um die Entfaltung der Untereinheit \underline{e} zu verfolgen, eignet sich die Methode der Fluoreszenzspektroskopie. Hierfür wurden zunächst Fluoreszenzemissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und 295 nm aufgenommen und der Einfluß des Denaturierungsmittels auf die Fluoreszenzemission und die Verschiebung des Emissionsmaximums von Untereinheit \underline{e} verfolgt. Diese Experimente sollten Aufschluß sowohl über die beginnende Denaturierung als auch über die fortschreitende Entfaltung der Untereinheit geben (Abb. 3.15; 3.16).

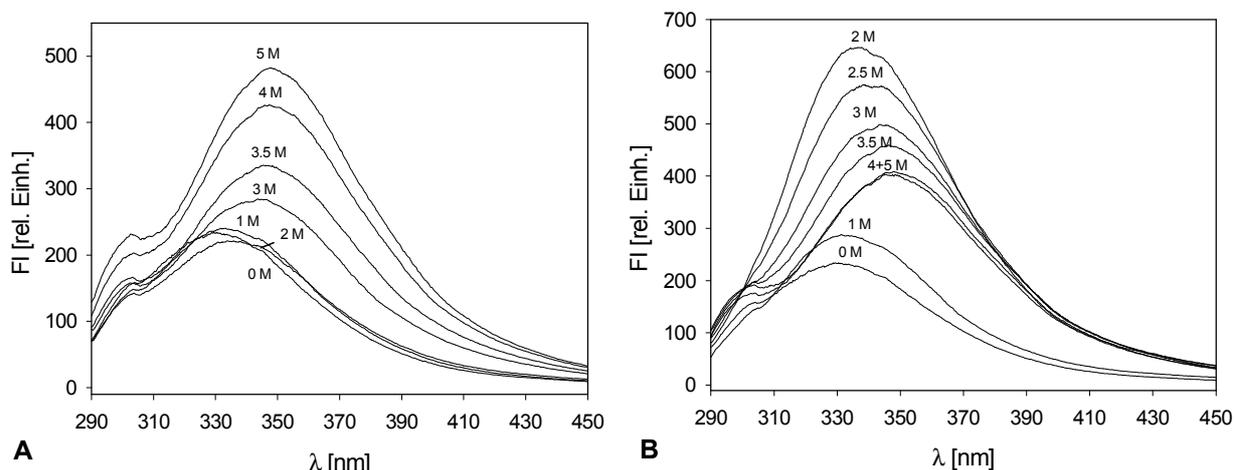


Abb. 3.15: Fluoreszenzemissionsspektren von Untereinheit \underline{e} unter dem Einfluß von GdnHCl nach 4 min (A) und 24 h (B).

Die Spektren wurden bei 280 nm angeregt. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.05 mg/ml. Die Spektren wurden in 0.05 M GlyOH Puffer mit pH 9.6 bei 20°C aufgenommen.

3. Ergebnisse

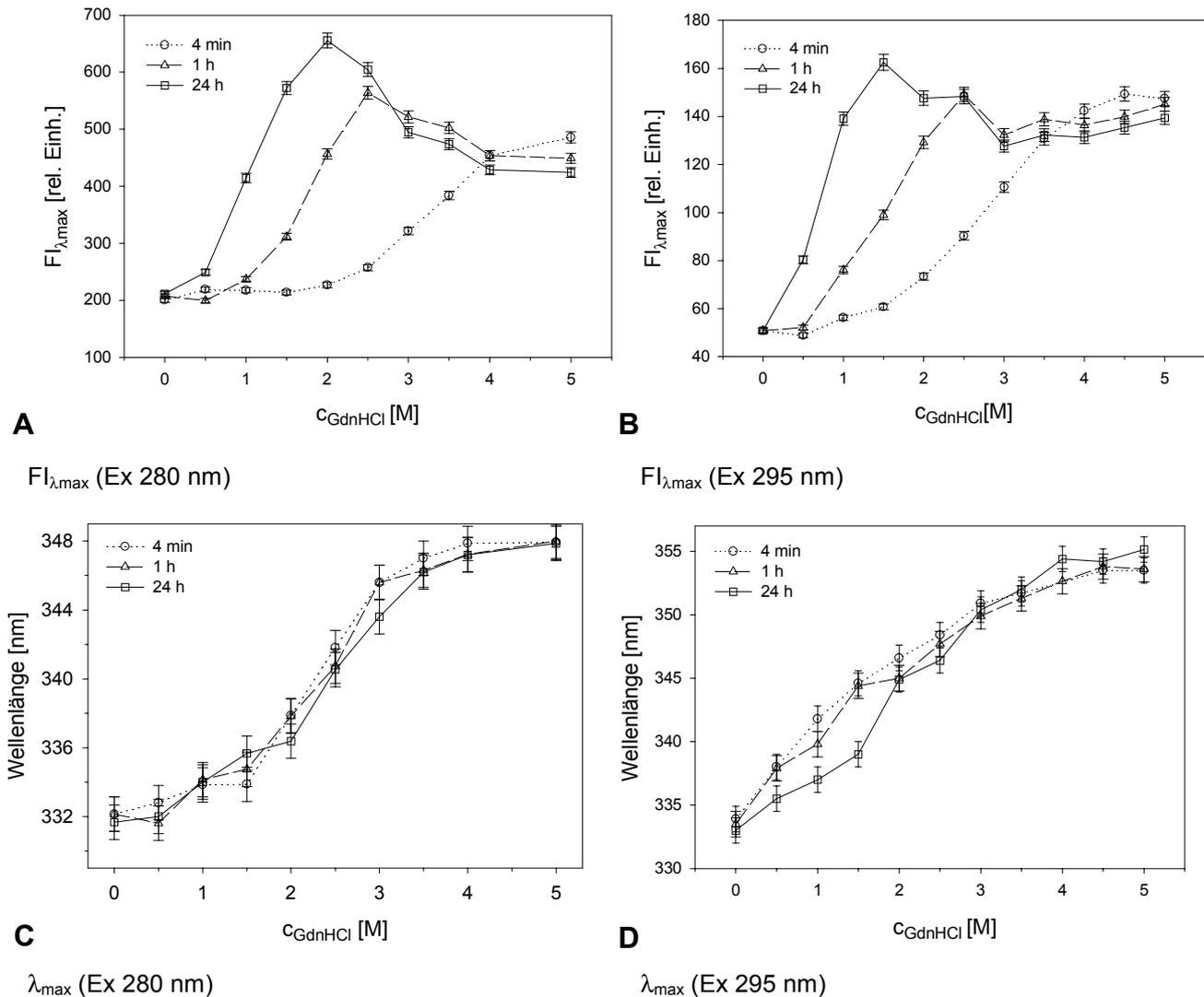


Abb.: 3.16: $FI_{\lambda_{\max}}$ (A, B) und λ_{\max} (C, D) in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration und dessen Einwirkungsdauer, angeregt bei 280 nm und 295 nm.

Sonstige Bedingungen wie unter Abb. 3.15. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bzw. der Wellenlängen aus drei Messungen.

Bei Anregung mit 280 nm erfolgt nach 4 Minuten ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei maximaler Emissionswellenlänge (λ_{\max}) ab einer Konzentration von 2 M GdnHCl und erreicht bei 5 M GdnHCl ein Maximum (Abb. 3.15). Die Intensität steigt hierbei um den Faktor 2.5. Mit dem Anstieg der Fluoreszenzintensität geht eine Verschiebung des Emissionsmaximums der nativen Untereinheit \underline{e} von 333 nm nach 347nm-348 nm (Abb. 3.16) einher. Nach 1 Stunde Inkubation erreicht die Fluoreszenzintensität bei 2.5 M ein Maximum. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Intensität wieder ab und geht bei 4 M in ein Plateau über (Abb. 3.15). Auch nach 24 Stunden Inkubationszeit ist der prinzipielle Verlauf der Fluoreszenzintensitäten bei

zunehmenden GdnHCl-Konzentration ähnlich. Lediglich der Anstieg der Intensität beginnt bereits ab 1 M und das Maximum wird bei 2 M GdnHCl erreicht (Abb. 3.16). Die Fluoreszenzintensitäten ändern sich nach einer Stunde ab einer Konzentration von 3 M GdnHCl nicht mehr. Auffällig ist auch, daß sich die Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge von 4 Minuten bis hin zu 24 Stunden nicht mehr ändert.

Zusätzlich zur Anregung bei 280 nm wurde auch bei 295 nm angeregt, um selektiv nur Tryptophane zu erfassen. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität von λ_{\max} nach Anregung mit 295 nm ist dem nach Anregung mit 280 nm ähnlich (Abb. 3.16). Während die Fluoreszenzintensität nach 4 Minuten ab 2 M ansteigt und bei 4.5 M das Intensitätsmaximum erreicht, nimmt die Intensität nach einer Stunde nach Erreichen eines Maximums bei 2.5 M wieder ab und geht bei 4 M GdnHCl in ein Plateau über (Abb. 3.16). Die Verschiebung von λ_{\max} beginnt bereits ab 0.5 M (Abb. 3.16) und erreicht bei etwa 4 M GdnHCl ihr Maximum bei 353-354 nm. Sie ändert sich nach 4 Minuten Inkubationszeit nicht mehr (Abb. 3.16). Auch nach 24 Stunden Inkubation erhält man sehr ähnliche Ergebnisse. Lediglich der Anstieg des Signals und das Erreichen des Maximums erfolgt bei geringeren GdnHCl-Konzentrationen (Abb. 3.16).

Der Vergleich zeigt, daß der Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 280 nm oder 295 nm sehr ähnlich ist und sich lediglich die absoluten Intensitäten unterscheiden. Nach Erreichen eines Intensitätsmaximums findet bei höheren Konzentrationen zunächst eine Abnahme der Fluoreszenzintensität statt, die dann in ein Plateau übergeht. Das Emissionsmaximum nach Anregung bei 295 nm ist gegenüber der Messung mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm um 5-6 nm in den längerwelligen Bereich verschoben und liegt bei 353-354 nm (Abb. 3.16). Ab einer Konzentration von 3 M GdnHCl ändern sich die Intensitäten zwischen 1 Stunde und 24 Stunden nicht mehr (Abb. 3.16). Die Abnahme der Intensität nach Erreichen des Maximums hängt davon ab, ob man selektiv die Tryptophane bei 295 nm oder bei 280 nm Tryptophane und Tyrosine gemeinsam anregt. Im letzten Fall fällt die Abnahme mit 36 % etwa doppelt so hoch aus, wie bei selektiver Anregung der Tryptophane (Abb. 3.16). Ferner wird bei hohen GdnHCl-Konzentrationen nach Anregung bei 280 nm eine erhöhte Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm festgestellt (Abb. 3.16). Auffällig ist, daß die Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge unabhängig von der Inkubationsdauer ist.

Um Aufschluß über den Verlauf der Denaturierung zu bekommen, wurde die Fluoreszenzintensität bei maximaler Emissionswellenlänge gegen die Verschiebung von λ_{max} aufgetragen (Abb. 3.17).

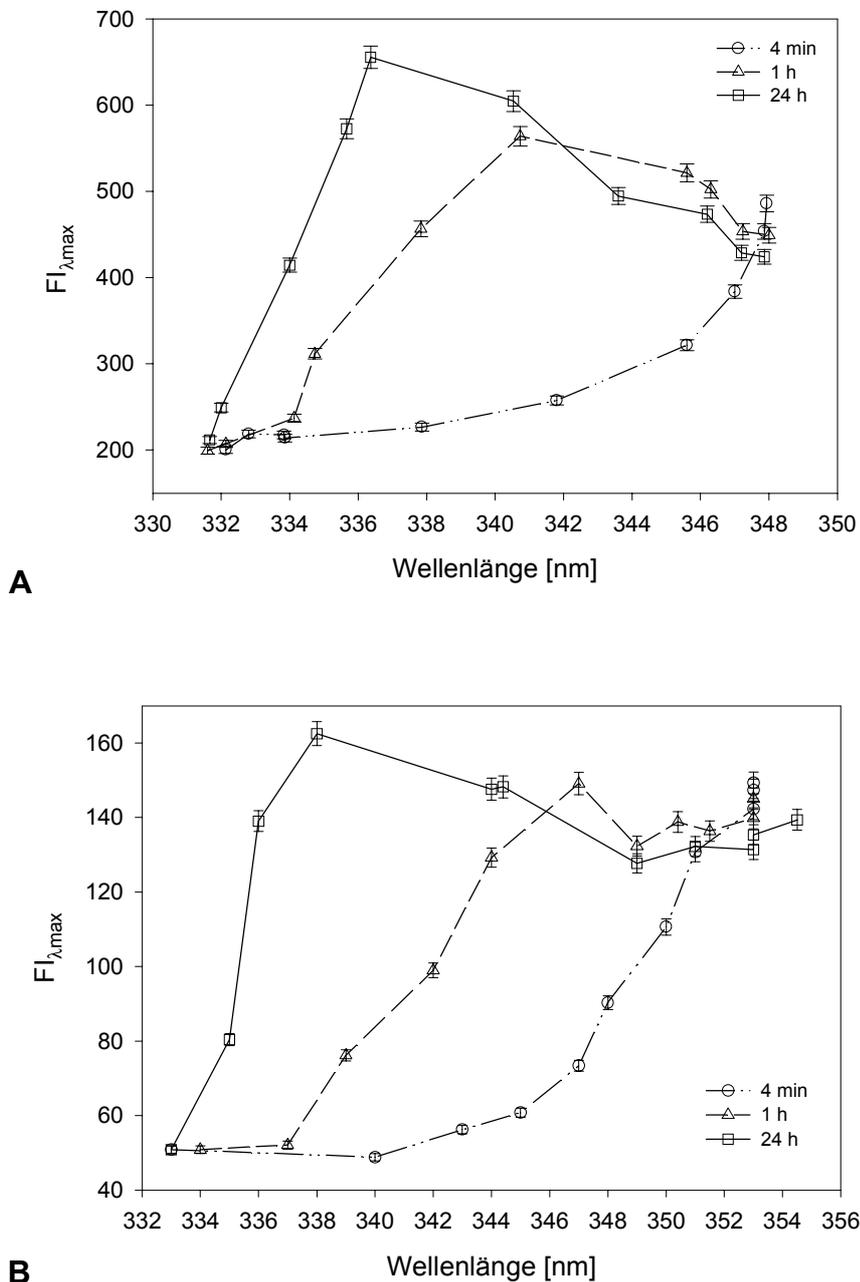


Abb. 3.17: Fluoreszenzintensität bei maximaler Emissionswellenlänge aufgetragen gegen λ_{max} in Abhängigkeit von GdnHCl.

Die Anregung erfolgte bei 280 nm (A) und 295 nm (B). Sonstige Bedingungen wie unter Abb. 3.15. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bzw. der Wellenlängen aus drei Messungen.

Vergleicht man den Anstieg der Fluoreszenzintensität direkt mit der Verschiebung der Wellenlänge so zeigt sich, daß nach 4 min Inkubationszeit eine Verschiebung der Wellenlänge beginnt, bevor die Fluoreszenzintensität signifikant ansteigt (Abb. 3.17). Dagegen geht nach längeren Inkubationszeiten von 1 h bis 24 h der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Verschiebung der Wellenlänge einher. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß zunächst die äußeren Molekülbereiche von der Denaturierung betroffen sind, bevor das aktive Zentrum im Inneren von Domäne II entfaltet wird und die Tryptophanfluoreszenz nicht mehr gelöscht werden kann.

3.5.3 Fluoreszenzanisotropie in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Um diesem Hinweis nachzugehen, wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen durchgeführt. Sie sollten über die Änderung der Beweglichkeit der Tryptophane weiteren Aufschluß über den Beginn der Auffaltung, vor allem der Domäne II geben. Faktoren, die die Anisotropie und somit die Polarisierung des von der Probe emittierten Lichtes beeinflussen können, sind neben den Winkeln zwischen Absorptions- und Fluoreszenzübergangsdipolmoment, die Rotation des Proteins in der Lösung bzw. die des Fluorophors relativ zum Protein und der Förster-Transfer. Die Rotationskorrelationszeit (τ_c) für globuläre Proteine liegt bei etwa 1 ns pro 2400 Da (Cantor and Schimmel, 1981). Nach Boteva et al. [1993] ist die Fluoreszenzlebensdauer (τ) im oxygenierten Hämocyanin (24-mer bzw. Untereinheiten a, d, e) von schnellen Komponenten mit Lebensdauern zwischen 0.1 ns und 2.7 ns dominiert. Die langsameren Komponenten mit $\tau = 6.7 \text{ ns} - 8.9 \text{ ns}$ tragen nach Aussage der Autoren lediglich mit etwa 6 % zur Gesamtfluoreszenz bei. Die Rotationskorrelationszeit liegt somit je Oligomerisierungsgrad zwischen ein und zwei Größenordnungen über der Fluoreszenzlebensdauer. Die Rotation des *Eurypelma*-Hämocyanins in Lösung spielt somit bei der Bestimmung der Anisotropie eine untergeordnete Rolle.

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich das 24-mer Hämocyanin, ein Untereinheitengemisch und einzelne Untereinheiten im nativen Zustand in ihrer Anisotropie unterscheiden. Für die Bestimmung einer geeigneten Anregungswellenlänge wurde die Anisotropie des 24-meres, der nativen und der mit 6 M GdnHCl denaturierten Untereinheit e bestimmt (Abb. 3.18).

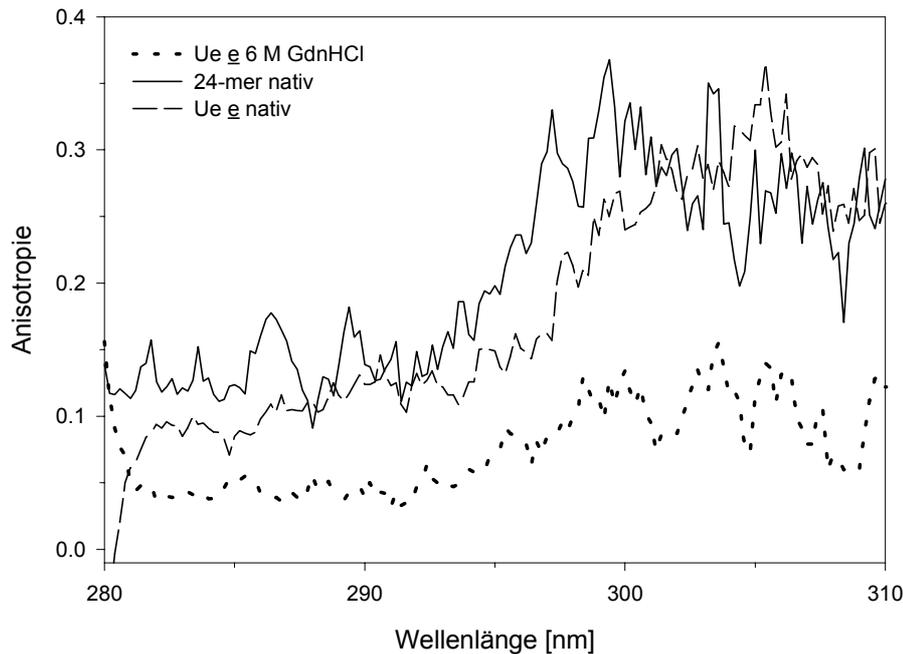


Abb. 3.18: Anisotropieverlauf des nativen 24-meren Hämocyanins und der Untereinheit e im nativen und nach Inkubation in 6 M GdnHCl im denaturierten Zustand.

Die Anregung erfolgte zwischen 280 nm und 310 nm, die Emissionswellenlänge wurde bei 335 nm detektiert. Die Spektren wurden bei 20°C in 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.8 (24-mer) bzw. in 0.05 M GlyOH Puffer, pH 9.6 (Ue_e) aufgenommen. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.05 mg/ml.

Aufgrund dieser Messung wurde für die nachfolgenden Messungen die Anregungswellenlänge bei 290 nm gewählt. Die Anisotropie des 24-meren Hämocyanins unterscheidet sich bei 290 nm im Rahmen des Fehlers nur unwesentlich von der von Untereinheit e . Nach Inkubation von Untereinheit e in 6 M GdnHCl-Lösung sinkt die Anisotropie von 0.12 ± 0.01 auf etwa 0.045 ± 0.005 ab (Abb. 3.18).

Abbildung 3.19 auf der gegenüberliegenden Seite zeigt einen Vergleich der Anisotropie des 24-mers mit einem Untereinheitengemisch und einzelnen Untereinheiten.

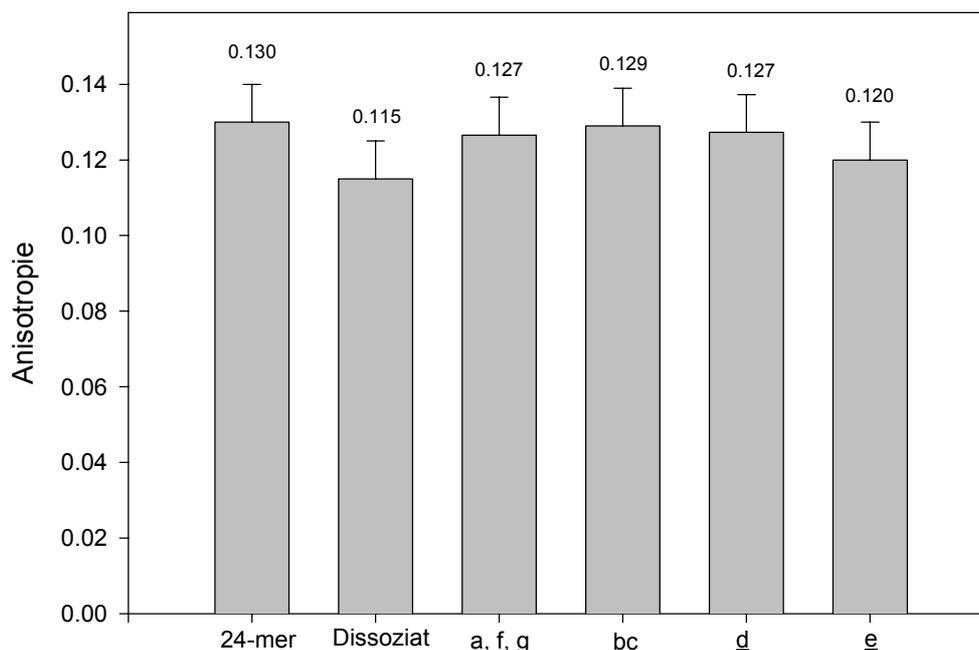


Abb. 3.19: Vergleich der Anisotropie des 24-mers mit einem Untereinheitengemisch, einem Gemisch der Untereinheiten a, g und f, der isolierten Untereinheiten d und e und dem Dimer bc. Die Messungen wurden bei 20°C in 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.8 (24-mer) bzw. in 0.05 M GlyOH Puffer, pH 9.6 (Ue e) durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 290 nm, die detektierte Emissionswellenlänge 335 nm. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.05 mg/ml. Die Fehlerbalken setzen sich aus dem Pipettierfehler und dem Signalrauschen zusammen.

Die Anisotropie des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* liegt zwischen 0.115 ± 0.01 für das Dissoziat und 0.13 ± 0.01 für das native 24-mer.

Der Vergleich der Anisotropie des 24-mers mit dem Dissoziat und einzelnen Untereinheiten zeigt im Rahmen der experimentellen Fehler nur geringe Unterschiede (Abb. 3.19). Somit kann eine Beeinflussung der Beweglichkeit der Tryptophane durch die Dissoziation nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuch sollte nun bei Untereinheit e der Verlauf der Anisotropie in Abhängigkeit von GdnHCl verfolgt werden, um den Einfluß der beginnenden Denaturierung auf die Tryptophane zu untersuchen. Abbildung 3.20 auf der folgenden Seite zeigt den Verlauf der Anisotropie in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach 4 Minuten und nach 1 Stunde.

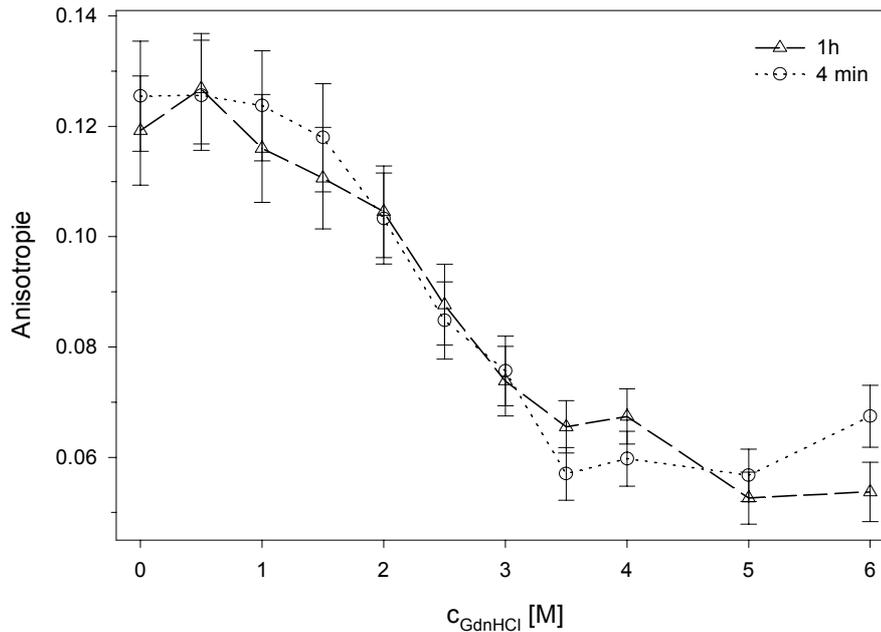


Abb. 3.20: Fluoreszenzanisotropie von Untereinheit e in Abhängigkeit von GdnHCl.

Die Anregung erfolgte bei 290 nm, die Emission wurde bei 335 nm detektiert. Sonstige Bedingungen siehe Abb. 3.18.

Unabhängig von der Inkubationszeit (4 min, 1 h) nimmt die Anisotropie ab einer Konzentration von 1.5 M bis 3.5 M GdnHCl von 0.12 ± 0.01 auf etwa 0.06 ± 0.005 ab (Abb. 3.20).

Ein Vergleich der Abnahme der Anisotropie (Abb. 3.20) mit der Zunahme der Fluoreszenzintensität bei maximaler Emissionswellenlänge (λ_{max}) nach 4 min (Abb. 3.16) zeigt, daß die Änderung der Anisotropie bei deutlich geringeren GdnHCl-Konzentrationen beginnt. Dies bestätigt die Ergebnisse der Verschiebung von λ_{max} . Die Denaturierung beginnt somit an den äußeren Molekülbereichen, bevor der Anstieg der Fluoreszenzintensität, respektive die Änderung des Sauerstoff-Beladungsgrades, die Denaturierung des aktiven Zentrums der Untereinheit anzeigt.

3.5.4 Tryptophan-Fluoreszenzlöschung im oxygenierten Hämocyanin von *Eurypelma californicum* durch Förster-Transfer

Für mehrere Hämocyanine wurde ein linearer Zusammenhang der Menge des gebundenen Sauerstoffs mit der Absorption bei 340 nm und der starken Fluoreszenzlöschung gezeigt [Shaklai and Daniel, 1970; Loewe, 1978; Richey et al., 1984]. Aufgrund dieser Tatsache, und wegen der Bedeutung der Tryptophanfluoreszenz für die Interpretation des Denaturierungsverhaltens des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*, wurde in enger Zusammenarbeit mit Wolfgang Erker (Institut für Molekulare Biophysik) die Ursache für die starke Löschung der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Hämocyanin von *Eurypelma californicum* [Loewe, 1978; Richey et al., 1984] genauer untersucht. Insbesondere sollte geklärt werden, inwieweit die Fluoreszenzlöschung auf einen Multi-Donor-Multi-Akzeptor-Prozeß auf Basis des Förster-Transfers zurückgeht.

Hierzu wurden mehrere Größen bestimmt (Pkt. 2.12.3). Für die Berechnung des Überlappungsintegrals $[J]$ und der Quantenausbeute $[\Phi]$ wurden jeweils Absorptions- und Fluoreszenzspektren im oxygenierten und deoxygenierten Zustand des Hämocyanins gemessen.

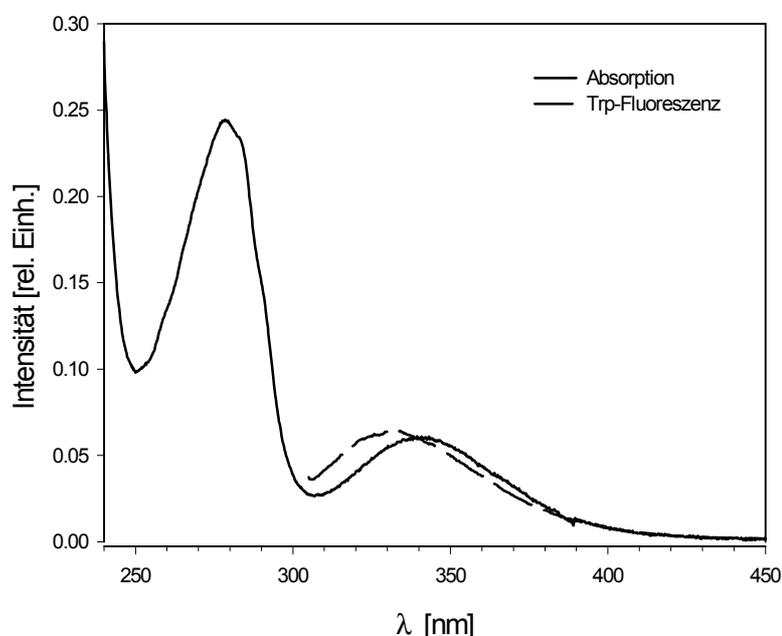


Abb. 3.21: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum des oxygenierten 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum zeigt eine große Überlappung mit dem Absorptionsspektrum. Die Spektren wurden in Tris-HCl, pH 7.8, bei 20°C aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm.

Die Berechnung des Überlappungsintegrals [J] (Glg. 2.12.IV) aus den Absorptions- und Fluoreszenzspektren (Abb. 3.21) ergab $1.716 \cdot 10^{14}$ ($\text{nm}^4/\text{M} \cdot \text{cm}$) für das 24-mere Hämocyanin und $1.723 \cdot 10^{14}$ ($\text{nm}^4/\text{M} \cdot \text{cm}$) für ein Untereinheitengemisch. Mit den Ausgangsgrößen (Pkt. 2.12.1) wurde der Försterabstandes $[R_0]$ mit 2.4 nm berechnet (Glg. 2.12.VI).

Für das Ausmaß der Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch Förstertransfer, ist die Lage und Entfernung der Tryptophane zu den aktiven Zentren relevant (Glg. 2.12.VI). Die Abstände der Tryptophane zu den aktiven Zentren wurden auf der Grundlage der Röntgenstruktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994] bestimmt (Pkt. 2.12.3). Mit der Kenntnis der Abstände kann das Ausmaß des Löschprozesses errechnet und mit den gemessenen Werten verglichen werden. Das Ausmaß der Löschung wurde hierbei auf die Quantenausbeute $[\Phi_0]$ (Glg. 2.12.VIII) des deoxygenierten Hämocyanins von 0.0727 bezogen.

Tabelle 3.11 zeigt die Abstände, Quantenausbeuten und das Ausmaß der Löschung der Tryptophane am Beispiel von Untereinheit b von *Eurypelma californicum*.

Trp von Ue <u>b</u>	r ₁ [nm]	r ₂ [nm]	r ₃ [nm]	r ₄ [nm]	r ₅ [nm]	r ₆ [nm]	r ₇ [nm]	Quantenausbeute $[\Phi]$	Löschung %
174	4.650	1.173	5.212	7.416	5.730	5.964	5.280	0.0010	99
176	5.286	0.770	5.128	7.439	4.977	5.817	4.580	0.0001	100
184	5.884	1.681	4.941	7.985	5.532	6.922	4.025	0.0076	90
326	4.281	1.357	3.260	5.932	4.389	5.527	5.900	0.0023	97
363	4.242	0.916	3.915	5.807	3.849	4.659	5.908	0.0002	100
538	5.239	1.320	5.850	7.546	5.102	5.285	5.035	0.0020	97
612	6.803	2.873	6.320	7.814	3.854	5.262	4.745	0.0509	30

Tab. 3.11: Abstände, Quantenausbeuten und Ausmaß der Löschung der Tryptophane von Untereinheit b von *Eurypelma californicum* und innerhalb des 24-mers zwischen den Untereinheiten b und c.

Grundlage ist die die Struktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [1oxy.pdb; Magnus et al., 1994] und das Alignment der Sequenz der Untereinheiten von *Eurypelma californicum* mit der Sequenz von Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [Voit et al., 2000]. r₂ stellt die Abstände der Tryptophane zum aktiven Zentrum innerhalb der Untereinheit b dar, r₁ und r₃-r₆, die Abstände der Tryptophane zu den aktiven Zentren der anderen Untereinheiten innerhalb des Hexamers. r₇ bezeichnet die Abstände zwischen den Untereinheiten b und c auf Basis der Struktur des 24-mers [Decker et al., 1996]. Die Quantenausbeute $[\Phi]$ wurde nach Gleichung 2.12.IV (Pkt 2.12.3) errechnet.

In Tabelle 3.12 sind die Abstände der Tryptophane zu den aktiven Zentren innerhalb der Untereinheiten, die Quantenausbeuten und das Ausmaß der Löschung aufgeführt (Legende: siehe folgende Seite).

Unter-einheit	Atom	Trp	Abstand [r] in nm	Quanten-ausbeute [Φ]	Löschung [%]
Ue <u>a</u>	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97
Ue <u>b</u>	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	C _{δ2}	184	1.681	0.0077	89
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	363	0.916	0.0002	100
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97
	C _{δ2}	612	2.873	0.0543	25
Ue <u>c</u>	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	C _{δ2}	184	1.681	0.0077	89
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	363	0.916	0.0002	100
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97
Ue <u>d</u>	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	366	1.186	0.0010	99
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97

Fortsetzung: siehe folgende Seite

Unter- einheit	Atom	Trp	Abstand [r] in nm	Quanten- ausbeute [Φ]	Löschung [%]
Ue e	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	C _{δ2}	184	1.681	0.0077	89
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97
Ue f	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	C _{δ2}	184	1.681	0.0077	89
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97
Ue g	C _δ	33	3.224	0.0622	15
	C _{δ2}	174	1.173	0.0010	99
	C _{δ2}	176	0.770	0.0001	100
	C _{δ2}	184	1.680	0.0077	89
	S _δ	272	1.529	0.0046	94
	C _{δ2}	326	1.357	0.0023	97
	C _{δ2}	363	0.916	0.0002	100
	C _{δ2}	538	1.320	0.0020	97

Tab. 3.12: Abstände, Quantenausbeuten und Löschung der Tryptophane innerhalb der einzelnen Untereinheiten von *Eurypelma californicum*

Grundlage zur Bestimmung der Abstände ist der das Alignment der Untereinheiten von *Eurypelma californicum* mit der Sequenz von Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [Voit et al., 2000] und die Struktur von Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [1oxy.pdb; Magnus et al., 1994]. Die Quantenausbeute wurde nach Gleichung 2.12.IV Pkt 2.12.3 errechnet. Grau unterlegt sind Atome der Aminosäuren des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*, die gegenüber den Tryptophanen des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* nicht konserviert sind. Hier wurden die Atome der homologen Positionen verwendet.

In Abb. 3.22 auf der gegenüberliegenden Seite ist die Verteilung der Tryptophan-Kupfer-Abstände innerhalb der Untereinheiten (A) und innerhalb des Oligomers (B) in einem Balkendiagramm dargestellt.

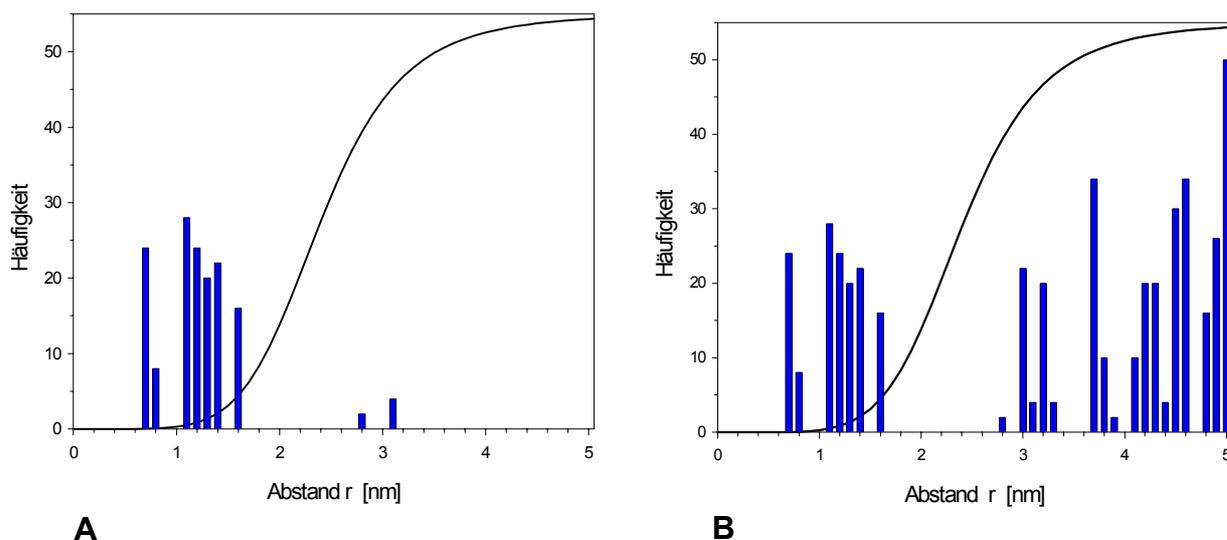


Abb. 3.22: Verteilung der Tryptophan-Kupfer-Abstände innerhalb der Untereinheiten (A) und innerhalb des Oligomers (B).

Die durchgezogenen Linien geben die Quantenausbeute (Φ) in Abhängigkeit des Abstandes (r) mit einem R_0 von 2.4 nm an (Glg 2.12.VII). Die Balken stellen die Häufigkeit der in 0.1 nm-Klassen eingeteilten Tryptophane dar.

Innerhalb einzelner Untereinheiten befinden sich fast alle Abstände der Tryptophane zu den aktiven Zentren innerhalb des Försterradius (Abb. 3.22 A). Die Abstände zu den aktiven Zentren anderer Untereinheiten innerhalb des 24-mers liegen größtenteils außerhalb des Försterradius und tragen somit nicht zur Löschung bei (Abb. 3.22 B).

Für die Berechnungen des Ausmaßes der Löschung im Oligomer wurden ausschließlich die Abstände innerhalb der Hexamere und zwischen den Untereinheiten \underline{b} und \underline{c} , die die 12-mere verbinden, in Betracht gezogen. Die übrigen Abstände zwischen den Hexameren sind mit mehr als 5.5 nm wesentlich größer als der Förster-Abstand R_0 von 2.4 nm und können vernachlässigt werden. Das Ausmaß der Löschung (Tab. 3.11, 3.12) zeigt die enge Korrelation mit den Abständen der Tryptophanseitenketten zum jeweiligen aktiven Zentrum.

Ein Vergleich der errechneten und gemessenen Quantenausbeuten und des Grades der Löschung innerhalb des 24-meren Hamocyanins von *Eurypelma californicum*, ausgehend von der oxy- [1oxy.pdb] und der deoxy-Struktur [1lla.pdb] von *Limulus polyphemus* [Magnus et al., 1994; Hazes et al., 1993], ist auf der folgenden Seite in Tabelle 3.13 gezeigt.

	24-mer ausgehend von: L.p. Ue II- oxy-Struktur	24 mer ausgehend von: L.p. Ue II- deoxy-Struktur
[Φ] errechnet	0.0047	0.0049
[Φ] gemessen	0.0055	0.0055
berechnete Löschung [%]	101	101

Tab. 3.13: Errechnete und gemessene Quantenausbeuten des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Vergleich der berechneten und gemessenen Quantenausbeuten, ausgehend von der oxy- [1oxy.pdb] und der deoxy-Struktur [1lla.pdb] der Untereinheit II von *Limulus polyphemus*. Der Grad der Löschung wurde auf die für das 24-meres Hämocyanin ungelöschte Quantenausbeute [Φ_0] von 0.0727 bezogen.

Die Quantenausbeuten [ϕ], die ausgehend von der Struktur der oxygenierten (1oxy.pdb) und der deoxygenierten Untereinheit II (1lla.pdb) von *Limulus polyphemus* errechnet wurden, unterscheiden sich kaum. Die Löschung der Tryptophan-fluoreszenz durch das oxygenierte aktive Zentrum kann somit vollständig durch Förstertransfer erklärt werden.

Abbildung 3.23 auf der gegenüberliegenden Seite zeigt den Försterradius als Kugel um die Mitte der Achse zwischen den beiden Kupferatomen der Untereinheit II des Hämocyanins von *L. polyphemus*. Sie verdeutlicht, wieweit sich der Försterradius ausgehend vom aktiven Zentrum innerhalb der Untereinheit erstreckt .

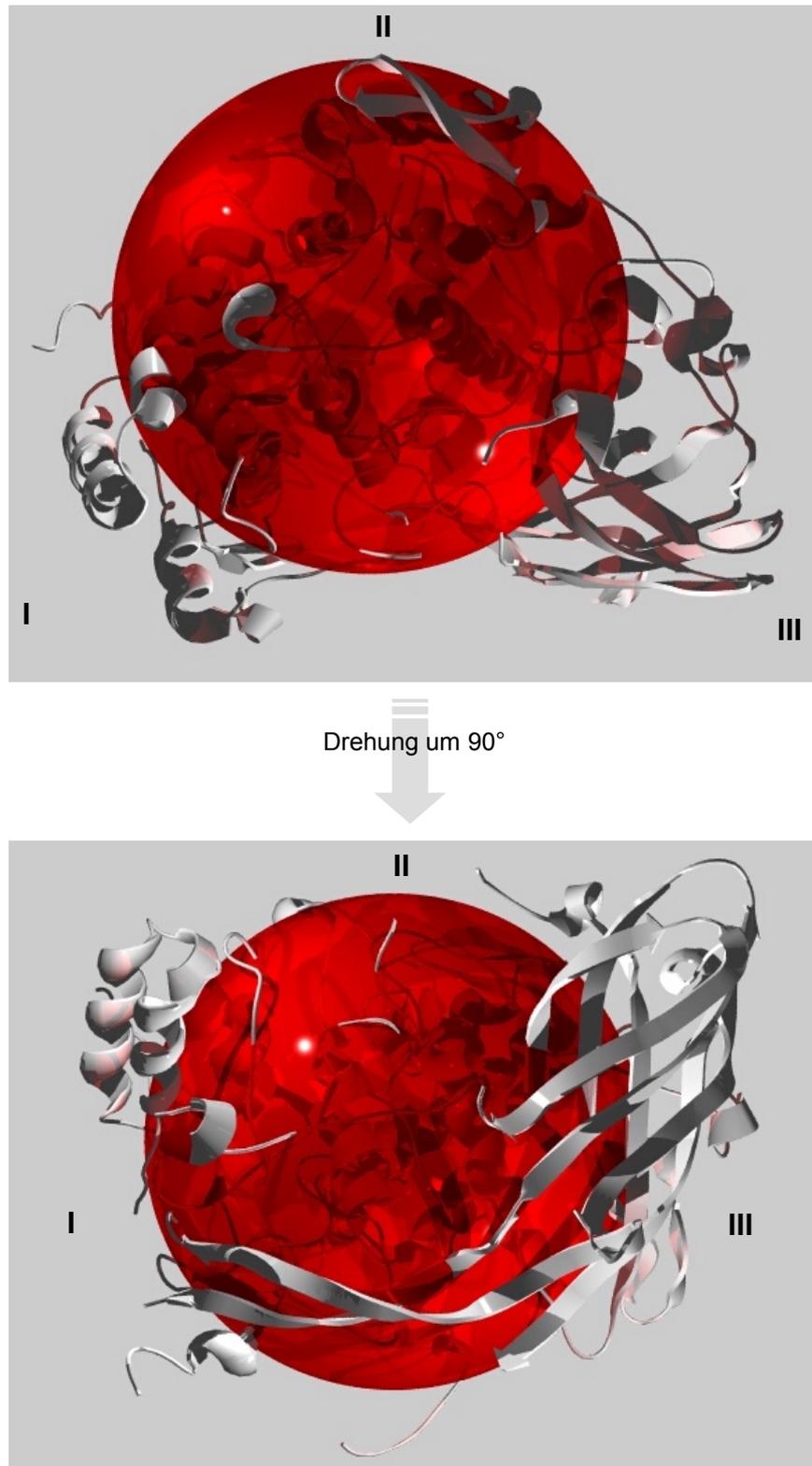


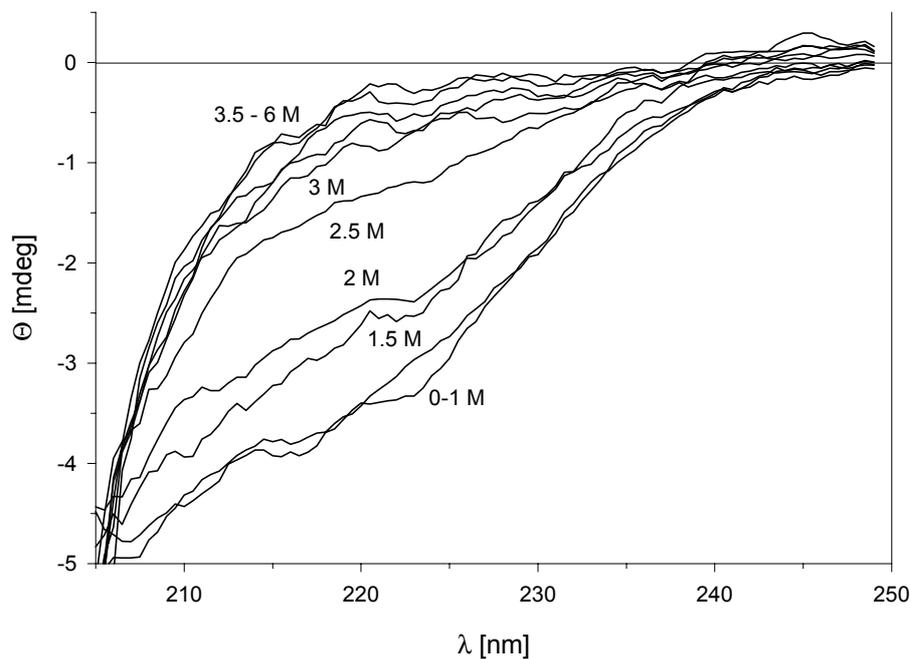
Abb. 3.23: Försterradius von 2.4 nm als Kugel um die Mitte der Achse zwischen den Kupferatomen des aktiven Zentrums der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [1oxy.pdb; Magnus et al., 1994] dargestellt.

Die Kugel mit dem Radius des Försterabstandes (R_0) von 2.4 nm ragt kaum über den Rand der Struktur der Untereinheit hinaus.

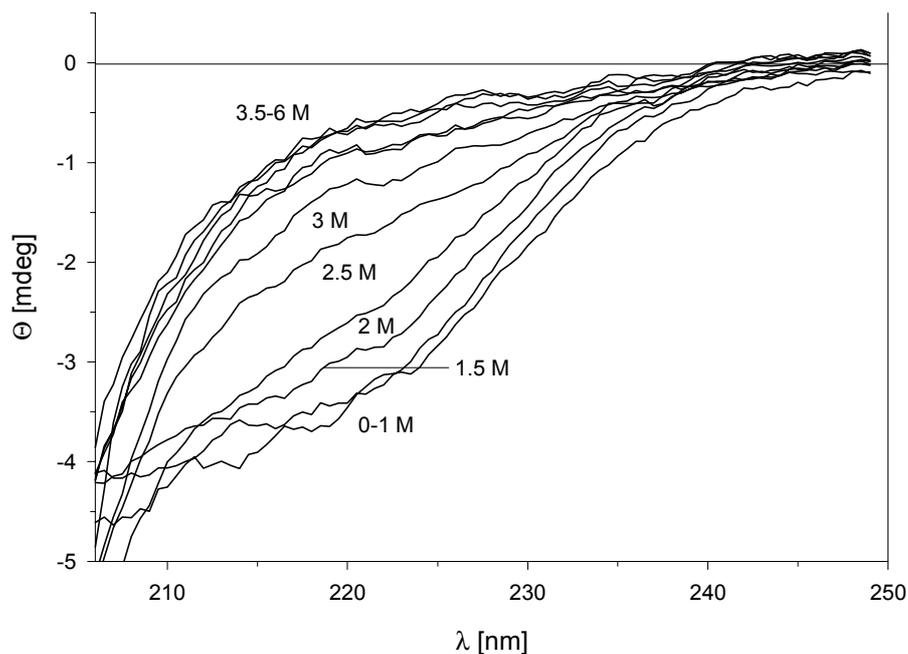
Die Abbildung macht deutlich, daß sich die Löschung weitgehend auf die einzelne Untereinheiten beschränkt und sich nicht auf die übrigen Untereinheiten im Oligomer erstreckt.

3.5.5 Stabilität der Sekundärstruktur der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Zur Untersuchung der Stabilität der Sekundärstruktur, im speziellen der α -helikalen Anteile, wurde Untereinheit \underline{e} für 4 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen inkubiert und danach ein CD-Spektrum von 205 nm bis 250 nm aufgenommen. Der Anteil des Spektrums unterhalb von 205 nm wurde aufgrund der hohen optischen Dichte des mit GdnHCl versetzten Puffers nicht berücksichtigt. Die folgenden Abbildungen zeigen die CD-Spektren der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach Inkubationszeiten von 4 min und 24 h (Abb 3.24).



3.24 A



3.24 B

Abb. 3.24: Zeitliche Abhängigkeit der Denaturierung der Sekundärstruktur der Untereinheit e. CD-Spektren bei GdnHCl-Konzentrationen von 0-6 M nach 4 min [A] und nach 24 Stunden [B] Inkubationszeit. Die Spektren wurden in 0.05 M GlyOH-Puffer pH 9.6 bei 20°C aufgenommen. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.4 mg/ml. Sämtliche Spektren sind bzgl. des Pufferwertes korrigiert. Dargestellt ist der gleitende Mittelwert durch jeweils 5 Meßpunkte.

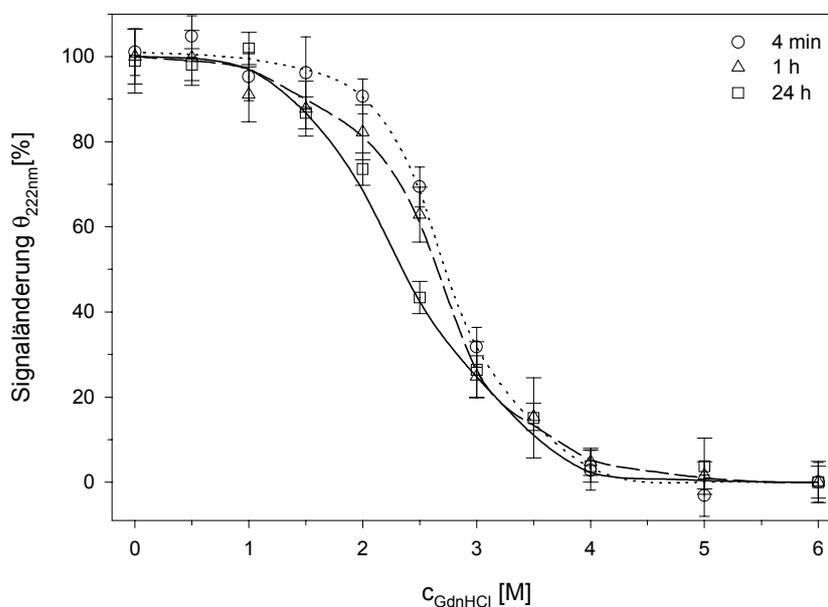


Abb. 3.25: Signaländerung der Elliptizität der Untereinheit e bei 222 nm [%] in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration nach 4 min, 1 h und 24 h.

Die Werte wurden bei 0 M auf 100 % und bei 6 M auf 0 % gesetzt. Es wurden jeweils der Durchschnitt aus zwei Messungen gebildet. Bedingungen siehe Abb. 3.24.

Durch die starke Absorption des Denaturierungsmittels im fernen UV-Bereich ab etwa 205 nm konnte, wie bereits bei der Untersuchung der Stabilität des 24-meren Hämocyanins (Pkt. 3.4.4), nur die relative Änderung der Elliptizität bei 222 nm betrachtet werden. Diese spiegelt hauptsächlich den Gehalt an α -Helices wider. Unabhängig von der Inkubationszeit (4 min, 1 h, 24 h) nimmt die Elliptizität bei 222 nm im Bereich zwischen 1 M und 4 M GdnHCl ab (Abb. 3.25). Die Unterschiede in der Abnahme beschränken sich auf den Bereich zwischen 1 M und 3 M GdnHCl. Sie betragen zwischen 4 Minuten und 24 Stunden bis zu 26 %. Auch nach 24 Stunden bleibt die Elliptizität bei 6 M GdnHCl mit -0.5 mdeg noch im negativen Bereich und erreicht keine positiven Werte (Abb. 3.24), wie sie für ein reines Random-Coil typisch sind. Somit kann man davon ausgehen, daß noch wenige Reste an Sekundärstrukturen vorhanden sind.

3.6 Temperaturstabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*

3.6.1 Messung der Temperaturstabilität von *Eurypelma*-Hämocyanin mittels DSC

Mittels der `Differential-Scanning`-Kalorimetrie wurde die thermische Stabilität des 24-meren Hämocyanins und einzelner Untereinheiten der Spinne *Eurypelma californicum* in verschiedenen Puffersystemen untersucht.

Die folgenden Abbildungen 3.26-3.28 zeigen den Verlauf der Wärmekapazität (C_p) des 24-meren Hämocyanins, eines Untereinheitengemisches und der Untereinheiten d und e in Abhängigkeit des Puffers und der Temperatur.

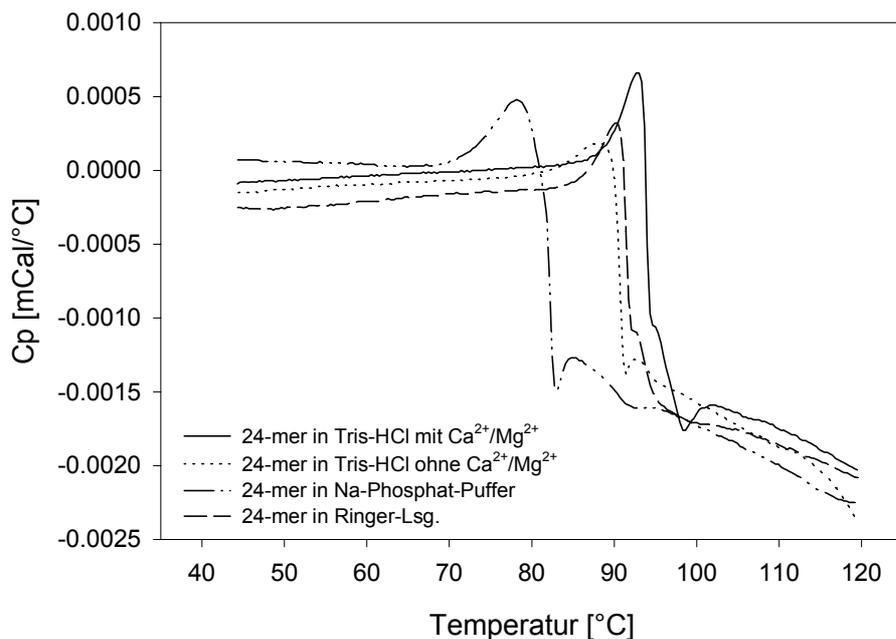


Abb. 3.26: Temperaturstabilität des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* in verschiedenen Puffern.

Aufgetragen wurde die Wärmekapazität [Cp] gegen die Temperatur: *Eurypelma californicum* 24-mer in 0.1 M Tris-HCl, 5 mM CaCl₂ und MgCl₂, pH 7.8; in Tris-HCl-Puffer ohne CaCl₂ und MgCl₂, in Na-P-Puffer und in Ringer. Die Scan-Rate betrug 1°C/min, die Konzentration des Hämocyanins 1 mg/ml.

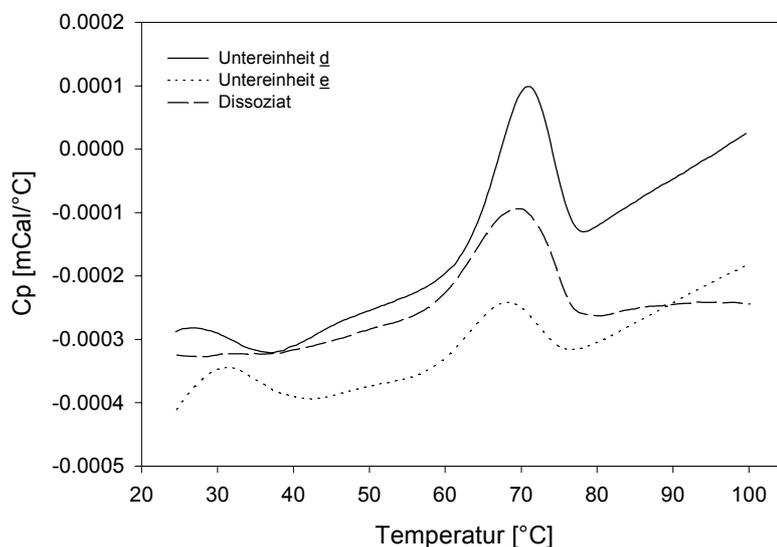


Abb. 3.27: Stabilität eines Untereinheitengemisches und der Untereinheiten d und e von *Eurypelma californicum* in GlyOH-Puffer.

Aufgetragen wurde die Wärmekapazität [Cp] gegen die Temperatur: *Eurypelma californicum* Dissoziat, Untereinheit d und Untereinheit e in 0.05 M GlyOH mit 5 mM EDTA. Die Scan-Rate betrug 1°C/min. Die Konzentration der Untereinheiten betrug 1 mg/ml.

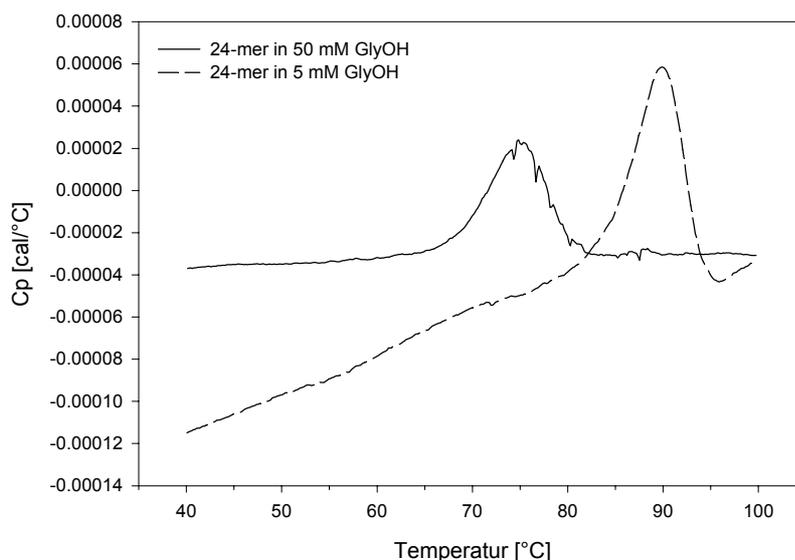


Abb. 3.28: Stabilität des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* in GlyOH-Puffer.

Aufgetragen wurde die Wärmekapazität [Cp] gegen die Temperatur: *Eurypelma californicum* 24-mer in 50 mM GlyOH [A] und 5 mM GlyOH, pH 9.6 [B]. Die Menge an Tris-Puffer nach der Verdünnung betragen im 5 mM GlyOH-Puffer 3 mM und im 50 mM GlyOH-Puffer 11 mM. Die Scan-Rate betrug 1°C/min. Die Konzentration der Hämocyanins betrug 0.13 mg/ml in 50 mM bzw. 0.16 mg/ml in 5 mM GlyOH-Puffer.

In Tabelle 3.14 sind die Ergebnisse der Temperaturdenaturierung des 24-meren Hämocyanins und der einzelnen Untereinheiten zusammengefaßt. Bei sämtlichen Messungen ist zu beachten, daß der pH-Wert bei Temperaturänderungen nicht konstant bleibt. Die Werte für das jeweilige ΔpH mit der Temperatur des Puffers wurden aus Holtzauer [1997] und Gueffroy [1986] entnommen. Die hieraus errechneten pH-Werte am T_m -Punkt sind in Tabelle 3.14 mit aufgeführt.

Probe	Puffer	T_m -Werte [°C]	pH am T_m -Punkt
24-mer	0.1 M Tris-HCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$, pH 7.8	93.9	5.73
24-mer	0.1 M Tris-HCl, pH 7.8	88.2	5.89
24-mer	0.05 M Na-Phosphat, pH 7.5	78.5	7.32
24-mer	Ringer-Lösung, pH 7.8	91.7	6.91
24-mer	0.05 M Glycin-OH-Puffer, pH 9.6	75.0	8.17
24-mer	0.005 M Glycin-OH-Puffer, pH 9.6	90.0	7.78
Dissoziat	0.05 M Glycin-OH-Puffer, pH 9.6	70.0	8.30
Untereinheit <u>d</u>	0.05 M Glycin-OH-Puffer, pH 9.6	71.1	8.27
Untereinheit <u>e</u>	0.05 M Glycin-OH-Puffer, pH 9.6	67.8	8.36

Tab. 3.14: T_m -Werte der thermischen Denaturierung von *Eurypelma*-Hämocyanin im DSC. Der pH-Wert des jeweiligen Puffers am T_m -Punkt ist angegeben.

Das oligomere Hämocyanin zeigt eine ausgeprägte Hitzestabilität, die vom verwendeten Puffer und der Anwesenheit divalenter Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängig ist. In Tris-HCl-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigt sich die größte Temperaturstabilität. Die Denaturierungstemperatur liegt hier bei etwa 94°C (Tab. 3.14), während in Tris-HCl-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} und in Ringer-Lösung T_m -Werte von 91.7°C bzw. 88.2°C gemessen wurden. In Na-Phosphat-Puffer weist das Hämocyanin mit 78.5°C eine deutlich geringere Denaturierungstemperatur auf. Bei den Messungen in Tris-HCl-Puffer, in Ringer-Lösung und in Na-P-Puffer fällt das Protein mit Erreichen der Denaturierungstemperatur aus (Abb. 3.26), was an der drastischen Abnahme der Wärmekapazität (C_p) bei Erreichen des T_m -Punktes zu erkennen ist. Da eine irreversible Denaturierung vorliegt, war eine weitergehende thermodynamische Analyse der Daten nicht möglich. Aus der Wärmekapazitätskurve wurde somit lediglich die Denaturierungstemperatur (T_m) entnommen (Tab. 3.14).

Zum Vergleich gegenüber dem oligomeren Hämocyanin wurden ein Untereinheiten-gemisch und die Untereinheiten d und e bezüglich ihrer Temperaturstabilität untersucht. Die T_m -Werte des Dissoziates liegen bei 70°C , die der Untereinheiten d und e bei 71.1 bzw. 67.8°C (Abb. 3.27, Tab. 3.14). Zusätzlich zur Änderung der Wärmekapazität im Bereich von 70°C treten bei den Untereinheiten d und e noch Peaks im Bereich von 27°C - 30°C auf. Dies könnte auf eine Destabilisierung der Tertiärstruktur hinweisen, die gegebenenfalls durch die weitere Aufreinigung der einzelnen Untereinheiten auftritt. Bei dem Untereinheitengemisch ist dieser Peak nicht zu sehen.

Eine Präzipitation des Proteins bei der Denaturierung der Untereinheiten in GlyOH-Puffer konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.27). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf den unterschiedlichen Puffer bzw. den unterschiedlichen End-pH-Wert bei Erreichen der Denaturierungstemperatur zurückzuführen ist (Tab. 3.14), wurde konzentriertes 24-meres Hämocyanin direkt vor der Messung im DSC in GlyOH-Puffer verdünnt. Wie in Abbildung 3.28 zu erkennen ist, fällt die Probe bei Erreichen des T_m -Wertes nicht aus. Der T_m -Punkt liegt allerdings bei Verwendung eines 50 mM GlyOH-Puffers mit 75°C nur unwesentlich über denen des Dissoziates und der einzelnen Untereinheiten d und e. Dies deutet darauf hin, daß eine Dissoziation des Oligomers stattgefunden hat. Denaturiert man oligomeres Hämocyanin in 5 mM GlyOH-Puffer, so wird der T_m -Punkt erst bei 90°C erreicht (Abb. 3.28). Hier könnte der gegenüber dem Gehalt an GlyOH relativ hohe Restgehalt von 3 mM Tris eine

Rolle spielen. Das 24-mere Hämocyanin bindet Tris mit hoher Affinität ($K_b = 1 \mu\text{M}$) [Sternier et al., 1994]. Allerdings fällt das Protein, wie auch bei Verwendung des 50 mM GlyOH-Puffers, nicht aus.

Abbildung 3.29 zeigt die Temperaturstabilität des Hämocyanins in Abhängigkeit des Puffers und des pH-Wertes. Es wird deutlich, daß in Tris-HCl-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , in Ringer-Lösung und in gering konzentriertem 5 mM GlyOH-Puffer das Oligomer während der Thermodenaturierung weitestgehend erhalten bleibt und die unterschiedlichen pH-Werte am T_m -Punkt eine untergeordnete Rolle spielen. In Tris-HCl-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , in Na-P-Puffer und in 50 mM konzentriertem GlyOH-Puffer hingegen führt die zunehmende Dissoziation des Oligomers zu einer zum Teil deutlichen geringeren Temperaturstabilität, die auch mit einer pH-Abhängigkeit verknüpft ist.

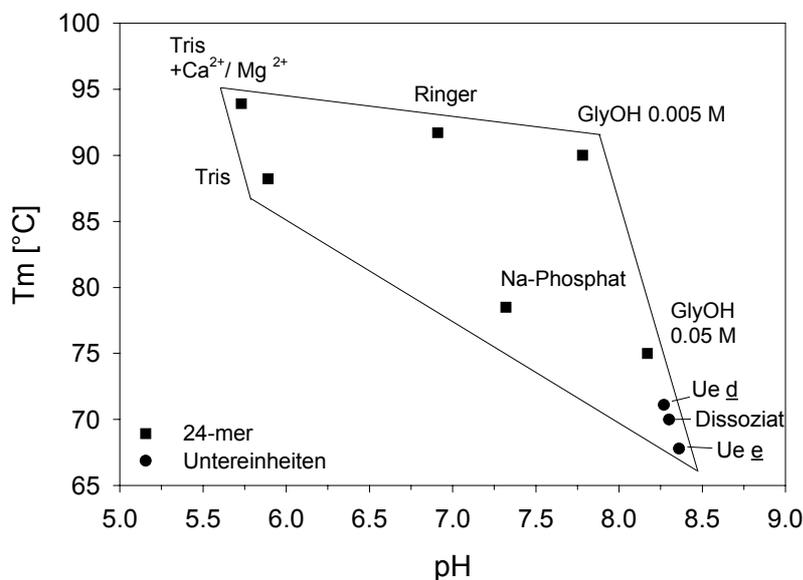


Abb. 3.29: T_m -Werte der thermischen Denaturierung von *Eurypelma*-Hämocyanin mittels DSC in Abhängigkeit des Puffers und des pH-Wertes.

Die Linien verdeutlichen den Stabilitätsbereich gegenüber der Temperatur und dem pH-Wert.

3.6.2 Thermische Stabilität der Sekundärstruktur

Die Untersuchungen des Hämocyanins im DSC lassen keine Rückschlüsse auf die Temperaturstabilität der verschiedenen strukturellen Ebenen zu. Messungen mittels CD-Spektroskopie sollten Aufschluß über die Stabilität der Sekundärstrukturelemente gegenüber thermischer Denaturierung in Abhängigkeit des Puffers und des Aggregationsgrades geben (Abb. 3.30 - 3.32).

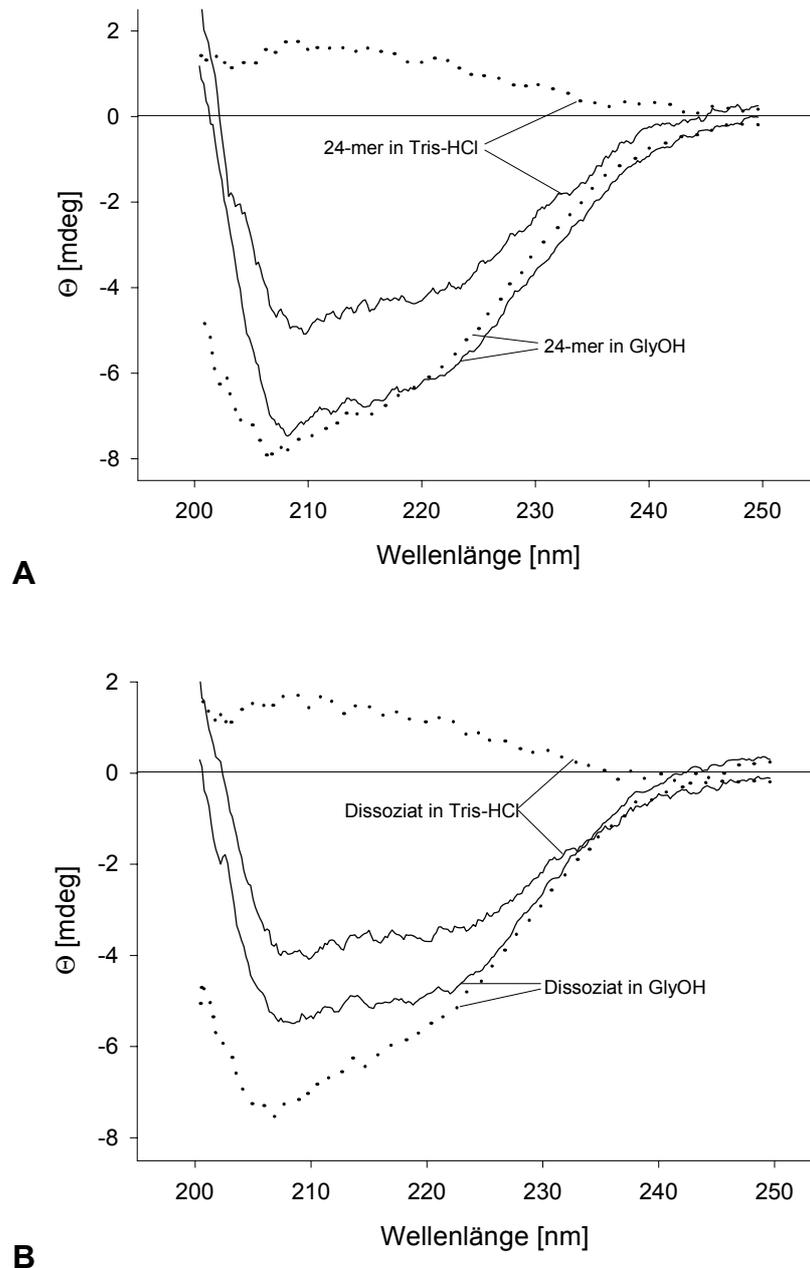
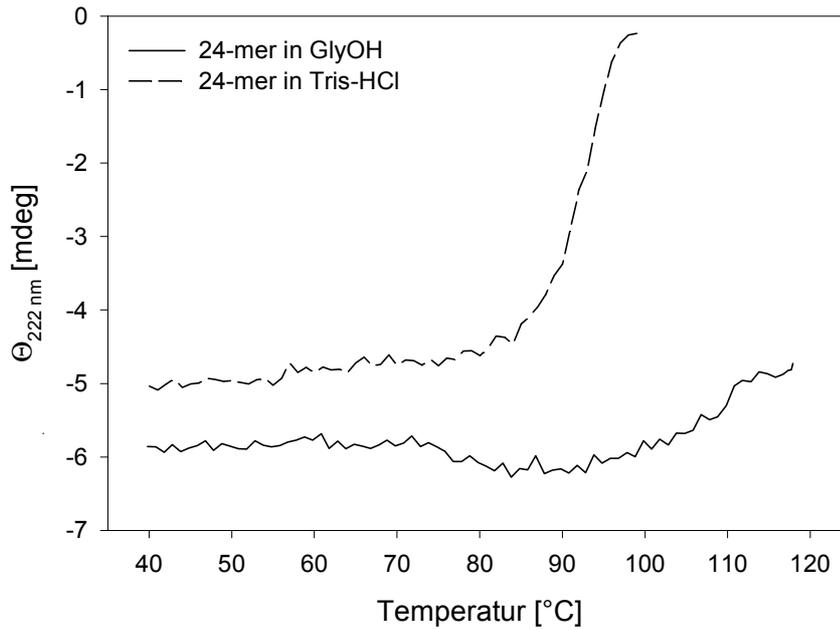


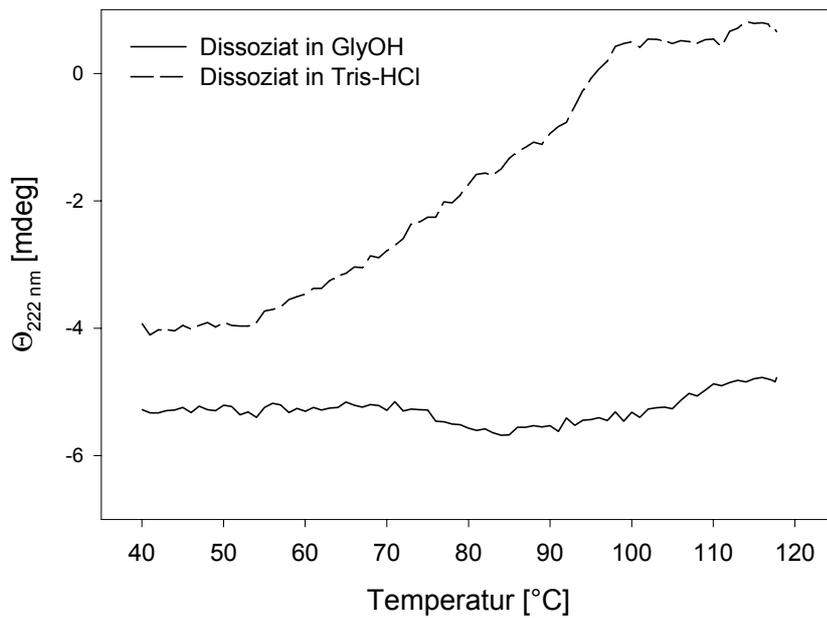
Abb. 3.30: CD-Spektren von 24-merem (A) und von dissoziiertem Hämocyanin (B) von *Eurypelma californicum* vor und nach der Temperaturdenaturierung

Die Messungen wurden in 0.1 M Tris-HCl pH 7.8 und in 0.05 M GlyOH-Puffer, pH 9.6 jeweils vor [durchgezogene Linie] und nach [gestrichelte Linie] der Temperaturdenaturierung durchgeführt. Die Konzentration des Hämocyanins betrug bei A: 0.07 mg/ml in Tris-HCl und 0.1 mg/ml in GlyOH und bei B: 0.06 mg/ml in Tris-HCl und 0.08 mg/ml in GlyOH.

Der Verlauf der Elliptizität des 24-meren Hämocyanins und des Dissoziats bei 222 nm in Abhängigkeit von der Temperatur in GlyOH- und Tris-HCl-Puffer ist auf der folgenden Seite in Abbildung 3.31 gezeigt.



A



B

Abb. 3.31: Temperaturstabilität der Sekundärstrukturelemente von 24-merem (A) und dissoziiertem Hämocyanin (B) von *Eurypelma californicum*.

Aufgetragen ist die Elliptizität bei 222 nm gegen die Temperatur. Es wurde jeweils ein 0.1 M Tris-HCl-Puffer pH 7.8 [gestrichelte Linie] und 0.05 M GlyOH-Puffer, pH 9.6 [durchgezogene Linie] verwendet. Konzentration des Hämocyanins: siehe Abb. 3.30.

Abbildung 3.32 zeigt den Verlauf der Elliptizität bei 222 nm für die Untereinheiten d und e in Abhängigkeit der Temperatur in GlyOH-Puffer.

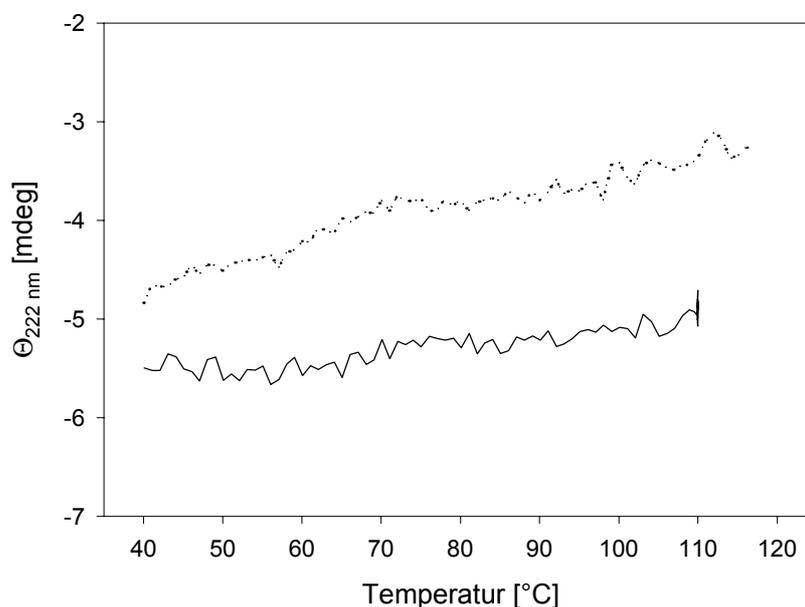


Abb. 3.32: Temperaturstabilität der Sekundärstrukturelemente der Untereinheiten d und e von *Eurypelma californicum*.

Aufgetragen ist die Elliptizität von Untereinheit d (gestrichelte Linie) und Untereinheit e (durchgezogene Linie) bei 222 nm gegen die Temperatur. Die Proben waren in 0.05 M GlyOH-Puffer, pH 9.6 gelöst. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.09 bzw. 0.1 mg/ml.

Die Versuche machen deutlich, daß das Denaturierungsverhalten der Sekundärstrukturelemente stark abhängig vom verwendeten Puffer ist (3.30-3.32). Werden die Temperaturdenaturierungen in Tris-HCl-Puffer durchgeführt, so ist sowohl bei oligomerem als auch bei dissoziiertem Hämocyanin bei hohen Temperaturen ein massiver Verlust der Sekundärstrukturelemente zu verzeichnen (Abb. 3.30-3.31). Die für ein Protein mit hohem α -helikalem Anteil charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm gehen hierbei verloren.

Betrachtet man den Verlauf der Elliptizität bei 222 nm in Abhängigkeit der Temperatur, so beginnt der Übergang bei der Denaturierung des 24-mers in Tris-HCl bei etwa 84°C und geht bei 100°C in ein Plateau über. Es bleibt kaum noch Restsekundärstruktur zurück (Abb. 3.30 A, 3.31 A). Der Verlust der Sekundärstruktur der Untereinheiten in Tris-HCl-Puffer beginnt schon ab 52°C und geht bei knapp 100°C in ein Plateau über. Während der Übergang bei der Denaturierung des 24-mers sich innerhalb eines relativ engen Temperaturbereiches von 15°C bewegt (Abb. 3.31. A), ist der Bereich bei der Denaturierung des Dissoziats mit einer Spanne

von 50°C (Abb. 3.31 B) wesentlich größer. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Dissoziation erst bei relativ hoher Temperatur erfolgt und die Untereinheiten dann sofort denaturieren. Die Messungen der Elliptizität des Hämocyanins in GlyOH-Puffer zeigen nahezu keine Sekundärstrukturverluste, unabhängig vom Aggregationsgrad der Probe (Abb. 3.30-Abb. 3.32). Lediglich bei Untereinheit d registriert man einen konstanten Anstieg der Elliptizität von -5 mdeg bei 40°C bis hin zu -3.5 mdeg bei 110°C (Abb. 3.32). Dessen Verlauf spricht jedoch eher für eine temperaturbedingte Drift des Signals. Ein Übergang, wie bei dem Untereinheitengemisch in Tris-HCl, ist nicht zu erkennen (Abb. 3.31 B).

Zum Vergleich wurde die Temperaturstabilität der Sekundärstruktur des 12-meren Crustaceenhämocyanins von *Homarus americanus* untersucht, die sich von der des *Eurypelma*-Hämocyanins unterscheidet.

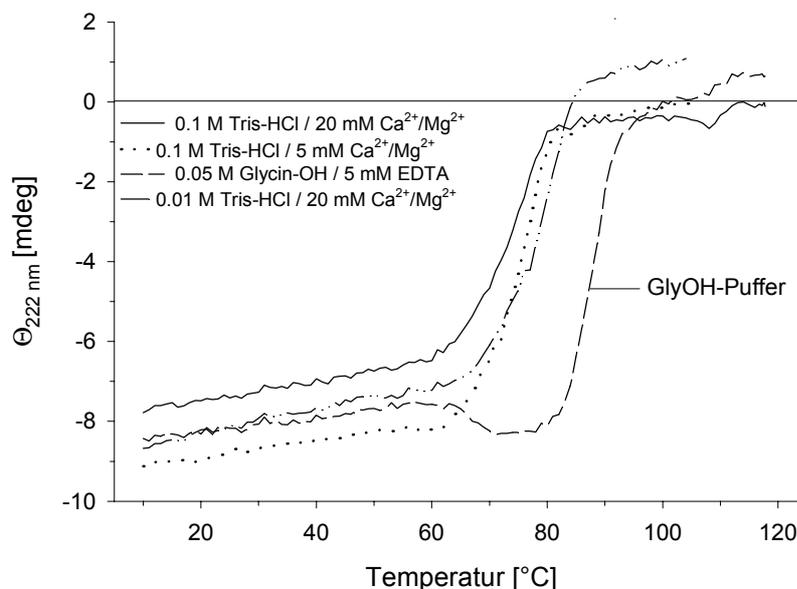


Abb. 3.33: Temperaturstabilität der Sekundärstruktur des 12-meren Hämocyanins von *Homarus americanus* in verschiedenen Puffern.

Die Heizrate betrug 1°C/min. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.14 mg/ml.

Die Sekundärstruktur des *Homarus*-Hämocyanins zeigt in GlyOH-Puffer eine gegenüber den Messungen in verschiedenen Tris-Puffern erhöhte Temperaturstabilität. Der T_m -Wert in GlyOH-Puffer liegt bei 88°C, die T_m -Werte der Messungen in den verschiedenen Tris-Puffern zwischen 73.5°C und 77.5°C (Abb. 3.33). Dies ist ein Indiz dafür, daß das Hämocyanin von *Homarus americanus* unter diesen Bedingungen nicht dissoziiert und der höhere pH-Wert am T_m -Punkt zu einer erhöhten Temperaturstabilität führt.

3.6.3 Thermische Stabilität der Epitope

Die Methode der zweidimensionalen Immungelelektrophorese liefert Informationen über die Intaktheit, hauptsächlich der dreidimensionalen Struktur und der Oberfläche des Proteins. So kann die Temperaturstabilität der Epitope des Hämocyanins, die von polyklonalen Antikörpern erkannt werden, untersucht werden.

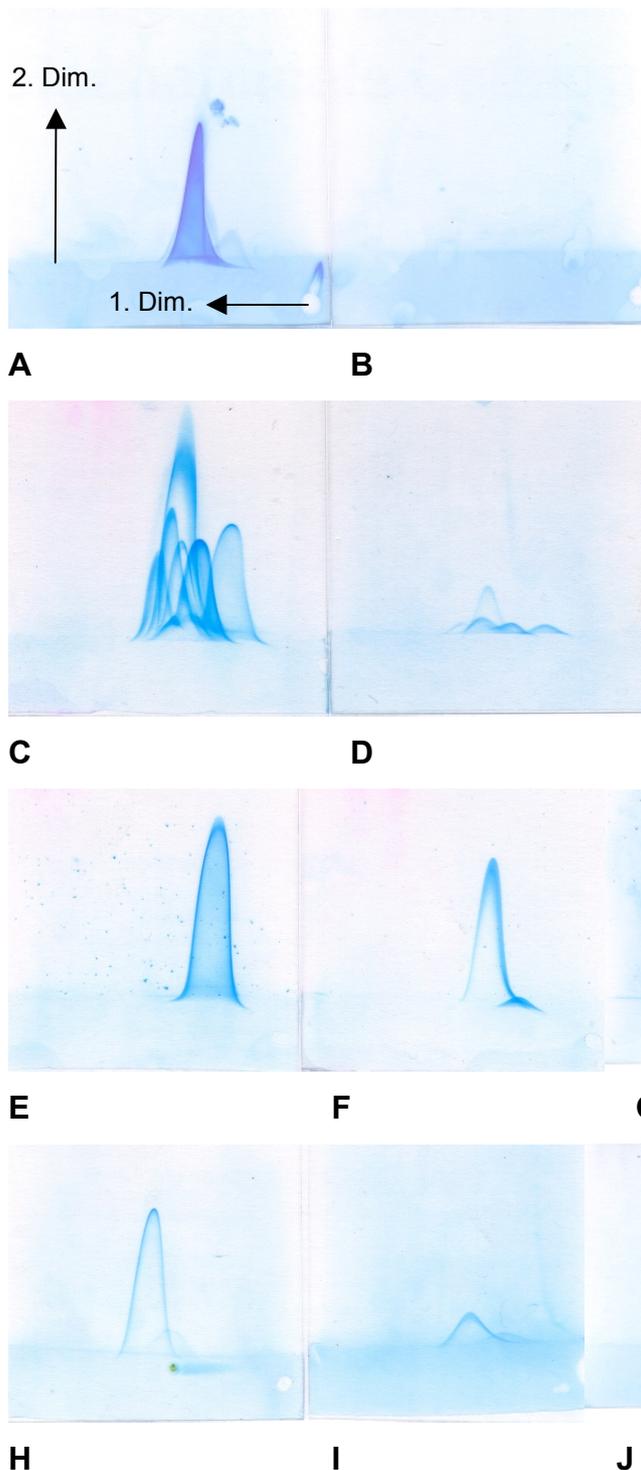


Abb. 3.34: Zweidimensionale Immungelelektrophorese des 24-meren Hämocyanins (A, B), eines Unter-einheitengemischs (C, D) und der Untereinheiten d (E-G) und e (H-J), jeweils vor und nach der Temperaturdenaturierung.

Die Abbildungen A, C, E und H zeigen das Ausgangsmaterial vor, die Abb. B, D, F, G, I und J die Proben nach der thermischen Denaturierung im DSC. Die Abb. F und I zeigen die Untereinheiten d und e in GlyOH-Puffer, die Abb. G und J in Tris-HCl-Puffer, beide jeweils nach der Messung. In der 1. Dimension läuft das Protein von rechts nach links, bevor es in der 2. Dimension nach oben in das Antikörperfeld einwandert.

Nach der thermischen Denaturierung in Tris-HCl werden weder beim 24-meren Hämocyanin noch bei einzelnen Untereinheiten Epitope erkannt (Abb. 3.34 B, G, J). Die Messungen in GlyOH-Puffer zeigen hingegen, daß sowohl bei einem Untereinheitengemisch (Abb. 3.34 D) als auch bei den einzelnen Untereinheiten (Abb. 3.34 F, I) nach der thermischen Denaturierung noch Epitope von den Antikörpern erkannt werden. Besonders bei Untereinheit d bleiben relativ viel Epitope intakt. Dies deutet darauf hin, daß selbst bei hohen Temperaturen noch Teile der Tertiärstruktur und, geht man vom Vorhandensein linearer Epitope aus, auch der Sekundärstruktur erhalten bleiben. Die in GlyOH-Puffer nahezu vollständig erhaltenen Sekundärstrukturelemente wurden durch die CD-Spektroskopie nachgewiesen (Abb. 3.32).

Die Ergebnisse der Immungelektrophorese lassen jedoch keine quantitativen Aussagen für weitergehende Interpretationen zu. Ein direkter Vergleich der Peakhöhe ist nicht möglich.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität und Entfaltung des Oligomers und eines Monomers des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* untersucht.

Zur Untersuchung der Stabilität und der komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen strukturellen Ebenen des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum*, wurde der Denaturierungsverlauf unter Einwirkung von Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) und der Temperatur mittels verschiedener spektroskopischer und kalorimetrischer Methoden verfolgt. Sowohl der chemische als auch der thermische Denaturierungsprozeß wurde auf das Auftreten möglicher Intermediate untersucht. Dies läßt Rückschlüsse sowohl auf die Hierarchie der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten innerhalb des Oligomers, als auch zwischen den Domänen und Faltungsmotiven innerhalb eines Monomers zu.

Die Entfaltung eines Monomers wurde im Detail bei Untereinheit e verfolgt. Die Kenntnis der vollständigen Aminosäuresequenz [Voit et al., 2000] macht es möglich, die dreidimensionale Struktur der Untereinheit auf die Struktur der Untereinheit II des nahe verwandten Cheliceratenhämocyanins von *Limulus polyphemus* zu modellieren. Das Modell der 3D-Struktur diente als Basis für die Interpretation der Denaturierungsergebnisse auf molekularer Ebene. Hierbei wurden Erkenntnisse über die Stabilität der verschiedenen strukturellen Ebenen innerhalb der Untereinheit gewonnen.

Basis für die Stabilitätsuntersuchungen war zunächst die Charakterisierung des nativen oligomeren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* bezüglich des Molekulargewichts (M_r).

4.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Arthropodenhämocyanin

Im Rahmen der Charakterisierung des *Eurypelma*-Hämocyanins wurde die Bestimmung der Molekulargewichte verschiedener Arthropodenhämocyanine durchgeführt. Hierzu wurde eine Vielwinkel-Laser-Lichtstreu-Apparatur aufgebaut. Dafür war es notwendig, die spezifischen Extinktionskoeffizienten (ϵ) und Brechungsindex-Inkrementen (dn/dc) der Hämocyanine experimentell zu ermitteln.

Zur Bestimmung der M_r einzelner Untereinheiten von *Eurypelma californicum* wurde ferner die Methode der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) angewendet.

4.1.1 Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten mit verschiedenen Verfahren

Zur Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die auf verschiedenen Prinzipien basieren und so unterschiedliche Ergebnisse liefern können. Als relativ genaue Methode, mit einer guten Reproduzierbarkeit, ist die Bestimmung des Trockengewichts beschrieben [Pace et al., 1995]. Probleme hierbei können allerdings die unvollständige Entfernung von Salzen durch die Dialyse und von Wassermolekülen durch unzureichende Trocknung sein. Weitere Nachteile sind der große Zeitaufwand und vor allem der hohe Proteinverbrauch [Pace et al., 1995], weshalb diese Methode nicht angewendet wurde.

In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten der Hämocyanine drei verschiedene Methoden verwendet. Es wurden zwei chemische [Bradford, 1976, Lowry et al., 1951] und ein spektroskopisches Verfahren [Scopes, 1974] verglichen.

Die unterschiedliche Reaktion von Proteinen mit den Reagenzien des Bradford- und Lowry-Assays wurden bereits mehrfach beschrieben [Bradford, 1976; Pierce and Suelter, 1977; Van Kley and Hale, 1977; Tal et al., 1985; Legler et al., 1985; Eichberg et al., 1969; Rosenthal et al., 1970; Rej et al. 1974]. Aus diesem Grund wurden neben BSA als Referenzprotein zum Vergleich das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* (Chelicerata) und *Homarus americanus* (Crustacea) eingesetzt. Die Extinktionskoeffizienten dieser Spezies sind bekannt und wurden mit der Trockengewichtsmethode bestimmt [Loewe and Linzen, 1973; Morimoto and Kegeles, 1971]. Für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum*, dessen Aminosäuresequenz vollständig bekannt ist [Voit et al., 2000], wurde zur Überprüfung des von Loewe and Linzen [1973] ermittelten Wertes der Extinktionskoeffizient zusätzlich aus dem Gehalt der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und deren Extinktionskoeffizienten bei entsprechender Wellenlänge nach der Gleichung $\epsilon_{[280 \text{ nm}]} = 5500 (\text{Trp}) + 1490 (\text{Tyr}) + 125 (\text{Cystin})$ errechnet [Edelhoch, 1967].

Die Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren im nativen Protein gehen auf Untersuchungen von Pace et al. [1995] zurück und repräsentieren die Werte, die jeweils die geringste mittlere Abweichung von einer empirischen Basis darstellen. Der hiermit errechnete Extinktionskoeffizient zeigt mit $1.02 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ gegenüber dem von Loewe und Linzen [1973] bestimmten Wert von $1.1 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ eine Abweichung von 8%.

Aufgrund der engen Verwandtschaft und der hohen Sequenzhomologie innerhalb der Crustaceenhämocyanine lag es nahe, für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Crustaceenhämocyanine das Hämocyanin von *Homarus americanus* als Referenzprotein zu verwenden.

Die mit den drei verschiedenen Verfahren bestimmten Extinktionskoeffizienten zeigen eine große Schwankungsbreite. Die Werte der chemischen Verfahren schwanken innerhalb der Arten je nach verwendetem Referenzprotein zwischen 3% und 15%, wobei die des Lowry-Assays stets höher liegen. Die mit dem spektroskopischen Verfahren von Scopes ermittelten Extinktionskoeffizienten liegen um bis zu 25% niedriger als die der beiden chemischen Assays.

4.1.2 Wirkungsmechanismen der verwendeten Tests und Auswirkungen der Aminosäurezusammensetzung auf das Ergebnis der Proteinbestimmung

Der Vergleich der von mir mit dem Bradford-Assay ermittelten Extinktionskoeffizienten zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den verwendeten Referenzproteinen. Die mit BSA und dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* errechneten Extinktionskoeffizienten liegen niedriger als die mit dem Crustaceenhämocyanin von *Homarus americanus* errechneten Werte.

Die mit dem Hämocyanin von *H. americanus* bestimmten Extinktionskoeffizienten zeigen die beste Übereinstimmung mit bisher für Crustaceen bekannten Werten (Tab. 3.1; 3.2). Aus der Literatur sind Extinktionskoeffizienten zwischen 1.33 und $1.56 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ bekannt [Roxby et al., 1974; Miller et al., 1977; Ellerton et al., 1970; Nickerson and van Holde, 1971; Ricchelli et al., 1980; Morimoto and Kegeles 1971].

Für *Carcinus maenas* beispielsweise wurde ein ϵ von $1.28 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ bestimmt (Tab.3.2), das somit im Bereich der aus der Literatur bekannten Werte von $1.24 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ [Ricchelli et al., 1980] und $1.42 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ [Nickerson and van

Holde, 1971] liegt. Beim Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus* liegt der Extinktionskoeffizient mit $1.24 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ deutlich niedriger als der von Antonini et al. [1983] ermittelte Wert von $1.38 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$, der allerdings in Ethanolamin bei pH 9.6 bestimmt wurde. Errechnet man das ϵ aus der Sequenz [Bak and Beintema, 1987; Jekel et al., 1988; Neuteboom et al., 1992] mit der Methode von Edelhoch [1967], so ergibt sich ein Wert von $1.22 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$ der gut mit dem von mir bestimmten Extinktionskoeffizienten übereinstimmt.

Anhand der Wirkungsmechanismen der angewendeten Verfahren soll die Auswirkung der Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Hämocyanine auf die Ergebnisse der Proteinbestimmung diskutiert werden.

Als Bindungsorte von Coomassie Molekülen kommen hauptsächlich basische Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Histidin in Frage [Tal et al., 1985]. Die Bindung der Farbmoleküle beruht dabei laut Fazekas de St. Groth et al. [1963] auf elektrostatischen Wechselwirkungen, die durch hydrophobe Wechselwirkung noch verstärkt werden. Righetti und Chillemi [1978] stellten die Hypothese auf, daß der Farbstoff über seine SO^3 -Gruppe an basische Gruppen bindet, was durch Ergebnisse von Tal et al. [1985] bestätigt werden konnte. Bindungsstudien mit Coomassie an Poly-L-Arginin ergaben eine besonders starke Reaktion [Compton and Jones, 1985]. Der molare Durchschnittsgehalt der basischen Aminosäuren in 200 untersuchten Proteinen variiert zwischen 10 Mol% und 17 Mol% und liegt am häufigsten bei 13 Mol% [Reeck, 1970]. Der entsprechende Gehalt dieser Aminosäuren bei dem als Referenzprotein verwendeten BSA beträgt 17.3 Mol%.

Die Analyse der Gehalte dieser Aminosäuren anhand der bekannten Arthropoden-hämocyanin-Sequenzen zeigt, daß diese zwischen 14.8-18.3 Mol% liegen. Sie sind somit zum Teil deutlich höher als der bei der empirischen Basis von Reeck [1970] am häufigsten vorkommende Gehalt von 13 Mol%. Diese Unterschiede im Gehalt der für die Bindung und letztlich für die Farbreaktion maßgebenden Aminosäuren können somit für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Sie machen die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von der Wahl des Referenzproteins abhängig.

Die Berechnung des Gehalts basischer Aminosäuren anhand der sequenzierten Untereinheiten für das 24-mer von *Eurypelma californicum* [Voit et al., 2000] ergibt mit 15.7 Mol% einen etwa 10% niedrigeren Gehalt als bei BSA. Die Unterschiede zwischen den Extinktionskoeffizienten, die mit den Eichgeraden von BSA und

E. californicum errechnet wurden, liegen bei etwa 6% und könnten hierauf zurückzuführen sein. Bei anderen Cheliceratenhämocyaninen wie bei Untereinheit II von *Limulus polyphemus*, Untereinheit 6 von *Androctonus australis* [Buzy et al., 1995] und einer Teilsequenz von *Tachypleus tridentatus* liegen die Gehalte mit 18.3 Mol%, 16.5 Mol% bzw. 17.1 Mol% deutlich höher. Dies zeigt, daß die Zusammensetzung bezüglich dieser Aminosäuren innerhalb dieses Unterstamms deutlich variieren kann.

Für Untereinheiten von Crustaceen-Hämocyaninen, deren Sequenz bekannt ist, ergeben sich ähnliche Gehalte. Diese liegen zwischen 14,8 Mol% und 16.3 Mol% (*C. magister*, *P. interruptus*, *P. vulgaris*). Auch der Gehalt von Untereinheit α des Hämocyanins von *H. americanus* liegt mit 16.5 Mol% höher als bei der empirischen Basis von Reeck [1970] und es ist naheliegend, daß dies Auswirkungen auf die Farbreaktion hat. Aufgrund der Unkenntnis der Sequenzen der übrigen Untereinheiten bleibt es allerdings unklar, ob dies auch für das 12-mere Hämocyanin gilt.

Das Prinzip des zweiten chemischen Assays, nach Lowry [1951] beruht auf der Reaktion von Kupfer mit der Peptidbindung. Das Kupfer liegt hierbei in Form von Kupfersulfat-Ionen in alkalisch-wässriger Lösung vor. Auch Tyrosin- und Tryptophanreste und, in geringerem Maße, Cystein-, Cystin- und Histidinreste tragen zur Komplexbildung der Kupferionen bei [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Dieser Komplex reduziert Phosphormolybdat, das der Lösung in Form des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugegeben wird. Dabei wird vermutlich Cu^{2+} , das an das Protein gebunden ist, zu Cu^+ reduziert. Dieses reagiert dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und ergibt eine tiefblaue Färbung, die bei 750 nm photometrisch detektiert werden kann.

Wie bereits beim Bradford-Assay sind die von mir mit dem Lowry-Assay ermittelten Extinktionskoeffizienten von den verwendeten Referenzproteinen abhängig. Auch hier liegen die mit BSA und mit dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* als Referenzprotein errechneten Extinktionskoeffizienten niedriger als die, die mit dem Crustaceenhämocyanin von *Homarus americanus* errechnet wurden. Ein Vergleich von 13 verschiedenen Proteinen gegenüber dem als Referenzprotein verwendeten BSA zeigte eine Variation der OD_{750} von maximal 29% [Instructions for the modified Lowry Assay, Pierce, 1998]. Aufgrund der vielen Faktoren, die bei der Farbreaktion eine Rolle spielen können [Legler et al., 1985] ist es allerdings schwierig, die

möglichen Gründe für die unterschiedliche Farbreaktion bei den von mir verwendeten Referenzproteinen einzugrenzen.

Wie schon bei den Werten des Bradford-Assays wurde auch hier aufgrund der Verwandtschaft und des hohen Homologiegrades der Sequenzen innerhalb der Crustaceenhämocyanine das Hämocyanin von *Homarus americanus* als Referenzprotein verwendet. Die hiermit bestimmten Extinktionskoeffizienten liegen zwischen 1.38 und $1.47 \text{ ml (cm*mg)}^{-1}$ (Tab. 3.3) und stimmen am besten mit den aus der Literatur bekannten Werten überein (Tab. 3.1). Ein direkter Vergleich mit den Werten des Bradford-Assays zeigt, daß die Extinktionskoeffizienten zwischen 5% und 14% höher liegen.

4.1.3 Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten mit dem spektroskopischen Verfahren von Scopes

Die von Goldfarb, Seidel und Mosovich 1951 publizierte spektroskopische Methode basiert auf der Absorption von Proteinen bei 205 nm. Die Methode wurde 1974 von Scopes modifiziert, wobei die Gehalte der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in die Berechnung von ϵ mit eingehen.

Die Extinktionskoeffizienten, die von mir mit dem Verfahren von Scopes ermittelt wurden, liegen, mit Ausnahme dessen von *Eurypemla californicum*, deutlich unter den mit beiden chemischen Assays ermittelten und den aus der Literatur bekannten Werten.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die Größen, die in die Berechnung des Extinktionskoeffizienten eingehen, teils theoretisch, teils empirisch ermittelt sind. Abweichungen der Gehalte der für die Absorption bei 205 nm und 280 nm relevanten Aminosäuren können sich somit auf das Ergebnis auswirken.

Zur Absorption bei 205 nm tragen, neben dem Proteinrückrat, in signifikantem Maß auch die Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin bei. Unterschiede im Extinktionskoeffizienten von Proteinen bei dieser Wellenlänge sind nach Scopes [1974] hauptsächlich auf Unterschiede im Gehalt dieser vier Aminosäuren zurückzuführen.

Für den Beitrag der Absorption der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin führt der Autor eine Korrektur ein, indem auch die OD bei 280 nm gemessen wird. Die Beiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zur gemessenen OD bei 205 nm

und 280 nm sind abgeschätzt. Der Extinktionskoeffizient von Tryptophan bei 205 nm ist nach Scopes [1974] 3.6 mal höher als der bei 280 nm, der von Tyrosin 4.6 mal. Vom durchschnittlichen Gehalt dieser beiden Aminosäuren in Proteinen, ausgehend von einer empirischen Basis mit 200 Proteinen [Reeck, 1970], wird der Beitrag zur Absorption von Tryptophan bei 280 nm etwa dreimal so hoch angenommen wie der von Tyrosin. Der molare prozentuale Gehalt von Phenylalanin (Phe) und Histidin (His), der in die Berechnung des Wertes C eingeht (Pkt. 2.8.3, Glg. 2.8.III), wurde mit 3.7 Mol% bzw. 1.7 Mol% bestimmt.

Am Beispiel des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*, dessen Extinktionskoeffizient mit $1.02 \text{ ml (cm*mg)}^{-1}$ im Vergleich zum Literaturwert von $1.39 \text{ ml (cm*mg)}^{-1}$ [Nickerson und van Holde, 1971] sehr niedrig bestimmte wurde, soll diskutiert werden, inwieweit etwaige Unterschiede im Gehalt der bei den entsprechenden Wellenlängen relevanten Aminosäuren zu dieser Erniedrigung führen können.

Die Bestimmung des Molekulargewichts mittels Lichtstreuung mit dem niedrigen Extinktionskoeffizienten von Scopes ergibt für das Hämocyanin von *Limulus polyphemus* einen Wert von 2.569 Mio Da (Tab. 3.7). Im Vergleich zu dem aus Sequenzdaten errechneten hypothetischen 48-mer [Nakashima et al., 1986] und dem von mir mit dem Extinktionskoeffizienten aus der Literatur bestimmten M_r liegt es damit um etwa 26% niedriger. Der mit der Methode von Scopes ermittelte Extinktionskoeffizient ist somit nicht realistisch.

Der Literaturwert des Extinktionskoeffizienten des *Limulus*-Hämocyanins wurde mittels einer analytischen Ultrazentrifuge bestimmt, die nach einer Methode von Babul und Stellwagen [1969] als differentiell Refraktometer verwendet wird. Als Referenzprotein diente das Hämocyanin des Cephalopoden *Loligo paelii*, dessen Extinktionskoeffizient mit der Trockengewichtsmethode bestimmt wurde. Auch hier basiert der Extinktionskoeffizient also auf einem Wert, der mittels eines Referenzproteins bestimmt wurde.

Tabelle 4.1 zeigt die Gehalte der Aminosäuren Phenylalanin, Histidin, Arginin und Methionin, die verschieden stark in die Berechnung des Wertes C (Pkt. 2.8.3, Glg. 2.8.III) eingehen und so einen Einfluß auf den errechneten ϵ -Wert haben können.

Aminosäuren	<i>L. polyphemus</i> Gehalt (Mol%)	empirische Basis Gehalt (Mol%)	Beitrag zum Wert C (%)
Phe	5.3	3.7	2.9
His	7.2	1.7	0.8
Arg	4.9	4.4	0.5
Met	1.9	1.9	0.3

Tab. 4.1: Gehalte der für die Berechnung des Wertes C (Pkt. 2.8.3, Glg. 2.8.III) relevanten Aminosäuren von Untereinheit II des Hämocyanins von *L. polyphemus* und von einer empirischen Basis mit 200 Proteinen [Reeck, 1970].

Für eine Änderung des Extinktionskoeffizienten um beispielsweise 10%, muß sich auch der Wert C um 10% ändern. Hierfür müßte sich allerdings der Gehalt der vier Aminosäuren (Tab. 4.1) um insgesamt mehr als das dreifache gegenüber der empirischen Basis ändern. Der Vergleich der Gehalte zeigt jedoch, daß die Werte für Arg und Met gut mit der empirischen Basis von Reeck [1970] übereinstimmen (Tab. 4.1). Die Gehalte der Aminosäuren Phe und vor allem His, die stärker in die Berechnung des Korrekturwertes C (Glg. 2.8.III) eingehen, sind zwar deutlich höher, reichen aber nicht aus um eine Änderung um 26% im Extinktionskoeffizienten zu bewirken. Berechnet man C (Glg. 2.8.III) mit den korrigierten Phe-, His-, Arg- und Met-Gehalten, ergibt sich ein Wert von 28.1. Diese Änderung gegenüber dem von Scopes verwendeten Wert von 27 (Pkt. 2.8.3) bedingt lediglich eine Änderung des ϵ des *Limulus*-Hämocyanins um etwa 3.8% auf $1.06 \text{ ml (cm} \cdot \text{mg)}^{-1}$. Zwar bleibt zu berücksichtigen, daß die Berechnung der Aminosäuregehalte nur auf der Sequenz einer Untereinheit basiert [Nakashima et al., 1986] und die sieben anderen Untereinheiten nicht in die Betrachtung mit einbezogen werden können, trotzdem ist es nicht wahrscheinlich, daß die Gehalte der vier Aminosäuren allein für den niedrigen ϵ -Wert verantwortlich gemacht werden können.

Auch die Extinktionskoeffizienten der Crustaceenhämocyanine, die mit dem Verfahren von Scopes [1974] ermittelt wurden (Tab. 3.4), liegen deutlich unter den Literatur- (Tab 3.1) und den mit beiden chemischen Assays bestimmten Werten

(Tab. 3.2, 3.3). Die Abweichungen betragen bis zu 16% im Falle des Bradford-Assays und bis zu 24% im Falle des Lowry-Assays.

Auch hier kann die Variation der Aminosäuren Phenylalanin und Histidin nicht allein für die generell zu niedrigen Extinktionskoeffizienten verantwortlich gemacht werden, wie das Beispiel des Hämocyanins von *P. interruptus* zeigt, wo sie lediglich zu einer Erniedrigung des Extinktionskoeffizienten um 3.4% führen.

Weitere Unsicherheiten bei der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten könnten in der Berücksichtigung der Absorptionsverhältnisse von Tryptophan und Tyrosin begründet sein, da der Autor hier von mehreren Annahmen ausgeht. Das Verhältnis, in dem Tryptophan und Tyrosin zur Absorption bei 280 nm beitragen, wird aufgrund der empirischen Basis [Reeck, 1970] mit 3 bestimmt. Eine empirische Basis von Doolittle [1989] ergibt dagegen ein Verhältnis der Beiträge dieser Aminosäuren zur OD_{280} von 1.6 und zeigt somit dessen deutliche Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinbasis.

Für das 24-mere Hämocyanin von *E. californicum* ergibt sich lediglich ein Verhältnis von 0.86 und ein hieraus errechneter Korrekturwert für den Beitrag dieser beiden Aminosäuren zu dem Wert C (Glg. 2.8.III) von 1.93. Obwohl das Verhältnis des Beitrags beider Aminosäuren zur OD_{280} um mehr als den Faktor 3 niedriger liegt, ergibt sich ein lediglich um etwa 6% erniedrigter Extinktionskoeffizient bei 280 nm. Für das Crustaceenhämocyanin von *P. interruptus*, dessen Extinktionskoeffizient mit $1.05 \text{ ml (cm*mg)}^{-1}$ deutlich von dem mit dem Bradford-Assay bestimmten Wert abweicht, ergibt sich aus dem Verhältnis von 1.19 ein Korrekturwert von 2.2. Der hiermit berechnete ϵ -Wert wäre um 5% niedriger als der mit 3.85 ermittelte Wert (Pkt. 2.8.3).

Auch die unterschiedlichen Beiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zur OD_{280} anhand bekannter Sequenzen können somit nicht allein für die von den Literaturwerten und den Ergebnissen der chemischen Assays abweichenden ϵ -Werte der Crustaceenhämocyanine verantwortlich gemacht werden.

Ein weiteres Problem bei der Bestimmung von ϵ_{280} aus ϵ_{205} kann die Wellenlängengenauigkeit des Photometers darstellen. Sie ist für das verwendete Gerät (Hitachi U 3000) mit $\pm 0.3 \text{ nm}$ angegeben. Geht man von einer `worst case`-Abschätzung aus und nimmt eine maximale Abweichung von $\pm 0.5 \text{ nm}$ an, so beträgt die Änderung der OD bei 205 nm etwa $\pm 5\%$. Dies hätte eine Änderung von 0.7% des ϵ_{205} und von 5% des ϵ_{280} zur Folge.

Neben der Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Hämocyanine und einer möglichen Wellenlängengenauigkeit des Photometers könnten an das native Hämocyanin gebundene Zucker und Fette [Zatta et al. 1981], die im UV-Bereich absorbieren, die Ergebnisse zusätzlich verfälschen. Die Anwesenheit kovalent gebundener Kohlenhydrate konnte für einige Arthropodenhämocyanine nachgewiesen werden [Debeire et al., 1986; van Kuik et al., 1986; Tseneklidou-Stoeter et al., 1995; Ellerton et al., 1983]. Inwieweit diese zu einer Beeinflussung der OD bei 205 nm und 280 nm kann allerdings letztlich nicht beurteilt werden.

Die Analyse der möglichen Fehlerquellen und der verschiedenen Faktoren, die in die Berechnung von ϵ eingehen, läßt keine eindeutige Ursache für die niedrigen Extinktionskoeffizienten des Scopes-Verfahrens erkennen. Es ist wahrscheinlich, daß alle angeführten Ursachen einen Beitrag hierzu liefern.

Der Vergleich der mit verschiedenen Methoden ermittelten Extinktionskoeffizienten hat die deutliche Abhängigkeit der Werte von der verwendeten Methode gezeigt. Letztlich kann keines der verwendeten Verfahren als absolut verlässlich gelten, und eine Bestimmung der Extinktionskoeffizienten ist nur innerhalb eines Fehlers von etwa 10% möglich. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten auf die Molekulargewichtsbestimmung wird im folgenden Abschnitt 4.1.4 diskutiert.

4.1.4 Zur Methode der Molekulargewichtsbestimmung mittels Vielwinkel-Laser-Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Arthropodenhämocyanine wurde die Methode der statischen Lichtstreuung angewandt. Sie erlaubt die Charakterisierung von Proteinen bezüglich ihres Molekulargewichts (M_r) in Lösung.

Die Kopplung des Laser-Lichtstreuphotometers mit einer HPLC-Pumpe und einer Size-Exclusion Säule (Pkt. 2.10.1.5) erlaubte es, Molekülgemische aufzutrennen und deren Molekulargewichte zu bestimmen. Form und Ladung der Moleküle, die einen Einfluß auf die Retentionszeit haben können, wirken sich hier nicht auf die Molekulargewichtsbestimmung aus.

Voraussetzung für das Gelingen einer Messung in wässriger Lösung, vor allem für die Einbeziehung kleiner Winkel, war eine gute Entgasung und die Staubfreiheit der

Lösungen. Dies wurde von einem Degasser, der dem Flüssigkeitsstrom zwischen- geschaltet war und einem inline-Filter gewährleistet (Pkt. 2.10.1.5).

Die Genauigkeit der Methode ist von mehreren Parametern abhängig. Wichtigster Parameter ist die Eichung des Laser-Lichtstreuphotometers, die mit Toluol erfolgte (2.10.1.4). Die Kalibrierungen wurden jeweils nach Ausbau und Reinigung der Flusszelle durchgeführt und zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Die Abweichung der Kalibrationskonstanten lagen bei +/- 1.75% (n=7).

Durch die Verwendung mehrerer, kreisförmig um die Flußzelle angeordneter Detektoren, die alle ihre eigene Sensitivität und ihre eigenen geometrischen Faktoren besitzen, wurden die Streusignale durch eine Normalisierung (Pkt. 2.10.1.4) an den 90°Detektor angeglichen. Die Güte der mit monomerem BSA der Firma Sigma-Aldrich als isotropen Streuer durchgeführten Normalisierung ist im Debye-Plot ersichtlich (Pkt. 2.10.1.4, Abb. 2.6) und war entscheidend für die darauffolgenden Messungen. Zeigte der Debye-Plot deutliche Abweichungen vom horizontalen Verlauf, war dies ein Hinweis auf Verunreinigungen oder Luft in der Lösung. Dies führte durch starke Vorwärtsstreuung zur Verfälschung des Meßergebnisses, so daß die Messung wiederholt werden mußte. Im Regelfall wurde die Normalisierung nur nach Ausbau und Reinigung der Flusszelle erneut durchgeführt.

Aufgrund der Verwendung eines He/Ne-Lasers mit einer Wellenlänge von 632.8 nm konnte der Gyrationradius (R_G) für die untersuchten Hämocyanine nicht bestimmt werden. Deren Durchmesser ist zum Teil deutlich kleiner als 1/20 (~32 nm) der verwendeten Wellenlänge, so daß bei den Arthropoden-Hämocyaninen isotrope Streuung vorliegt.

Da die Konzentrationsbestimmung ausschließlich mit einem UV-Vis-Detektor durchgeführt wurde, lag die Limitierung der Genauigkeit der bestimmten Molekulargewichte in der Genauigkeit der verwendeten spezifischen Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm und der Brechungsindex-Inkrementen (dn/dc). Beide Größen gehen in die Berechnung des Molekulargewichts ein (Pkt. 2.10.1.1) und sind nicht unabhängig voneinander. Fehlerhafte Werte führen zu einer dementsprechend fehlerhaften Bestimmung des Molekulargewichts.

4.1.5 Molekulargewichtsbestimmung der Arthropoden-Hämocyanine

Betrachtet man das gegen das Volumen aufgetragene M_r (Abb. 3.5 A1-J1), so zeigt der nahezu horizontale Verlauf der Molekulargewichtskurven, daß es sich um monodisperse Proben handelt. Die zumeist vorhandene leichte Krümmung der Kurven kann ihre Ursache in der instrumentellen Verbreiterung der Peaks haben, die zwischen den Flußzellen des UV-Vis- und des Lichtstredetektors auftritt [Wyatt and Papazian, 1993]. Durch diese wird die Konzentration am Peak-Maximum niedriger, das M_r also zu hoch bestimmt und umgekehrt, an den Randbereichen der Peaks höher und das M_r zu niedrig bestimmt [Zhu et al., 1996].

Weitere Ursachen hierfür könnten, wie bereits unter Punkt 3.3.1 beschrieben, eine polydisperse Probe, die durch die Säule nicht aufgetrennt werden konnte, oder aber ein unzureichendes Alignment des Lichtstreu- mit dem UV-Vis-Detektor sein. Für ein korrektes Alignment ist das Volumen zwischen Lichtstreu- und UV-Vis-Detektor von entscheidender Bedeutung. Wird es zu groß gewählt, so wird der M_r vs. Vol-Plot eine positive, wird es zu klein gewählt eine negative Steigung aufweisen [Wyatt and Papazian, 1993]. Das Volumen sollte zwischen 0.08 ml und 0.2 ml betragen [Wyatt, Instruction Manual, 1996] und lag bei den vorliegenden Messungen bei 0.1 ml.

Die mittels Lichtstreuung bestimmten M_r der Hämocyanine zeigten aufgrund der zum Teil deutlich unterschiedlichen spezifischen Extinktionskoeffizienten und Brechungsindex-Inkrementen eine große Schwankungsbreite.

Hierbei zeigen die mit den Extinktionskoeffizienten des Bradford-Assays und dem Brechungsindex-Inkrement aus der Literatur errechneten Molekulargewichte die beste Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten bzw. aus der Sequenz errechneten M_r (Tab. 3.8; Tab 3.10).

Für das Cheliceraten-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* sind M_r mittels SDS-Gelelektrophorese und analytischer Ultrazentrifugation bestimmt worden [Markl et al., 1976]. Die aus dem durchschnittlichen M_r der Untereinheiten errechneten M_r des Oligomers ergeben Werte von 1.704 Mio. Dalton bzw. 1.687 Mio. Dalton. Seit kurzem ist auch die vollständige Aminosäuresequenz der einzelnen Untereinheiten bekannt [Voit et al., 2000]. Das hieraus errechnete M_r liegt bei 1.727 Mio. Dalton. Die Werte zeigen somit eine gute Übereinstimmung mit dem von mir mit dem Extinktionskoeffizienten aus der Literatur bestimmten M_r von 1.709 Mio. Dalton (Tab. 3.7).

Die bisher veröffentlichten Molekulargewichte des Cheliceratenhämocyanins von *Limulus polyphemus* wurden mit SDS-Page, Ultrazentrifugation und Lichtstreuung bestimmt [van Holde und van Bruggen, 1971; Sullivan et al., 1976; Salvato and Zatta, 1978; Johnson und Yphantis, 1978; van Holde and Miller, 1982; Loeffler et al., 1978] und liegen zwischen 3.12 Mio. Dalton und 3.92 Mio. Dalton (Tab. 3.10). Meine Lichtstremessungen ergaben ein mit dem Extinktionskoeffizienten aus der Literatur errechnetes Molekulargewicht von 3.501 Mio. Dalton (Tab. 3.7) und zeigte mit dem aus der Sequenz von Untereinheit II [Nakashima et al., 1986] hochgerechneten M_r von 3.486 Mio. Dalton eine sehr gute Übereinstimmung.

Auch die Molekulargewichte der Crustaceenhämocyanine variierten aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten (Pkt. 3.1.1, Pkt 4.1) stark. Für die 12-meren Hämocyanine wurden M_r zwischen 783 kD und 1084 kD bestimmt. Die beste Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur wird, mit Ausnahme dessen von *Panulirus interruptus*, wiederum mit den Extinktionskoeffizienten des Bradford-Assays erreicht (Tab 3.7). Die von mir für das Hämocyanin von *Panulirus interruptus* mittels Lichtstreuung ermittelten M_r von 518.400 Da bzw. 558.900 Da (Tab. 3.7) liegen deutlich höher als das mit 453.258 Dalton aus der Sequenz errechnete Molekulargewicht [Bak et al., 1987; Jekel et al., 1988; Neuteboom et al., 1992].

Die Untersuchungen verdeutlichen, daß es sehr schwierig ist, ohne die genaue Kenntnis der spezifischen Extinktionskoeffizienten und Brechungsindex-Inkrementen, die genauen Molekulargewichte zu bestimmen. Es kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht zweifelsfrei entschieden werden, welcher der verwendeten Assays für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten am geeignetsten ist. Verglichen mit Molekulargewichtsangaben aus der Literatur ist für die untersuchten Hämocyanine der Bradford-Assay am besten geeignet. Die mit dem Extinktionskoeffizienten des Lowry-Assays bestimmten Molekulargewichte liegen dagegen höher, die mit dem Extinktionskoeffizienten von Scopes errechneten Werte deutlich niedriger.

Abb. 4.1 faßt alle, mit der Methode der Laser-Lichtstreuung ermittelten Molekulargewichte der verschiedenen Hämocyanine in Abhängigkeit der verwendeten Extinktionskoeffizienten zusammen.

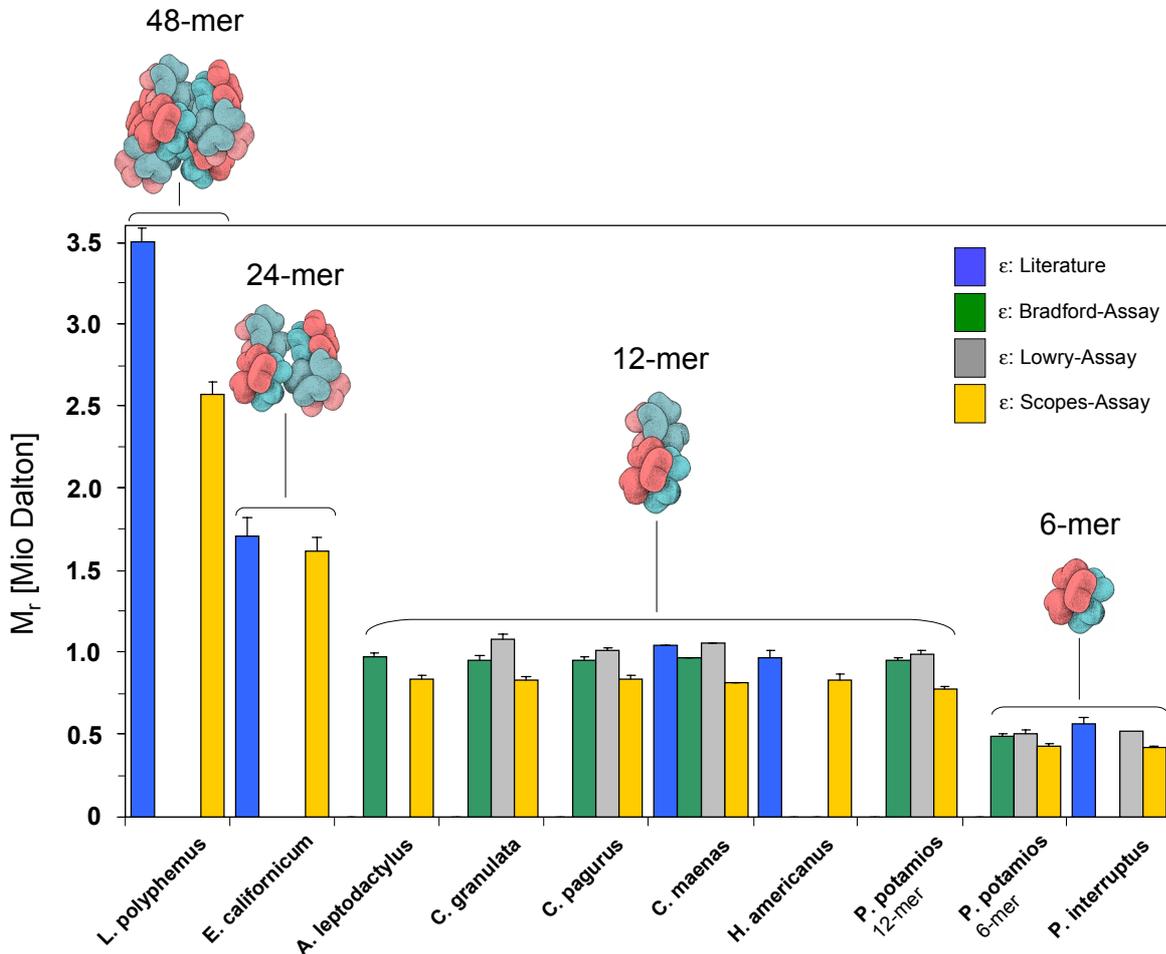


Abb. 4.1: Molekulargewichte der verschiedenen Arthropodenhämocyanine in Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten.

Die Graphik zeigt die Molekulargewichte der verschiedenen Arthropodenspezies, die sich in ihrem Oligomerisierungsgrad unterscheiden, in Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Mittelwerte aus mehreren Messungen dar. Lücken sind darauf zurückzuführen, daß die entsprechenden Werte nicht bestimmt wurden.

Weitere Einflüsse auf die Bestimmung der M_r in Lösung könnte die Bindung von Zuckermolekülen und Fetten am nativen Hämocyanin haben. Während bei den Cheliceraten-Hämocyaninen aus *Limulus polyphemus* und *Eurypelma californicum* ein Kohlenhydratanteil nicht nachgewiesen werden konnte [van Kuik et al., 1987; Markl and Decker, 1992], wurde die Anwesenheit von kovalent gebundenen Kohlenhydraten für einige andere Arthropoden-Hämocyanine gezeigt. Die Hämocyanine von *Androctonus australis*, *Panulirus interruptus* und *Astacus*

leptodactylus besitzen etwa 1% (w/w) kovalent gebundenen Zucker [Debeire et al., 1986; van Kuik et al., 1986; Tseneklidou-Stoeter et al., 1995]. Ellerton et al. [1983] berichten von Zuckergehalten von 1-2% (w/w) für Arthropodenhämocyanine. Bei einem Anteil von maximal 2% (w/w) kann sich das Molekulargewicht gegenüber der reinen Primärsequenz um etwa 18.000 Da erhöhen. Verglichen mit der Variation der Molekulargewichte durch die verschiedenen Extinktionskoeffizienten (Tab. 3.7) ist dieser Faktor vergleichsweise gering. Die Bindung von Zuckermolekülen am nativen Hämocyanin kann somit weder das für das Hämocyanin von *Panulirus interruptus* noch für das der übrigen Crustaceenhämocyanine gegenüber der Sequenz höher bestimmte M_r ausreichend erklären.

Die Bindung von Fetten an Hämocyanine wurde in der Literatur bisher lediglich für *Carcinus maenas* beschrieben [Zatta, 1981]. Gereinigtes Hämocyanin dieser Spezies enthielt etwa 1.5% (w/w) pro Untereinheit. Dies entspräche bei dem M_r des 12-mers lediglich 13.500 Da und kann die erhöhten M_r auch nicht ausreichend erklären.

4.1.6 Einfluß des Brechungsindex-Inkrementes auf die Molekulargewichtsbestimmung der Arthropodenhämocyanine

Legt man den Berechnungen der Molekulargewichte von *Astacus leptodactylus*, *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus* und *Homarus americanus* die Brechungsindex-Inkmente zugrunde, die mit dem Scanning Michelson Interferometer ermittelt wurden (Pkt. 3.2), so liegen diese deutlich unter den Literatur- (Tab. 3.1) und den aus der Sequenz (Tab 3.10) errechneten Werten. Das Brechungsindex-Inkrement geht quadratisch in die Berechnung des M_r ein (Glng. 2.10XI), so daß eine Änderung dieses Wertes eine dementsprechend große Änderung des M_r zur Folge hat.

Die spezifischen Brechungsindex-Inkmente von Proteinen variieren je nach Lösungsmittel zwischen $0.160 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ und $0.200 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ [Huglin, 1972]. Für Proteine in wässrigen Lösungen, ohne gebundenen Kohlenhydratanteil, liegt das Brechungsindex-Inkrement relativ konstant bei 0.190 mL/g [Wyatt, 1993, Wen et al., 1993]. Für Hämocyanine sind aus der Literatur dn/dc -Werte in Tris-Puffer für die Gastropoden *Stenoplax conspicua*, *Fasciolaria tulipa* und *Marisa cornuarietis* von je $0.194 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ [Herskovits and Hamilton, 1987; Herskovits et al., 1988; 1990] und für das Arthropodenhämocyanin von *Homarus americanus* von $0.180 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ bekannt [Herskovits et al., 1983]. Die von mir mit den Extinktionskoeffizienten des Bradford-

und des Lowry-Assays gemessenen Brechungsindex-Inkrementen (Tab. 3.6) liegen, mit Ausnahme dessen von *Eurypelma californicum* ($0.181 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$), zwischen $0.198 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Homarus americanus*) und $0.240 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Carcinus maenas*). Sie liegen somit an der Obergrenze der für Proteine allgemein bzw. der für Hämocyane aus der Literatur bekannten Werte [Huglin, 1972; Herskovits and Hamilton, 1987; Herskovits et al., 1988; 1990]. Errechnet man dn/dc hingegen mit den niedrigen Extinktionskoeffizienten des Scopes-Assays so liegen sie zwischen $0.169 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ (*H. americanus*) und $0.186 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ (*C. maenas*).

4.1.7 Mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementen

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die relativ hohen dn/dc -Werte auf fehlerhafte ϵ -Werte zurückgeführt werden können oder ob andere Faktoren hier eine Rolle spielen.

Die Hauptfehlerquelle bei der Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementen liegt mit großer Sicherheit in der Probe selbst. Bei den Messungen mit verschiedenen Hämocyaninen stellen die spezifischen Extinktionskoeffizienten, die über die Konzentrationsbestimmung in die Berechnung des Brechungsindex-Inkrementen eingehen (Glg. 2.9.III), den größten Unsicherheitsfaktor dar. Das errechnete dn/dc ist hierbei proportional zu ϵ . Eine Änderung des Extinktionskoeffizienten ergibt somit die entsprechende Änderung im Brechungsindex-Inkrement. Das erklärt, daß die mit den ϵ -Werten des Scopes-Verfahrens ermittelten dn/dc -Werte deutlich niedriger sind als die mit dem ϵ -Wert des Bradford- und des Lowry-Assays errechneten Werte.

Weitere Fehler bei der Bestimmung des Brechungsindex-Inkrementen könnten durch Temperaturfluktuationen während der Messung bedingt sein. Diese sind allerdings bei der Versuchsanordnung des Scanning-Michelson-Interferometers sehr gering. Das Gerät stand in einem mittels einer Klimaanlage temperierten Raum, in dem die Lösungen einen Tag vor der Messung vortemperiert wurden. Zusätzlich war das Refraktometer mit einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur eingestellt. Für das verwendete Gerät wurden Temperaturfluktuationen von lediglich einigen mKelvin gemessen [Becker et al., 1995].

Wie auch bei den Lichtstreuungsmessungen mußte eine gute Entgasung der Lösung gewährleistet sein [Becker et al., 1995]. Eine weitere Fehlerquelle kann die zu

schnelle Injektion der Proben in die Küvette sein. Dreifach-Injektionen einer jeden Probe ergaben jedoch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Phasenshifts (Φ).

4.1.8 Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von *Eurypelma californicum* mittels MALDI-TOF

Die mittels MALDI bestimmten mittleren Molekulargewichte der Untereinheiten von *Eurypelma californicum* liegen zwischen 71.476 Da und 71.956 Da und zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den aus erst kürzlich veröffentlichten Sequenzdaten errechneten M_r [Tab. 3.9; Voit et al., 2000]. Die Abweichungen betragen lediglich zwischen 0.1-0.3% (Tab. 3.9), was einer Masse von 1-2 Aminosäuren entspricht. Sie liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die der BSA-Eichung und noch unterhalb der vom Hersteller angegebenen Spezifikation von $\pm 0.5\%$.

Eine Übereinstimmung mit den M_r aus den Sequenzdaten konnte erwartet werden, da für das native Hämocyanin von *Eurypelma californicum* keine Glykosylierung nachgewiesen werden konnte [van Kuik et al., 1987; Markl and Decker, 1992], die in einem gegenüber der reinen Primärsequenz höheren Molekulargewicht resultieren würde.

Neben den ein- und mehrfach geladenen Hämocyaninmolekül-Peaks tritt beim Dissoziat im Bereich von 13.200-13.900 Da ein zusätzlicher Peak auf. Beim Gemisch der Untereinheiten a, g und f, dem Heterodimer bc und bei Untereinheit e trat ein zusätzlicher Peak im Bereich von 11.100-11.800 Da auf. Eine mit Size-Exclusion-Chromatographie und Laser-Lichtstreuung überprüfte Ausgangsprobe zeigte allerdings keine Molekülspezies in diesem Molekulargewichtsbereich. Es ist somit wahrscheinlich, daß diese entweder durch die Präparation der Probe oder durch die Bestrahlung mit dem UV-Laser entsteht.

Die Peaks sind an ihrer Basis mit bis zu 4000 Da relativ breit (Abb. 3.6). Die Breite der Peaks bei halber Höhe (FWHH) wird häufig dazu verwendet, die Auflösung (R) des Massenspektrometers zu berechnen. Sie kann bei Flugzeitmassenspektrometern aus einem einzelnen Peak mit $M/\Delta M$ berechnet werden. M ist hierbei die mittlere gemessene Masse in Da und ΔM die Halbwertsbreite bei halber Peakhöhe in Da. Allerdings ist dieses Kriterium bezüglich der Auflösung der Massen

problematisch. Eine so errechneter Wert von beispielsweise 1000 bedeutet nicht, daß Massen mit dem Molekulargewicht von 1000 und 1001 Da getrennt detektiert werden können. Hierzu muß die Auflösung wesentlich höher liegen [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Bei der Verwendung von `Time of Flight`-Detektoren im linearen Messmodus kann eine maximale Auflösung $[M/\Delta M]$ von bis zu 500 erreicht werden [Siuzdak, 1996].

Untereinheiten	Peakbreite bei halber Peakhöhe [Dalton]	Auflösung (R) $M/\Delta M$
Dissoziat in 0.05 M GlyOH	1800	40
<u>a</u> , <u>g</u> , <u>f</u> in H ₂ O	1000	72
<u>bc</u> in H ₂ O	1430	50
<u>d</u> in H ₂ O	1114	65
<u>e</u> in H ₂ O	1050	68

Tab. 4.2: Breite der Peaks der einfach geladenen Proteinmoleküle $[M-H^+]$ bei halber Höhe und die daraus errechnete Auflösung $[M/\Delta M]$.

Die Auflösung der Messungen mit *Eurypelma*-Hämocyanin ist in dem relativ hohen Massenbereich sehr niedrig (Tab. 4.2). MALDI-Spektren von über Ionenaustausch und C₈-Reversed-Phase aufgereinigten Fraktionen von *Limulus polyphemus*-Hämocyanin zeigten mit einer Halbwertsbreite von etwa 1600 Da und einer Auflösung von 45 vergleichbare Werte [Maddaluno et al., 1999]. Die Gründe hierfür können in einer mangelnden Empfindlichkeit der Detektoren in diesem Massenbereich liegen [Lottspeich, 1998]. Mit zunehmender Masse werden neben Sekundärelektronen auch Sekundärionen mit kleinem Masse/Ladungsverhältnis am Detektor erzeugt. Die unterschiedlichen Massen dieser Sekundärionen führen dann zu Laufzeitdispersionen zwischen Konversionsdynode und Sekundärelektronenvervielfacher.

Weiterhin kann die Tatsache, daß nicht alle Ionen zur gleichen Zeit desorbiert und ionisiert werden, zu Energie-, Zeit- und Ortsunschärfen führen. Dies kann in einer Verbreiterung der Peaks und in einer Verschlechterung der Auflösung resultieren. Ferner lösen abstoßende Kräfte zwischen den Ionen eine Anfangsenergieverteilung der Ionen aus. Abschirmeffekte können dafür verantwortlich sein, daß ein Ion nicht

die gesamte Beschleunigungsstrecke im elektrischen Feld durchläuft [Lottspeich, 1998].

Ausgehend von den Sequenzdaten [Voit et al., 2000; Tab. 3.9] liegt der größte Massenunterschied in den zur Messung verwendeten Gemischen mit 518 Da zwischen den Untereinheiten a und g. Die Untereinheiten b und c unterscheiden sich um 470 Da. Aufgrund der geringen Auflösung ist nachvollziehbar, daß einzelne Untereinheiten in den Gemischen nicht getrennt detektiert werden können, sondern lediglich ein Mittelwert gemessen wird.

4.2 Stabilität des oligomeren Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Denaturierungsexperimente mit dem Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* Aufschluß über die Stabilität und die komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen strukturellen Ebenen des Oligomers und einer einzelnen Untereinheit geben. Hierbei lag der Schwerpunkt nicht auf einer vergleichenden Studie zur Wirkungsweise verschiedener denaturierender Agenzien, sondern es war Ziel der Arbeit, den Denaturierungsprozeß am Beispiel eines Denaturierungsmittels (GdnHCl) im Detail zu verfolgen.

Das Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* eignet sich hierfür besonders gut, da die Kenntnis des Aufbaus der Quartär- und Tertiärstruktur [Linzen et al., 1985, 1989; de Haas and van Bruggen, 1994], der vollständigen Aminosäuresequenzen der sieben verschiedenen Untereinheiten [Voit et al., 2000] und der Röntgenstruktur der nahe verwandten Hämocyanine von *Panulirus interruptus* und *Limulus polyphemus* [Volbeda and Hol, 1989; Hazes et al., 1993] eine Interpretation der Ergebnisse der Denaturierung auf struktureller Ebene ermöglicht.

4.2.1 Dissoziation des 24-meren Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Viele Arthropodenhämocyanine dissoziieren bei einem alkalischen aber noch physiologischen pH und durch den Entzug divalenter Kationen in ihre Untereinheiten [van Holde et al., 1992; van Holde and Miller 1982, 1995; Ellerton et al. 1983; Salvato et al. 1990; Markl et al., 1992].

Daher wurde die Dissoziation des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* durch GdnHCl in Abhängigkeit des pH-Werts und der Anwesenheit divalenter Kationen mittels Lichtstreuung untersucht.

Die Ergebnisse der Lichtstreuung zeigen, daß das 24-meren Hämocyanin in Gegenwart von GdnHCl gegenüber Schwankungen des pH-Werts im Bereich von pH 7.0 und pH 8.0 und bezüglich der Anwesenheit divalenter Kationen relativ unempfindlich ist (Abb. 3.7). Lediglich der Ansatz bei pH 7 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigt eine leicht verminderte Stabilität.

Der Dissoziationsprozeß oligomerer Proteine führt häufig über strukturelle Intermediate. Herskovits et al. [1981] konnten zeigen, daß das Hämocyanin von *Homarus americanus* erst in Hexamere und dann in Monomere dissoziiert. Für das 24-mere Hämocyanin von *Eurypelma californicum* konnten Intermediate nach Dialyse gegen Puffer mit alkalischem pH mittels PAGE für eine kurze Zeit nachgewiesen werden [Markl et al., 1981; Savel-Niemann et al., 1988]. Diese wurden als 19- bzw. 7-mere identifiziert.

Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* unter dem Einfluß von GdnHCl lediglich nach 4 Minuten bei pH 7 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} und bei pH 8 mit Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} eine schwache Zwischenstufe detektiert, die nach 24 Stunden nicht mehr vorhanden war. Die Ergebnisse zeigen, daß zumindest keine langlebigen Zwischenstufen existieren. Nach dem die ersten Untereinheiten vom Oligomer abdissoziieren, zerfällt das Oligomer vollständig in seine Untereinheiten.

4.2.2 Wechselwirkungen im oligomeren *Eurypelma*-Hämocyanin

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine hierarchische Struktur des Oligomers von *Eurypelma californicum* und des nahe verwandten Hämocyanins von *Androctonus australis* [Boisset et al., 1990; de Haas et al., 1991; de Haas et al., 1994]. Die hierarchische Struktur weist hierbei drei verschiedene Kontaktbereiche zwischen den Untereinheiten auf: Die Kontakte der Untereinheiten innerhalb der Hexamere, die Hexamer-Hexamer-Kontakte und die Kontaktbereiche zwischen den zwei identischen Halbmolekülen.

Die Kontaktbereiche der Monomere im 12-meren Crustaceenhämocyanin unterscheiden sich von denen der Cheliceratenhämocyanine von *Eurypelma californicum* und *Androctonus australis* [Markl et al., 1980; Lamy et al., 1981; Boisset et al., 1990; de Haas et al., 1994]. Ergebnisse der Dissoziation von Crustaceenhämocyaninen [Herskovits et al., 1981; 1988] sind also nicht zwingend auf Cheliceratenhämocyanine übertragbar.

Untersuchungen mit Salzen der Hofmeisterserie und mit Harnstoff und seinen Alkylderivaten zeigen allerdings, daß das Oligomer effektiver mit hydrophilen als mit hydrophoben Reagenzien dissoziiert werden kann [Fertl, 1989; Hübler et al., 1998]. Diese Ergebnisse zeigen somit eine gute Übereinstimmung mit Untersuchungen des

nahe verwandten Crustaceenhämocyanins von *Homarus americanus* [Herskovits et al., 1981].

Zur Bestimmung der Aminosäuren, die sich in der Kontaktregion der Untereinheiten befinden, wurde ein auf das Homohexamer von *Limulus polyphemus* [Hazes et al., 1993] modelliertes 6-mer von *Eurypelma californicum* herangezogen (Pkt. 4.3.1) und die Abstände der Aminosäuren mittels des Programmes Swiss-PDB-Viewer 3.7 [Guex et al., 1996] bestimmt. Für die Beurteilung der Kontakte der Untereinheiten b und c zwischen den 12-meren diente die Struktur des 24-meres von *Eurypelma californicum*, die auf Basis der elektronenmikroskopischen und nach SAXS-Daten modifizierten Struktur erstellt wurde [de Haas et al., 1993; Decker et al., 1996].

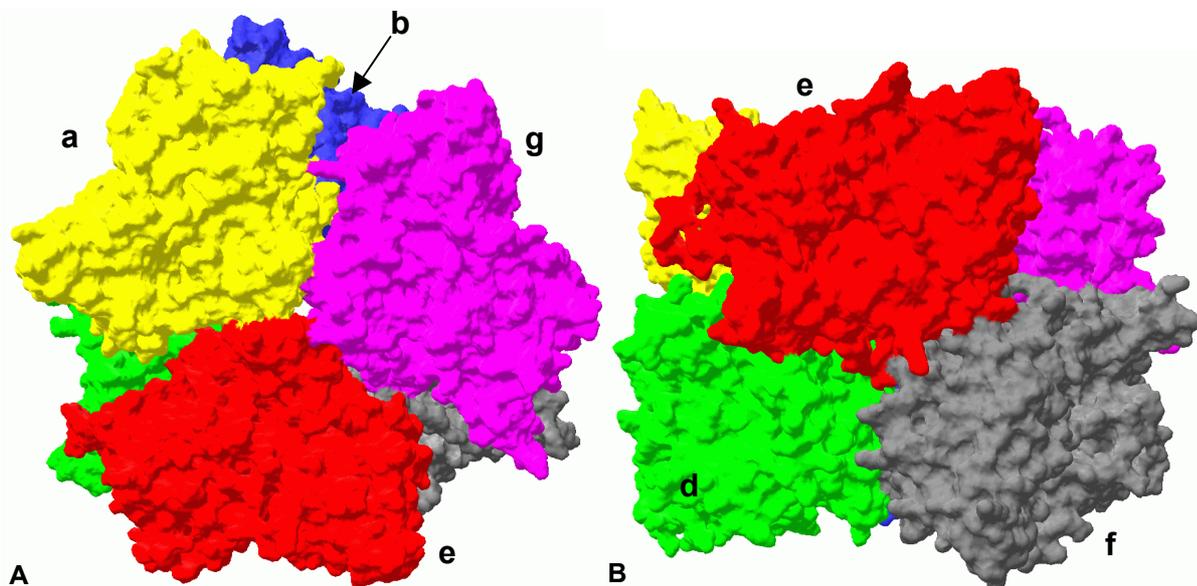


Abb. 4.2: Räumliche Anordnung der Untereinheiten im Hexamer von *Eurypelma californicum*.

Dargestellt ist die auf die hexamere Struktur von Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [11a; Hazes et al., 1993] modellierte hexamere Struktur von *Eurypelma californicum*. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Swiss-Pdb-Viewer 3.7 [Guex et al., 1996]. Bild A zeigt die Aufsicht entlang der dreifaltigen Rotationsachse, Bild B die um 90° gedrehte Seitenansicht. Untereinheit a ist gelb, Untereinheit b blau, Untereinheit d grün, Untereinheit e rot, Untereinheit f grau und Untereinheit g violett dargestellt.

Abbildung 4.3 auf der gegenüberliegenden Seite zeigt die Orientierung der Untereinheiten b und c im 24-meren Hämocyanin von *Eurypelma californicum* [Decker et al., 1996].

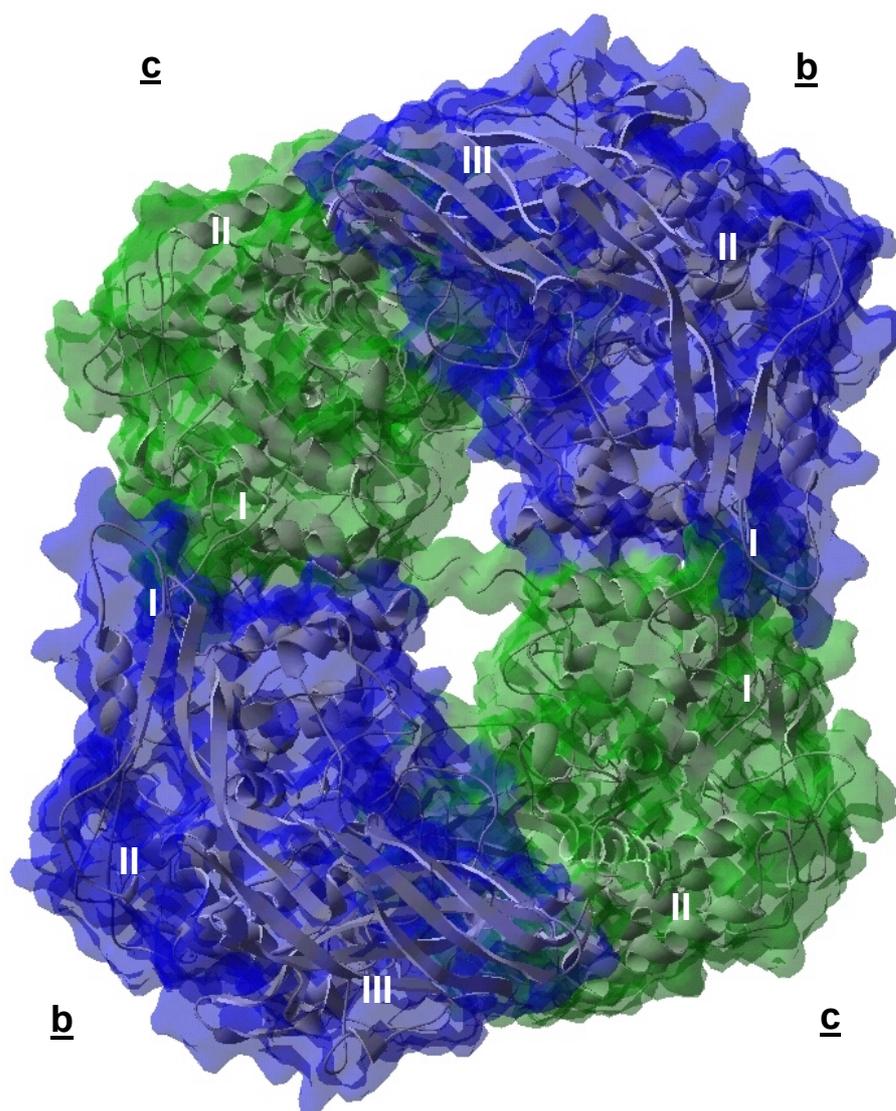


Abb. 4.3: Orientierung der Untereinheiten b und c im 24-meren Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* [Decker et al., 1996].

Die Abbildung zeigt die Kontaktregionen der Untereinheiten b (blau) und c (grün) zwischen den Hexameren innerhalb der jeweiligen Halbmoleküle und zwischen den 12-meren innerhalb des 24-meren Hämocyanins. Die Domänen der jeweiligen Untereinheiten sind mit I-III bezeichnet.

Die Abbildung verdeutlicht, daß die Untereinheiten b und c zwischen den Hexameren innerhalb der 12-meren Halbmoleküle jeweils über Kontakte der Domänen I miteinander verbunden sind. Die Verbindung zwischen den 12-meren erfolgt jeweils durch Kontakte der Domänen II und III der Untereinheiten b und c.

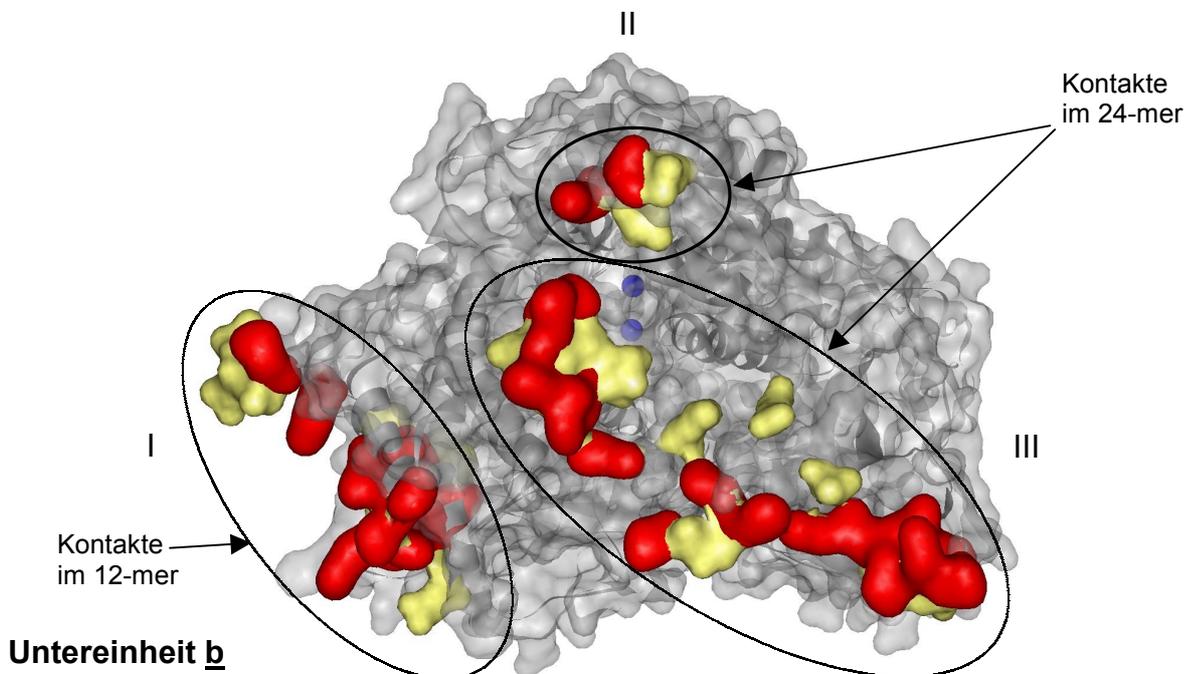
Die Anzahl der polaren und unpolaren Aminosäuren in den Kontaktbereichen der Untereinheiten innerhalb des Hexamers und zwischen den Untereinheiten b und c sind auf der folgenden Seite in Tabelle 4.3 angegeben.

Untereinheiten	Art der Kontakte	
	polare Aminosäuren Anteil [%]	unpolare Aminosäuren Anteil [%]
Ue-Kontakte im 6-mer [4 Å]	71	29
bc-Kontakte gesamt [3 Å]	61	39
bc-Kontakte im 12-mer	54	46
bc-Kontakte im 24-mer	64	36

Tab. 4.3: Anzahl der polaren* und unpolaren Aminosäuren in den Kontaktbereichen der Untereinheiten (Ue) innerhalb des Hexamers und zwischen den Untereinheiten b und c des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.**

Die Aminosäuren im Kontaktbereich der Untereinheiten b und c, die von der 24-meren Struktur ausgehen [Decker et al., 1996], wurden lediglich in einem Abstand bis 3 Å ausgewählt, da zur Anpassung des elektronenmikroskopischen Modells an die SAXS-Daten [de Haas et al., 1994] der Abstand zwischen den 12-meren von etwa 11.9 nm auf 10.5 nm minimiert wurde. Dadurch verringert sich der Abstand einiger Aminosäuren auf bis zu 1 Å. * : polare Aminosäuren: Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys, *Lys*, *Arg*, *His*, *Asp*, *Glu* (geladene Aminosäuren sind kursiv dargestellt).** : unpolare Aminosäuren: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp. Die Einteilung der Aminosäuren wurde aus Voet and Voet, 'Biochemistry', 1993 entnommen.

In Abb. 4.4 sind die Kontaktbereiche der Untereinheiten b, c und e zu anderen Untereinheiten im oligomeren Hämocyanin in der modellierten Struktur dargestellt.



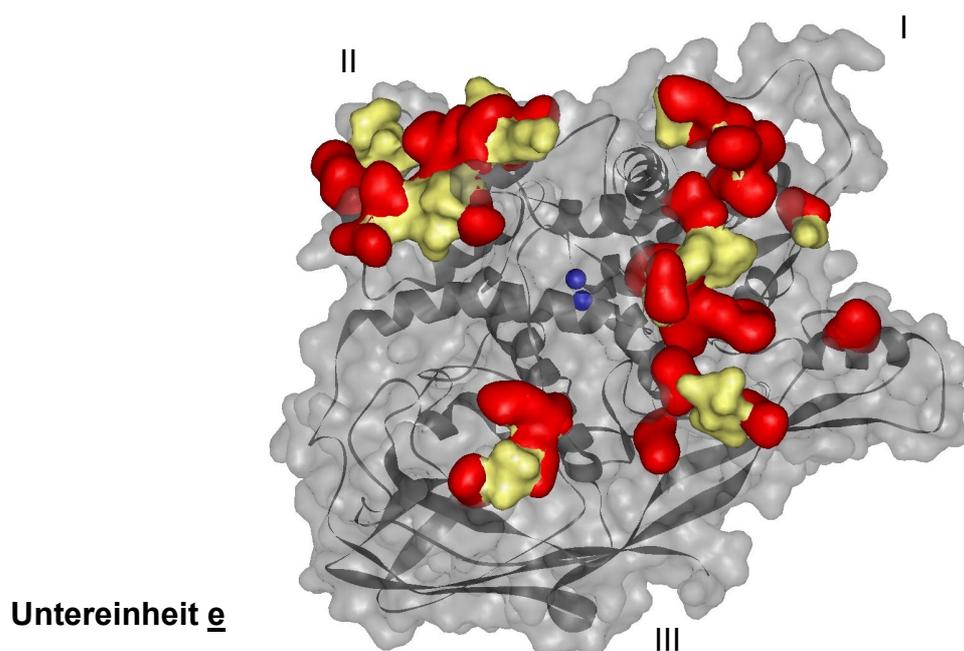
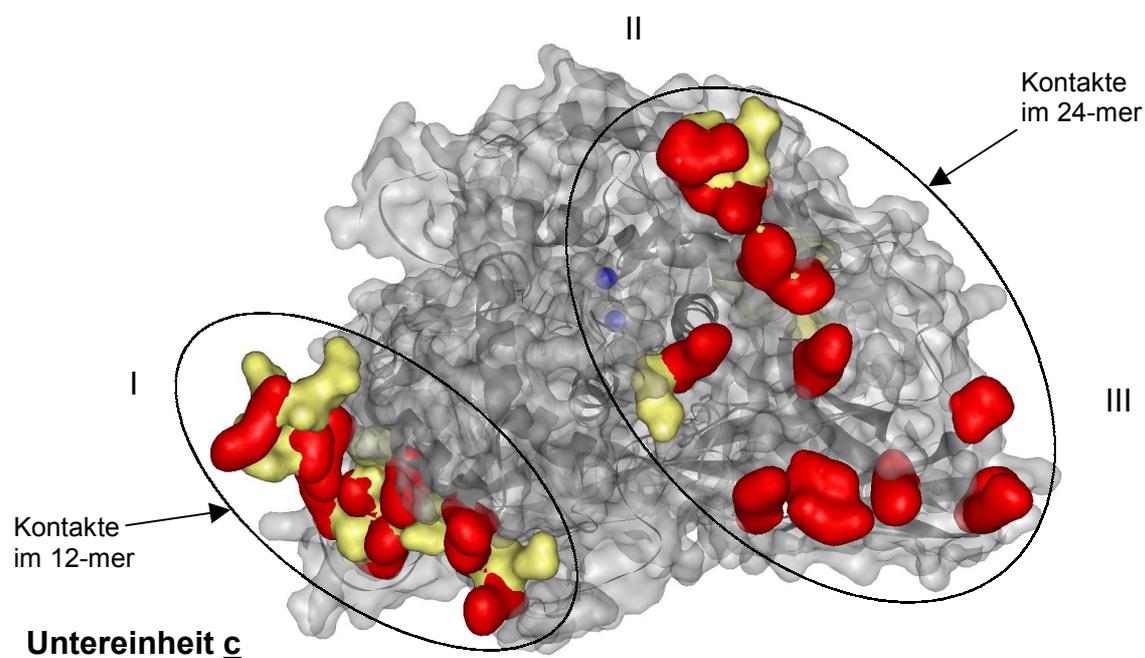


Abb. 4.4: Kontaktbereiche der Untereinheiten im Oligomer am Beispiel der Untereinheiten b, c und e.

Die Aminosäuren, die sich im Abstand von bis zu 3 Å bzw. 4 Å (Tab. 4.3) zu Aminosäuren einer anderen Kette befinden, sind eingefärbt. Hierbei sind die polaren und geladenen Aminosäuren rot, die unpolaren Aminosäuren gelb dargestellt. Als Basis dienen jeweils die Untereinheiten des auf das Hexamer der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* modellierten Hexamers von *Eurypelma californicum*. Die Kupfer-Atome des aktiven Zentrums sind blau dargestellt. Bei den Untereinheiten b und c sind die Bereiche der Kontakte zwischen den 12-meren und 24-meren angezeigt.

Die strukturelle Analyse bestätigt, daß die Aminosäuren in den Kontaktbereichen vorwiegend polarer Natur sind. Die Aminosäuren innerhalb des 6–meres, die sich in einem Abstand von bis zu 4 Å zu Aminosäuren einer anderen Untereinheit befinden, sind zu 71% polar. Die Hälfte dieser Seitenketten sind geladen. Der Anteil der unpolaren Aminosäuren beträgt 29%. Zwischen den Hexameren und Dodecameren, im Kontaktbereich (3 Å) der Untereinheiten b und c, sind 61% der Aminosäuren polar, 36% davon geladen. Lediglich 39 % der Aminosäuren sind unpolar. Es zeigt sich, daß die Kontaktamino­säuren der Untereinheiten b und c innerhalb der 12-meren Halbmoleküle in Domäne I mit 54% annähernd zur Hälfte polarer Natur sind, während die Kontakte zwischen den Halbmolekülen in Domäne II und III zu nahezu 2/3 polarer Natur sind.

Die Kontaktbereiche zwischen den Untereinheiten b und c in Domäne II und III (Abb. 4.4) können allerdings mit Fehlern behaftet sein, da zur Anpassung des elektronenmikroskopischen Modells an die SAXS-Daten der Abstand zwischen den 12-meren von etwa 11.9 nm auf 10.5 nm minimiert wurde [Decker et al., 1996]. Dadurch verringert sich der Abstand einiger Aminosäuren auf bis zu 1 Å, was aufgrund nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten nicht realistisch ist. Dennoch ist die hohe Anzahl polarer und geladener Aminosäuren in diesen Bereichen ein zusätzliches Indiz dafür, daß die Wechselwirkung der Untereinheiten im Oligomer polarer Natur sind. Die strukturelle Betrachtung auf Basis der modellierten Untereinheiten kann somit die Ergebnisse, die von Fertl [1989] durch Denaturierungsexperimente mit Hofmeistersalzen und Harnstoff und seinen Derivaten gewonnen wurden, verifizieren.

4.2.3 Fluoreszenzeigenschaften des oligomeren Hämocyanins

Die Fluoreszenz der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin stellt ein wichtiges Signal für die weitere Analyse des Denaturierungsvorgangs der Hämocyanine dar. Anhand des Fluoreszenzverhaltens des 24-mers und der Untereinheiten im nativen bzw. denaturierten Zustand läßt sich neben der Dissoziation des Oligomers auch die Entfaltung und Deoxygenierung einzelner Untereinheiten verfolgen. So können sowohl Informationen über die Stabilität der Bindungen zwischen den Untereinheiten im Oligomer, als auch über die Stabilität der Tertiärstrukturelemente und des aktiven Zentrums gegenüber Denaturierungsmitteln wie GdnHCl gewonnen werden.

Die Fluoreszenz der meisten Proteine, die sowohl Tryptophan als auch Tyrosin besitzen, wird durch die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Das Emissionsmaximum dieser Aminosäuren variiert hierbei mit der Polarität der Umgebung, je nachdem ob sie sich im hydrophoben Inneren des Proteins befinden oder nahe der Oberfläche Kontakt mit dem Lösungsmittel haben. Während z.B. Aldolase, ein Emissionsmaximum bei 328 nm aufweist, liegt das von BSA bei 343 nm [Kronmann and Holmes, 1971]. Beide Proteine besitzen mehrere Tryptophane.

Das 24-mere Hämocyanin von *Eurypelma californicum* nimmt bezüglich der Fluoreszenzemission eine Sonderstellung ein. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm liegt das Emissionsmaximum in wässriger Lösung bei etwa 305 nm, was der Tyrosinfluoreszenz entspricht. Die Tryptophanfluoreszenz wird im nativen Molekül weitgehend gelöscht. Gründe hierfür liegen einerseits im Kontakt der Untereinheiten im Oligomer, andererseits in der Löschung der Tryptophane durch den Cu_2O_2 -Komplex des aktiven Zentrums, der einen starken Quencher für die Tryptophanfluoreszenz darstellt [Boteva et al., 1993]. Die Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch das oxygenierte aktive Zentrum im Oligomer sowie in den einzelnen Untereinheiten erfolgt durch Förster-Transfer (Pkt. 3.5.4). Die Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch Förster-Transfer wird unter Punkt 4.3.4 diskutiert.

Die Fluoreszenzemission der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin kann, neben der Beeinflussung durch das Verhältnis beider Aminosäuren zueinander, auch durch die Möglichkeit einer Energieübertragung von Tyrosin auf Tryptophan beeinflusst werden [Lakovicz, 1986]. Dies wird im Rahmen der Analyse der Denaturierungsexperimente mit Untereinheit e unter Punkt 4.3.7 diskutiert.

Abbildung 4.5 auf der folgenden Seite zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren des nativen 24-mers und des Untereinheitengemisches von *Eurypelma californicum* nach Anregung mit 280 nm.

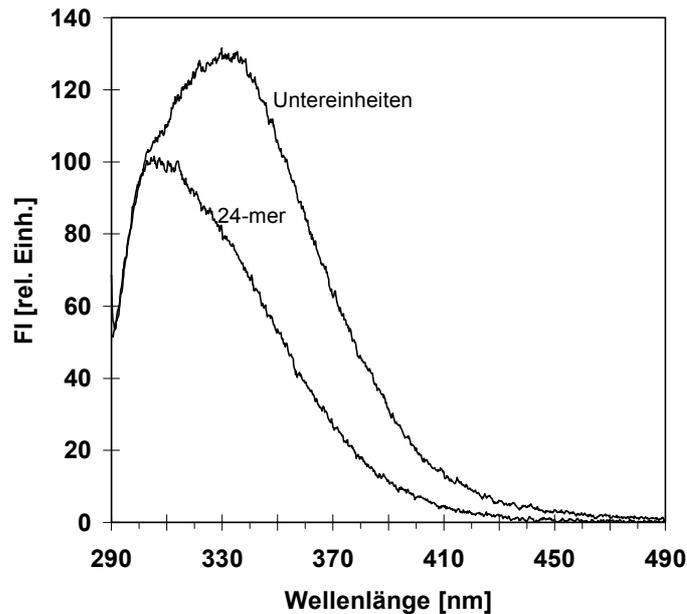


Abb. 4.5: Fluoreszenzemissionsspektren des nativen 24-mers und des Untereinheiten-gemischs von *Eurytelma californicum*.

Das 24-mer war in Tris-HCl Puffer pH 7.8 und das Untereinheitengemisch in Glycin-OH Puffer pH 9.6 gelöst. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm.

Die Dissoziation des 24-mers führt zu einem Ansteigen der Fluoreszenz bei 335 nm um etwa den Faktor 2 (Abb. 4.5). Dies ist nach Boteva et al. [1993] auf Tryptophane zurückzuführen, die durch den Kontakt der Untereinheiten im Oligomer gelöscht werden [Boteva et al., 1993]. Das Maximum bei 335 nm zeigt, daß sich die Tryptophane in vorwiegend hydrophober Umgebung befinden und durch die Dissoziation nicht zum polaren Lösungsmittel exponiert werden. Der Vergleich der Fluoreszenzanisotropie des Oligomers und der Untereinheiten (Abb. 3.19) zeigt weiterhin, daß durch die Dissoziation kein Tryptophan derart exponiert wird, daß es in Lage ist frei zu rotieren.

4.2.4 Fluoreszenzverhalten des oligomeren Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz bei 335 nm zeigt zunächst die beginnende Dissoziation des Oligomers in die Untereinheiten an. Ab einer Konzentration von 1.7 M GdnHCl weist die gleichzeitige Verschiebung der Wellenlänge auf die beginnende Denaturierung hin. Auffällig ist, daß die Fluoreszenzintensität nach 24-stündiger Inkubation des Oligomers ab 3 M GdnHCl in ein Plateau übergeht und

bis 5 M GdnHCl leicht abnimmt (Abb. 3.11). Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität tritt bei der Denaturierung des Dissoziats bereits ab 3 M GdnHCl auf. Auch bei der Denaturierung der Untereinheiten \underline{d} , dem Heterodimer \underline{bc} [Schraml, 1990] und der Untereinheit \underline{e} (Abb. 3.16) konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Berücksichtigt man, daß das Oligomer im Laufe der Denaturierung dissoziiert, deoxygeniert und die Kupferatome des aktiven Zentrums verliert, müßte nach Boteva et al. [1993] die Fluoreszenzintensität bei 335 nm um das 10-11-fache ansteigen. Folglich muß die Tryptophanfluoreszenz stark gelöscht werden. Zusätzlich hierzu tritt die Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm deutlicher hervor. Dies könnte ein Hinweis auf eine Verringerung der Energieübertragung von Tyrosin auf Tryptophan durch die Entfaltung sein. Die möglichen Gründe für die mit zunehmender Denaturierung abnehmende Tryptophan- und ansteigende Tyrosinfluoreszenz werden im Rahmen der Denaturierung von Untereinheit \underline{e} unter Pkt. 4.3.7 eingehend diskutiert.

Ein Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von Oligomeren mit dem eines Untereinheitengemisches in Anwesenheit von GdnHCl sollte zeigen, ob die Denaturierung über unterschiedliche molekulare Spezies verläuft und ob Intermediate entstehen. Dies kann anhand des Verlaufs der Fluoreszenzintensität und der Verschiebung von λ_{\max} während der Denaturierung überprüft werden.

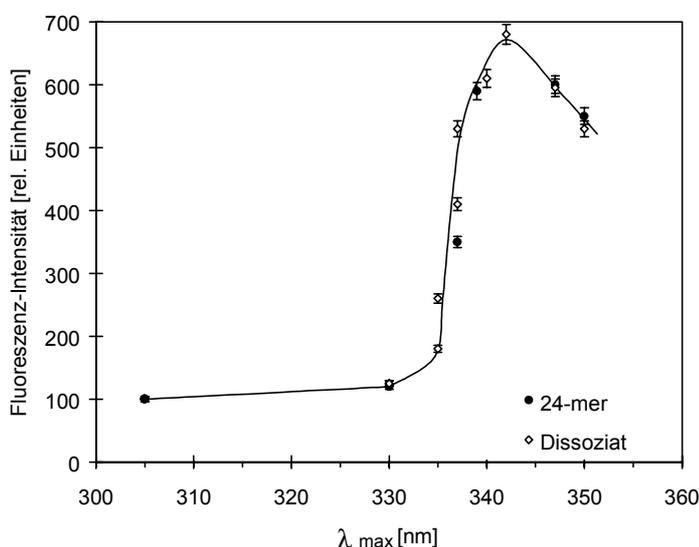


Abb. 4.6: Vergleich der Position der Emissionsmaxima mit der jeweiligen Intensität des 24-mers und eines Untereinheitengemisches unter dem Einfluß von GdnHCl.

Die Proben wurden für 24 Stunden in verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen inkubiert. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0.05 mg/ml. Zu beachten ist, daß die Datenpunkte an der gleichen Position nicht der gleichen Denaturierungsmittelkonzentration entsprechen, da die Untereinheiten im 24-mer gegenüber dem Denaturierungsmittel stabilisiert werden [Hübler et al., 1998].

Der Vergleich zeigt, daß die molekularen Spezies bei einem gegebenen λ_{\max} gleich sind (Abb. 4.6). Unterschiede würden hier zu einem anderen Verhältnis von λ_{\max} und der Intensität führen. Dies ist ein Indiz dafür, daß keine stabilen Intermediate bei der Denaturierung des 24-mers existieren und daß das Oligomer zunächst dissoziiert, bevor die Untereinheiten denaturieren. Dies konnte auch durch Ergebnisse der Immungelektrophorese gezeigt werden [Fertl, 1989; Hübler et al., 1998].

4.2.5 Stabilität der Sekundärstruktur des oligomeren Hämocyanins in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Zur Untersuchung der Stabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* auf der Ebene der Sekundärstruktur, wurde die CD-Spektroskopie angewandt.

Ein Problem bei der Messung von CD-Spektren im fernen UV-Bereich stellt der Puffer dar. Sowohl Tris als auch das verwendete Denaturierungsmittel GdnHCl zeigen bereits ab 200 nm bzw. 210 nm eine starke Absorption, so daß unterhalb dieser Wellenlängen kein Signal mehr detektiert werden kann. Spektren, die nur bis 200 nm bzw. 210 nm gemessen werden können, sind allerdings von sehr beschränkter Aussagekraft bezüglich der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente [Johnson, 1992]. Somit lassen sich bei den vorliegenden Messungen hierüber keinerlei Aussagen machen. Die bis 210 nm gemessenen Spektren können deshalb lediglich den Verlust hauptsächlich der α -helikalen Anteile der Sekundärstruktur aufzeigen, die bei 222 nm ein ausgeprägtes Minimum aufweisen.

Die Denaturierung der Sekundärstruktur beginnt, verglichen mit den Signalen der anderen Methoden, sowohl nach 4 Minuten als auch nach 24 h bei jeweils höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen (Abb. 3.13). Nach 24-stündiger Denaturierung liegt die Elliptizität bei 222 nm in 6 M GdnHCl-Lsg mit -0.7 mdeg noch im negativen Bereich. Das Hämocyanin zeigt kein für ein Zufallsknäuel typisches Spektrum, das bei 222 nm positive Werte aufweist [Davidson and Fasman, 1967]. Dies spricht dafür, daß bei der Denaturierung des 24-meren Hämocyanins mit GdnHCl noch Reststrukturen erhalten bleiben. Nach Tanford et al. [1968] liegen Proteine nach der Denaturierung mit 6 M GdnHCl als Zufallsknäuel vor. Experimente mit kurzen, synthetischen Polymeren, die kaum eine helicale Raumstruktur einnehmen können, zeigen allerdings, daß die Anwesenheit von GdnHCl deutliche Änderungen der

Elliptizität induziert [Robinson and Jencks, 1965]. Dies führen die Autoren auf die Bindung von GdnHCl zwischen zwei Peptidgruppen zurück. Ein weiterer möglicher Effekt könnte in der Änderung der optischen Eigenschaften individueller Aminosäurereste durch GdnHCl liegen [Hvidt et al., 1985]. Die Änderung der Elliptizität wäre somit nicht rein auf der Basis von Konformationsänderungen zu betrachten, was Privalov et al. [1989] zu dem Schluß veranlassten, daß Proteine in einer GdnHCl- oder Säure-Lösung nur nahe 100°C als Zufallsknäuel vorliegen. Bei niedrigeren Temperaturen unterscheiden sich die Spektren säuredenaturierter Proteine von denen, die mit GdnHCl denaturiert wurden.

4.2.6 Verlauf der Denaturierung im Vergleich der verschiedenen spektroskopischen Methoden

Der Vergleich der Ergebnisse der verwendeten Methoden, die jeweils unterschiedliche strukturelle Ebenen des 24-meren Hämocyanins erfassen, soll den Ablauf der Denaturierung verdeutlichen. Abb. 4.7 auf der folgenden Seite zeigt die Übergangsregionen der verschiedenen spektroskopischen Signale unter dem Einfluß von GdnHCl.

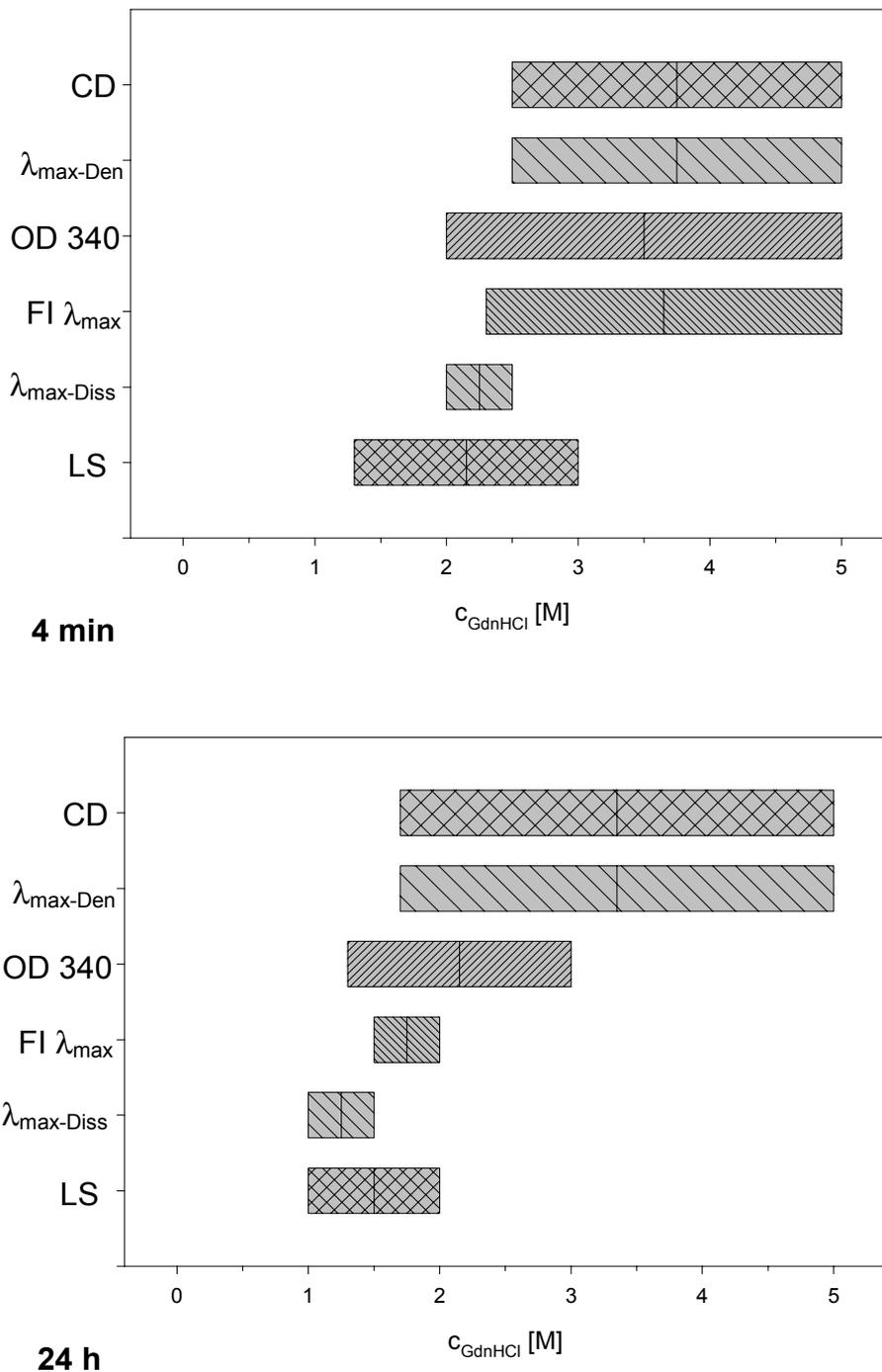


Abb. 4.7: Übergangsregionen der verschiedenen spektroskopischen Signale unter dem Einfluß von GdnHCl.

Die verschiedenen Methoden, die jeweils unterschiedliche Monitore für die Denaturierung darstellen, sind hier, ausgehend von einem 5-95%-igem Signal-Level, in einem horizontalen Balkendiagramm für verschiedene Inkubationszeiten dargestellt. Die Methode der Lichtstreuung erfaßt den Oligomerisierungsgrad des 24-meren Hämocyanins. $\lambda_{\max}\text{-Diss}$ (Ex 280 nm) der Fluoreszenzemission erfaßt den Oligomerisierungsgrad und $\lambda_{\max}\text{-Den}$ die Tertiärstruktur. Die OD 340 und die FI λ_{\max} (Ex 280 nm) erfassen das aktive Zentrum in Domäne 2 bzw. die Fluoreszenz der Tyrosine und Tryptophane. Der Übergang der Elliptizität (Θ) bei 222 nm (CD) repräsentiert die Denaturierung der Sekundärstruktur.

Der Vergleich der Übergangsregionen der Signale der Lichtstreuung und der maximalen Fluoreszenzemissionswellenlänge ($\lambda_{\text{max-Diss}}$) mit denen der übrigen Signale verdeutlicht, daß das oligomere Hämocyanin zunächst weitgehend dissoziiert, bevor die Untereinheiten denaturieren. Dies konnte auch durch den Vergleich des Fluoreszenzverhaltens des 24-mers mit einem Untereinheitengemisch in Anwesenheit von GdnHCl (Abb. 4.6) gezeigt werden. Ergebnisse der Immungelelektrophorese zeigen, daß nach Inkubation in 2 M GdnHCl bereits nach 8 min alle Untereinheiten erkannt werden können, wobei aber noch nicht alle 24-mere dissoziiert sind. Nach 3 h werden sämtliche Untereinheiten, die vom Oligomer abdissoziiert sind, erkannt [Fertl, 1989; Hübler et al., 1998].

Mit der beginnenden Denaturierung, die durch die weitere Verschiebung der Fluoreszenzemissionswellenlänge angezeigt wird ($\lambda_{\text{max-Den}}$), beginnt auch die Deoxygenierung des aktiven Zentrums. Diese ist abgeschlossen, noch bevor die vollständige Denaturierung der Sekundärstrukturelemente erfolgt (Abb. 4.7). Eine Differenzierung der Denaturierung der Untereinheiten hinsichtlich der verschiedenen strukturellen Bereiche des Moleküls, wie bei der Denaturierung von Untereinheit e (Pkt. 4.3), kann hier nicht vorgenommen werden. Der Vergleich der Übergangsregionen des 24-meren Hämocyanins (Abb. 4.7) und Untereinheit e (Abb. 4.18) nach 4 Minuten zeigt, daß die Konzentration des Denaturierungsmittels bei der Dissoziation des Oligomers bereits so groß ist, daß die Entfaltung der Untereinheiten sofort einsetzt. Dies bestätigt ein weiteres Mal die Stabilisierung der Untereinheiten durch die Oligomerisierung [Fertl, 1989; Sterner et al., 1995; Hübler et al., 1998].

4.3 Stabilität der Untereinheit e der Spinne *Eurypelma californicum*

Die Stabilisierung der Untereinheiten im 24-meren Hämocyanin von *Eurypelma californicum* hat zur Folge, daß nach erfolgter Dissoziation unter Einwirkung des Denaturierungsmittels die weniger stabilen Untereinheiten sofort denaturieren. Folglich ist eine detaillierte Analyse dieses Denaturierungsvorgangs nicht mehr möglich ist. Deshalb sollte die Denaturierung einer einzelnen Untereinheit Aufschluß über das Denaturierungsverhalten auf struktureller Ebene ermöglichen.

Hierfür wurde die Untereinheit e gewählt, deren Denaturierung teilweise bereits von Penz (1990) untersucht wurde. Durch die Kenntnis der vollständigen Aminosäuresequenz von Untereinheit e [Voit et al., 2000] läßt sich die räumliche Struktur auf die bekannte Röntgenstruktur von Untereinheit II des nahe verwandten Cheliceraten-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* modellieren. Die Struktur der modellierten Untereinheit e wurde dann als Basis für die molekulare Interpretation der Ergebnisse der Denaturierung verwendet. Die modellierten Strukturen wurden freundlicherweise von Thorsten Schweikardt (Inst. für Molekulare Biophysik) zur Verfügung gestellt.

4.3.1 Modellierte Struktur der Untereinheit e

Zur Modellierung dreidimensionaler Proteinstrukturen bedient man sich des Verfahrens der Homologie-Modellierung. Hierfür wurde das Programm Modeller 4 verwendet [Sali, 1994].

Bei der Modellierung von Proteinen ist stets zu berücksichtigen, daß die modellierte Struktur Fehler aufweisen kann. Mögliche Fehlerquellen können in der unterschiedlichen Packung von Seitenketten, der Konformation und Verschiebung von Kernbereichen und Loops, am häufigsten aber in nicht korrekten Alignments liegen [Sanchez et al. 1997].

Bei einer Sequenzidentität der Zielsequenz von mindestens 40% zur Templatesequenz kann die Modellierung dreidimensionaler Proteinstrukturen mit einer Genauigkeit durchgeführt werden, die einer Röntgenstruktur mit hoher Auflösung gleicht [Sanchez et al., 1997]. Eine Überprüfung verschiedener modellierter Strukturen zeigte Abweichungen des Proteinrückrates (average main chain root mean square deviation) von etwa 5.1 Å bei einer Sequenzidentität von 7%, bis hin zu

Abweichungen von lediglich 0.54-0.90 Å bei Identitäten zwischen 62% und 87% [Schoonman et al., 1989].

Untereinheit e von *Eurypelma californicum* weist zu Untereinheit II von *Limulus polyphemus* eine Sequenzidentität von 55% und eine Homologie von 72% auf [Voit et al., 2000; Abb. 4.8]. Damit weisen Ziel- und Templatesequenz eine ausreichend hohe Identität für eine erfolgreiche Modellierung der Proteinstruktur auf.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
EcaHcE : PDKQKQLRVISLFEHMT-SINT-PLPRDQIDARLHHLGRLPQGELFSCFHEEDLEEATELYKILYTAKDFDEVINLAKQS : 78
LpoHc2 : TLHDKQIRICHLFEQLSSATVIGDGDKHKHSDRLKKNVGLKLPQGAIFSCFHPDHLLEEARHLYEVFWEAGDFNDFLEIAKEA : 80
      KQ R   LFE           RL   G L G   FSCFH   LEEA   LY   A DF   I   AK

      *           100          *           120          *           140          *           160
EcaHcE : RTFVNEGLFVYAVSVALLRDCKGIVVPAIQEIFPDRFVPTETINLAVKEAAN-HPDQ--DISVHVVETGNILDEEYKL : 155
LpoHc2 : RTFVNEGLFAFAAEVAVLRDCKGLVPPVQEIFPDKFIPSAAINEAFKKAHVVRPEFDESPLLDVVDQDGNILDPYRL : 160
      RTFVNEGLF   A   VA   LHRDCKG   VP   QEIFPD   F   P   IN   A   K   A           I   V   V   TGNILD   EY   L

      *           180          *           200          *           220          *           240
EcaHcE : AYPREDVGTNAHHWHWHIVYPATWDPAFMGRMKDRKGEFYMHQMCARYDCERLSNGMRRMIPFSNFDEKLEGYSAHL : 235
LpoHc2 : AYYREDVGINAHHWHWHLVYPSTWNPKYFGKKKDRKGEFYMHQMCARYDCERLSNGMHRMLPFNDFEPLAGYAPHL : 240
      AY   REDVG   NAHHWHWH   VYP   TW   P   G   KDRKGEFYMHQMCARYDCERLSNGM   RM   PF   NFDE   L   GY   HL

      *           260          *           280          *           300          *           320
EcaHcE : TSLVSGLPYAFRPDGLCLHDLKDIIDLKEMFRWRERILDAIDSGYYIDNEGHQVKLDIVDGINVLGALIESSFETKNKLYY : 315
LpoHc2 : THVASGKYSPRPDGLKLRDLGDIIESEMVRMRERILDSIHLGYVISEDGSHKTLDELHGTDILGALVSESVNHEYY : 320
      T   SG   Y   RPDGL   L   DL   DI   EM   R   RERILD   I   GY   I   G   LD   G   LGAL   ESS   E   N   YY

      *           340          *           360          *           380          *           400
EcaHcE : GSLHNWGHVMMARLQDPDRFRFENPGVMSDTSTSLRDPIFYRYHRFIDNIFQKYIATLPHYTPEDLTCPGVHVNVNVTVNA : 395
LpoHc2 : GNLHNWGHVTMARLHDPDGRFHEEPGVMSDTSTSLRDPIFYRNWHRFIDNIFHEYKNTLKPVDHDLNFPDIQVQDVTLHA : 400
      G   LHNWGHV   MAR   DPD   RF   E   PGVMSDTSTSLRDPIFY   HRFIDNIF   Y   TL   Y   L   P   V   VT   A

      *           420          *           440          *           460          *           480
EcaHcE : KVPNVVTTFMKEAELELSYGIDFGSDHSVKVLYRHLDEHPFTYNISVENSSGGAKDVTMRIFLGPKYDELGNRLQPEQQR : 475
LpoHc2 : RVDNVVHTFMREQELELKHGINPGNARSIKARYYHLDHEPFSYAVNVQNNASDKHATVRIPLAPKYDELGNEIKADELR : 480
      V   NVV   TFM   E   ELEL   GI   G   S   K   Y   HLDHEPF   Y   V   N   S   K   T   RIFL   PKYDELGN           R

      *           500          *           520          *           540          *           560
EcaHcE : TLNIELDKFKATLDPGKNVVRDHRNSTVTEQSVPVKLRREGGVAG--EYCSCGWPEHMLIPKGNHRGMDFELFVIV : 552
LpoHc2 : RTAIELDKFKTDLHPGKNVVRHSLDSSVTLSSHQPTFEDLLHGVLNEHKSEYCSCGWPSHLLVPGKNIKGMEYHFLVML : 560
      IELDKFK   L   PGKN   V   R           S   VT           L   G           EYCSCGW   P   H   L   PKGN   GM   L   FV

      *           580          *           600          *           620          *
EcaHcE : TDYAQDAVNGHGENAECVDAVSYCGAKDKYPDKKPMGFPFDRVIEGLTLEEFLLTPSMCTDVRIKYTDIK : 623
LpoHc2 : TDWDKDKV-DGSESVACVDAVSYCGARDHKYPDKKPMGFPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIFHE-- : 628
      TD   D   V   E   CVDVSYCGA   D   KYPDKKPMGFPFDR   I           FLT   M   D   IK

```

Abb 4.8: Alignment der Untereinheit e von *Eurypelma californicum* mit Untereinheit II von *Limulus polyphemus* [Voit et al., 2000].

Dieses Alignment ist aus einem multiplen Alignment sämtlicher Untereinheiten (a-g) von *Eurypelma californicum* mit Untereinheit II von *Limulus polyphemus* entnommen [Voit et al., 2000]. Die konservierten Aminosäuren sind grau unterlegt.

Ausgehend von einer Initialisierungsstruktur [Sali et al., 1994] wurden mehrere Modelle der Untereinheit e von *Eurypelma californicum* angefertigt. Die mittlere Abweichung (RMSD) des Proteinrückrates dieser Modelle zur Templatestruktur liegt zwischen 0.23 Å und 0.27 Å.

Da die modellierte Struktur die Basis für eine Interpretation vor allem der fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse der Denaturierung auf molekularer Ebene darstellen sollte, wurden die verschiedenen Modelle der Untereinheit e bezüglich der Lage der Indolseitenketten der Tryptophane verglichen. Es zeigt sich, daß lediglich Tryptophan 267 eine relativ große Variation in der Orientierung der Seitenkette aufweist (Abb. 4.9). Tryptophan 267 von Untereinheit e ist gegenüber Untereinheit II des Hämocyanins von *L. polyphemus* nicht konserviert (Abb. 4.8). Der größte, bei den verschiedenen Modellen gemessene Unterschied für den Abstand des C_{δ2}-Atoms des Indolrings zu den Kupferatomen des aktiven Zentrums beträgt etwa 3 Å. Die modellierte Struktur bietet somit eine geeignete Grundlage für die Beurteilung der strukturellen Gegebenheiten der Untereinheit.

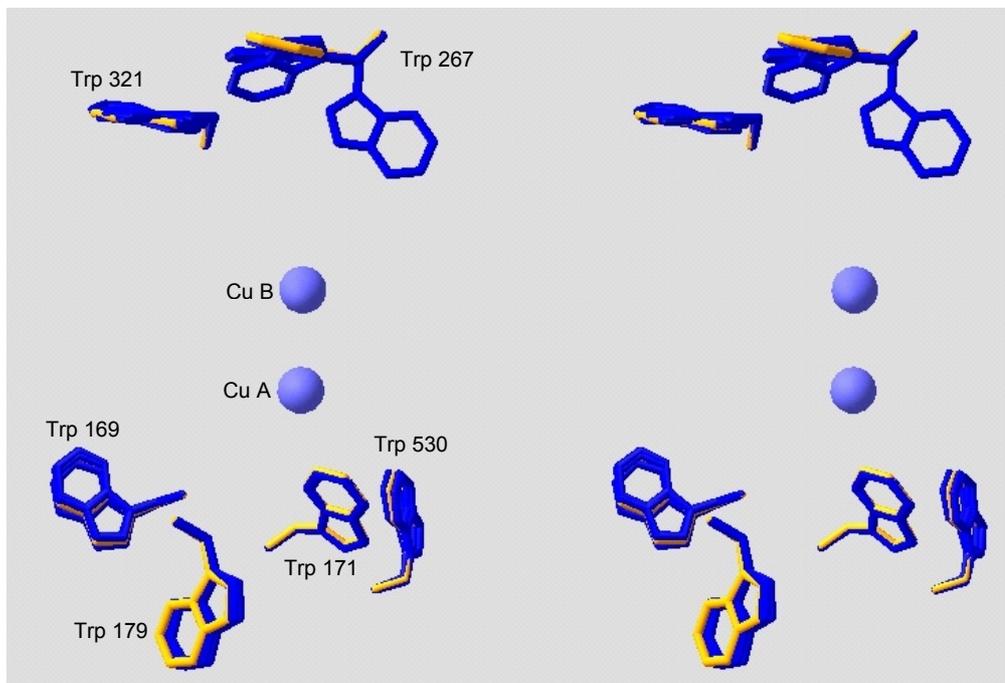


Abb. 4.9: Stereoabbildung der Seitenketten der Tryptophane von sechs verschiedenen Modellen der Untereinheit e.

Dargestellt sind die Seitenketten der Tryptophane und die Kupferatome des aktiven Zentrums der auf Untereinheit II des Hämocyanins *Limulus polyphemus* modellierten Untereinheit e. Die verschiedenen Modelle wurden mit dem Programm Swiss PDB-Viewer (Vers. 3.7) aufeinander gefittet. Die orange eingefärbten Seitenketten stellen das Modell mit der geringsten Abweichung des Proteinrückrates zur Template-Struktur dar.

Für alle folgenden Betrachtungen der 3D-Struktur von Untereinheit e wurde das Modell mit der geringsten Abweichung des Proteinrückrates zur Template-Struktur gewählt (Abb. 4.9).

Abb. 4.10 zeigt die auf Untereinheit II von *Limulus polyphemus* modellierte 3D-Struktur von Untereinheit e des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* mit den drei Domänen und dem aktiven Zentrum.

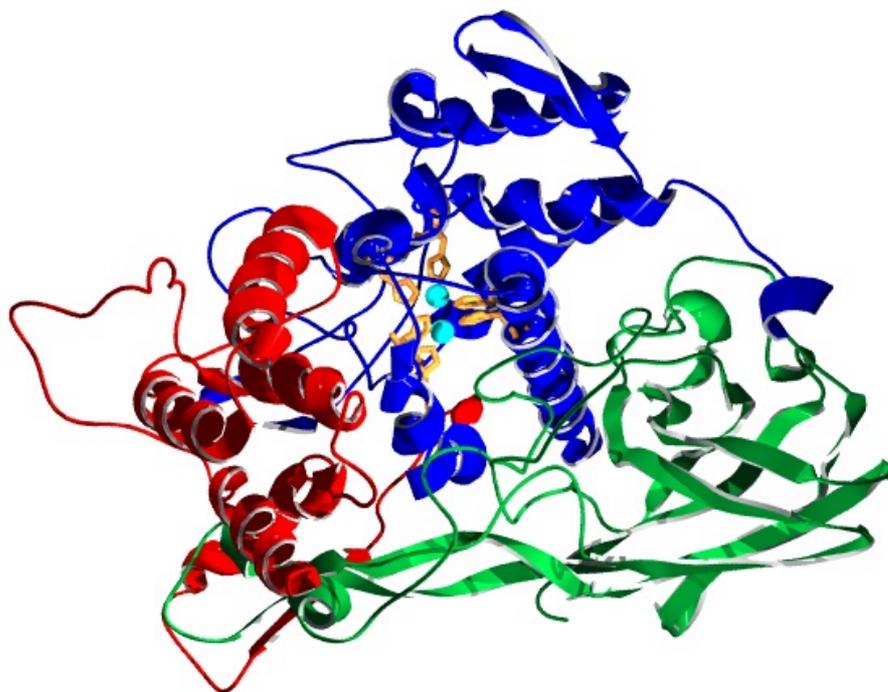


Abb. 4.10: Abbildung der auf Untereinheit II von *Limulus polyphemus* modellierten Untereinheit e von *Eurypelma californicum*.

Die Histidine, die für die Koordination der Kupferatome des aktiven Zentrums (cyan) verantwortlich sind, sind orange dargestellt. Erkennbar sind die vorwiegend α -helicalen Domänen I (rot) und II (blau) und das siebensträngige β -Barrel der Domäne III (grün). Die Abbildung wurde mit dem Programm Swiss PDB Viewer (Vers. 3.7) erstellt.

Die Einteilung der Polypeptidkette in Domänen kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen [Jaenicke, 1999]. Eine Definition besagt, daß es sich um stabile Substrukturen mit einer mittleren Größe von 150 Aminosäuren und einem Durchmesser von etwa 25 Å handelt [Goldberg, 1969; Porter, 1973; Wetlaufer, 1973]. Diese Substrukturen können bestimmte funktionelle Eigenschaften besitzen, wie es für Domäne II der Arthropoden-Hämocyanine mit dem aktiven Zentrum der Fall ist.

Bei Arthropoden-Hämocyaninen erfolgte die Einteilung in Domänen auf Basis der Röntgenstrukturdaten aufgrund der Tertiärstruktur [Gaykema et al., 1984; Linzen et al., 1985; Volbeda und Hol, 1989]. Analog zur Einteilung der Domänen des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* [Volbeda and Hol, 1989] umfaßt bei *Limulus polyphemus* Domäne I die Aminosäuren 1-154, Domäne II die Aminosäuren 155-380 und Domäne III die Aminosäuren 381-628 [Hazes et al., 1993]. Diese Einteilung kann

auch auf der Ebene der Genstruktur nachvollzogen werden. Für Untereinheit e wurden Introns nach den Aminosäuren 141 und 385 gefunden [Voll und Voit, 1990]. Domänen, die wie die der Arthropoden-Hämocyanine verschiedene Faltungsmotive aufweisen, können als thermodynamische Einheiten angesehen werden, die bei der Denaturierung überwiegend two-state Entfaltungsübergänge aufweisen [Tanford, 1968; Privalov, 1979]. Domäne I der Arthropodenhämocyanine besteht größtenteils aus α -Helices, Domäne II besitzt als charakteristisches Faltungsmotiv ein `Four- α -Helix-Bundle`, das die Histidine zur Koordination der Cu-Atome des aktiven Zentrums trägt. Domäne III besteht größtenteils aus einem siebensträngigen β -Barrel und unterscheidet sich so deutlich von den beiden anderen Domänen. Die Dimension einer Untereinheit beträgt etwa $70 \times 50 \times 50 \text{ \AA}^3$.

4.3.2 Position der Cysteine in der modellierten Struktur der Untereinheit e

Die modellierte 3D-Struktur der Untereinheit e wurde auch herangezogen, um die Position möglicher Schwefelbrücken auf Basis der Abstände der Cystein-Seitenketten zu bestimmen. Hiermit sollte die von Penz [1990] biochemisch bestimmte Anzahl und auf Basis der Röntgenstruktur von *Panulirus interruptus* [Volbeda et al., 1989] bestimmte Lage der Schwefelbrücken überprüft werden.

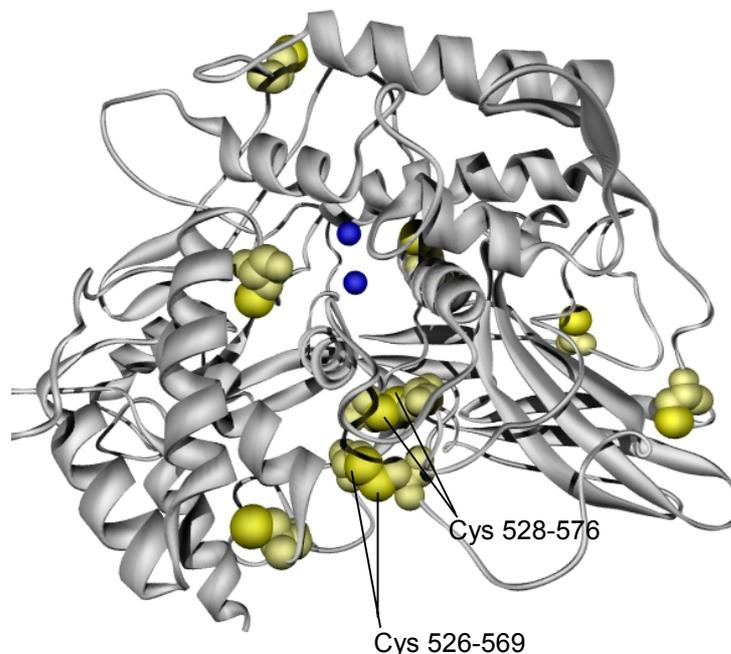


Abb. 4.11: Darstellung der Cysteine in der modellierten 3D-Struktur von Untereinheit e.

Die Cysteine sind hellgelb, die jeweiligen S-Atome dunkelgelb dargestellt. Im der modellierten Struktur [Voit et al., 2000] bilden die Cysteine 526 und 569 und die Cysteine 528 und 576 jeweils eine Disulfid-Brücke.

Abbildung 4.11 zeigt, daß sich zwischen Cys 526 und Cys 569 und zwischen Cys 528 und Cys 576 jeweils eine Disulfid-Brücke ausbilden kann. Diese an den Schwefelbrücken beteiligten Aminosäuren liegen jeweils in hochkonservierten Bereichen von Domäne III und sind gegenüber Untereinheit II von *Limulus polyphemus* konserviert (Voit et al., 2000; Abb. 4.8).

Die Disulfid-Brücken, die von Penz [1990] aufgrund von chemischen Untersuchungen quantifiziert und deren Lage auf Basis der Struktur des *Panulirus*-Hämocyanins abgeschätzt wurde, konnte mittels der auf die Röntgenstruktur des näher verwandten Cheliceraten-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* modellierten Untereinheit e nicht verifiziert werden. Die Abstände der Schwefel-Atome der Cysteine in der modellierten Untereinheit, die von Penz als mögliche Schwefelbrückenbildner angesehen wurden, sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Cystein	Cystein	Abstand [Å]
203	208	11
383	612	17
526	576	7

Tab 4.4: Abstände der Schwefel-Atome der Cysteine, die von Penz [1990] als Schwefelbrückenbildner angenommen wurden, in der modellierten Untereinheit e.

Die Cysteinpaare wurden auf Basis der dreidimensionalen Struktur von *Panulirus interruptus* als Schwefelbrückenbildner angenommen.

Aufgrund der Abstände der Schwefel-Atome der übrigen Cysteine im Modell, die 7 Å und mehr betragen, ist davon auszugehen, daß sie keine Disulfid-Brücken bilden können.

Ausgehend von der Lage der in der modellierten Untereinheit bestimmten Schwefelbrücken in Domäne III, scheint so einer der beiden `Arme`, die ausgehend vom β -Barrel über Domäne II hinweg Domäne I fixieren, stabilisiert zu werden. Dies ist in Abbildung 4.12 auf der folgenden Seite verdeutlicht.

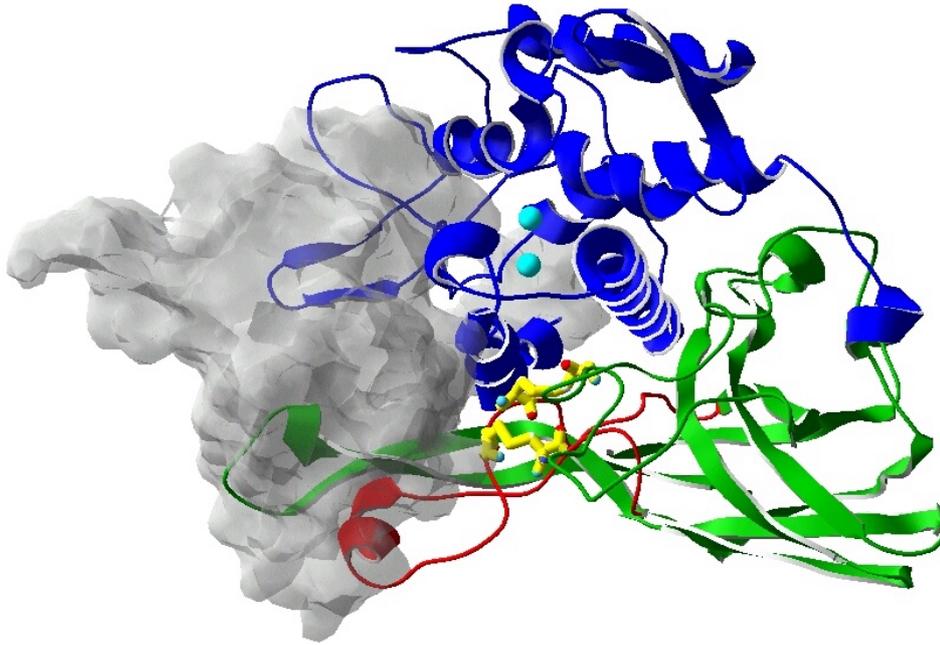


Abb. 4.12: Darstellung des `Arms`, der durch Schwefelbrücken stabilisiert wird und ausgehend vom β -Barrel über Domäne II hinweg Domäne I fixiert.

Domäne I ist grau und transparent, Domäne II blau und Domäne III grün dargestellt. Der `Arm` (Arg 500-Gly 543), der ausgehend vom β -Barrel der Domäne III über Domäne II hinweg Domäne I fixiert ist rot dargestellt. Die an den Schwefelbrücken beteiligten Cysteine (526, 569, 528, 576) sind gelb, die Kupfer atome des aktiven Zentrums cyan dargestellt.

Die Tatsache, daß die Schwefelbrücken in allen *Eurypelma*-Untereinheiten konserviert sind [Voit et al., 2000], spricht dafür, daß sie für die Stabilität der Untereinheiten von großer Bedeutung sind.

4.3.3 Fluoreszenzeigenschaften der Untereinheiten des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Die Fluoreszenzemission nativer Untereinheiten liegt, mit Ausnahme der von Untereinheit d, die durch die Tyrosinemission dominiert wird, bei etwa 335 nm. Somit zeigt auch ein Untereinheitengemisch ein Emissionsmaximum von 335 nm, was der Tryptophanfluoreszenz in hydrophober Umgebung, im Proteininneren entspricht [Lakovicz, 1986]. Die Fluoreszenz-Intensität ist gegenüber dem nativen 24-mer hierbei um etwa den Faktor 2 erhöht (Abb. 4.5).

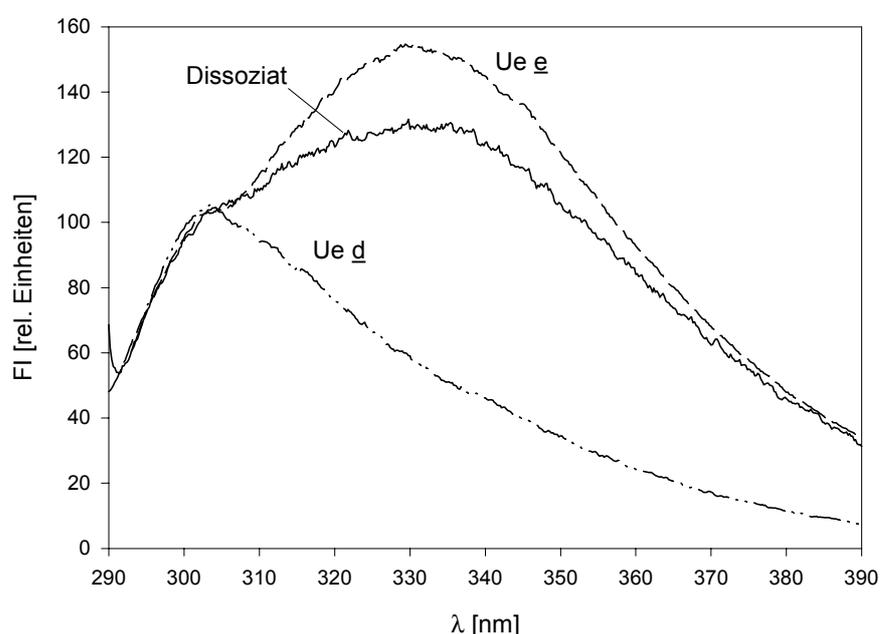


Abb 4.13: Fluoreszenzemissionsspektren eines Untereinheitengemischs und der isolierten Untereinheiten d und e.

Die Spektren wurden in 0.05 M GlyOH-Puffer bei pH 9.6 aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Emission wurde von 290 nm bis 390 nm bei 20°C aufgenommen. Die Konzentration des Hämocyanins betrug 0.05 mg/ml. Bei Untereinheit d ist die Tryptophanfluoreszenz weitgehend gelöscht, während bei einem Untereinheitengemisch und bei Untereinheit e das Emissionsmaximum bei 335 nm von Tryptophan dominiert wird.

Für die Analyse des Lösungsmechanismus der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Hämocyanin und für die Interpretation des Fluoreszenzverhaltens der Untereinheit e während der Denaturierung auf molekularer Ebene ist die Anzahl und die Verteilung der Tryptophane in den drei Domänen der verschiedenen Untereinheiten des *Eurypelma*-Hämocyanins von Bedeutung, die auf der folgenden Seite in Tabelle 4.5 und 4.6 gezeigt sind.

	Tryptophan (I-II-III)	Tyrosin (I-II-III)
24-mer	148	638
Untereinheiten		
a	5 (0 – 4 – 1)	28 (2 – 18 – 8)
b	7 (0 – 5 – 2)	27 (4 – 15 – 8)
c	7 (0 – 6 – 1)	24 (2 – 13 – 9)
d	6 (0 – 5 – 1)	29 (2 – 14 – 13)
e	6 (0 – 5 – 1)	28 (4 – 15 – 9)
f	5 (0 – 4 – 1)	25 (3 – 14 – 8)
g	8 (1 – 6 – 1)	24 (3 – 13 – 8)

Tab. 4.5: Anzahl der Tryptophane und Tyrosine in den Untereinheiten von *Eurypelma californicum*.

Die Werte in Klammern bezeichnen die Anzahl der Tryptophane und Tyrosine in den Domänen I, II und III.

	<i>L. polyphemus</i> Untereinheit II									
	30 His	174 Trp	176 Trp	184 Trp	272 Met	326 Trp	363 Trp	366 Phe	538 Trp	612 Phe
	D I	D II	D II	D II	D II	D II	D II	D II	D III	D III
<i>E. c.-Ue</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
a		175	177		273	327			539	
b		173	175	183		325	362		535	610
c		175	177	185	273	227	364		538	
d		171	173		269	323	363		532	
e		169	171	179	267	321			530	
f		172	174	182	271				535	
g	30	171	173	181	269	323	360		535	

Tab. 4.6: Tryptophane der einzelnen Untereinheiten (Ue) von *Eurypelma californicum* (*E.c.*) im Vergleich mit Untereinheit II von *Limulus polyphemus*.

Die Nummerierung basiert auf dem Alignment von Voit et al. [2000]. Tryptophane, die in allen Untereinheiten von *E. californicum* konserviert sind, sind hellgrau, Tryptophane, die nur in einer Untereinheit vorkommen, dunkelgrau eingefärbt.

Die Untereinheiten von *Eurypelma californicum* besitzen zwischen fünf und acht Tryptophane, die sich größtenteils in Domäne II befinden und gegenüber Untereinheit II des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* mit Ausnahme von Position 272 hochkonserviert sind (Tab. 4.5, 4.6). Domäne I besitzt bis auf Untereinheit g an Position 30 keine Tryptophane. Domäne III besitzt an Position 538 von *Limulus polyphemus* ein Tryptophan, das in sämtlichen Untereinheiten von *Eurypelma californicum* konserviert ist und an einer Schnittstelle zwischen Domäne II

und III liegt (Abb. 4.8). Der Abstand der Tryptophane in Domäne III zum nächstgelegenen Kupfer (CuA) liegt zwischen 11 Å und 13 Å und ist damit in etwa so groß wie die Abstände der Tryptophane in der zweiten Domäne. Untereinheit e besitzt insgesamt sechs Tryptophane, die sich mit Ausnahme von Trp 530 in der zweiten Domäne befinden (Tab. 4.5, 4.6; Abb. 4.10).

4.3.4 Löschung der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Hämocyanin durch Förster-Transfer

Die Bindung von Sauerstoff an das aktive Zentrum des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* resultiert in einer Absorption bei 340 nm und 560 nm und in einer Löschung der Tryptophanfluoreszenz [Richey et al., 1984; Loewe, 1978; Klarman et al., 1975]. Ein linearer Zusammenhang der Menge des gebundenen Sauerstoffs mit der Absorption und der Fluoreszenz-Löschung konnte für mehrere Hämocyanine gezeigt werden [Shaklai and Daniel, 1970; Loewe, 1978; Richey et al., 1984]. Es gilt deshalb zu klären, inwieweit die Löschung der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Hämocyanin auf Förstertransfer zurückzuführen ist. Dies ist auch für die Interpretation des Fluoreszenzverhaltens des 24-meren Hämocyanins und der Untereinheit e während der Denaturierung von Bedeutung.

Der Grund für die Löschung durch das oxygenierte aktive Zentrum wurde für Mollusken-Hämocyanin genauer untersucht und kontrovers diskutiert. Shaklai et al. [1970] vermuteten Förster-Transfer zwischen den Tryptophanen und dem aktiven Zentrum. Der Grund für diese Annahme ist die Tatsache, daß die Absorptionsspektren des aktiven Zentrums von Hämocyaninen mit einem Maximum bei 340 nm und die Fluoreszenzspektren mit einem Maximum bei 335 nm eine große Überlappung zeigen (Abb. 3.21). Aufgrund der fehlenden dreidimensionalen Strukturen konnte allerdings nur der Försteradius R_0 experimentell bestimmt werden. Es wurden Försterradien von 3.0 nm für das Hämocyanin der Schnecke *Levantina hierosolima* [Shaklai und Daniel, 1970] und von 2.4 nm für das Hämocyanin von *Octopus vulgaris* [Richelli, 1984] bestimmt, die eine Löschung durch Förstertransfer prinzipiell erlauben. Weitere Schlüsse konnten nicht gezogen werden. Diese experimentell ermittelten Abstände stimmen mit dem von uns für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* bestimmten Försterradius von 2.4 nm gut überein (Pkt. 3.5.4).

Die Kenntnis des Förster-Abstandes und der einzelnen Abstände zwischen Donor und Akzeptor macht es möglich, das theoretisch zu erwartende Maß der Löschung zu berechnen und mit dem gemessenen Wert zu vergleichen.

Die starke Löschung der Tryptophanfluoreszenz des oxygenierten Hämocyanins von *Eurypelma californicum* basiert auf der Verteilung der Tryptophan-Kupfer-Abstände (Tab. 3.12; Abb. 3.22). Bezogen auf die einzelnen aktiven Zentren liegen 96% der Tryptophane innerhalb des Förster-Abstandes (Abb. 3.22 A). Hierdurch kann die Entvölkerung des angeregten Zustandes wesentlich schneller durch Löschung (k_Q) als durch Fluoreszenz erfolgen (k_F) (Glg. 2.11.VI).

Die Werte der theoretisch und experimentell ermittelten Löschung für das oligomere Hämocyanin von *Eurypelma californicum* stimmen sehr gut überein (Tab. 3.13). Die Löschung der Tryptophanfluoreszenz im oxygenierten Zustand läßt sich somit vollständig durch Förstertransfer erklären. Der Löschprozeß beschränkt sich hierbei weitestgehend auf die einzelnen Untereinheiten (Abb. 3.23) und ist damit unabhängig von Konformationsänderungen auf der Quartärstrukturebene. Das Ausmaß der Löschung stellt somit ein O_2 -Beladungssignal der einzelnen Untereinheiten dar.

Für die Abstandsbestimmungen der Tryptophane wurde sowohl die oxygenierte als auch die deoxygenierte Struktur des Homohexamers der Untereinheit II des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* herangezogen [1oxy.pdb, Magnus et al., 1994; 1lla.pdb, Hazes et al., 1993].

In Abbildung 4.14 auf der gegenüberliegenden Seite ist ein Vergleich der Orientierung der Tryptophanseitenketten der oxygenierten (1oxy.pdb) und deoxygenierten Untereinheit II (1lla.pdb) von *Limulus polyphemus* gezeigt.

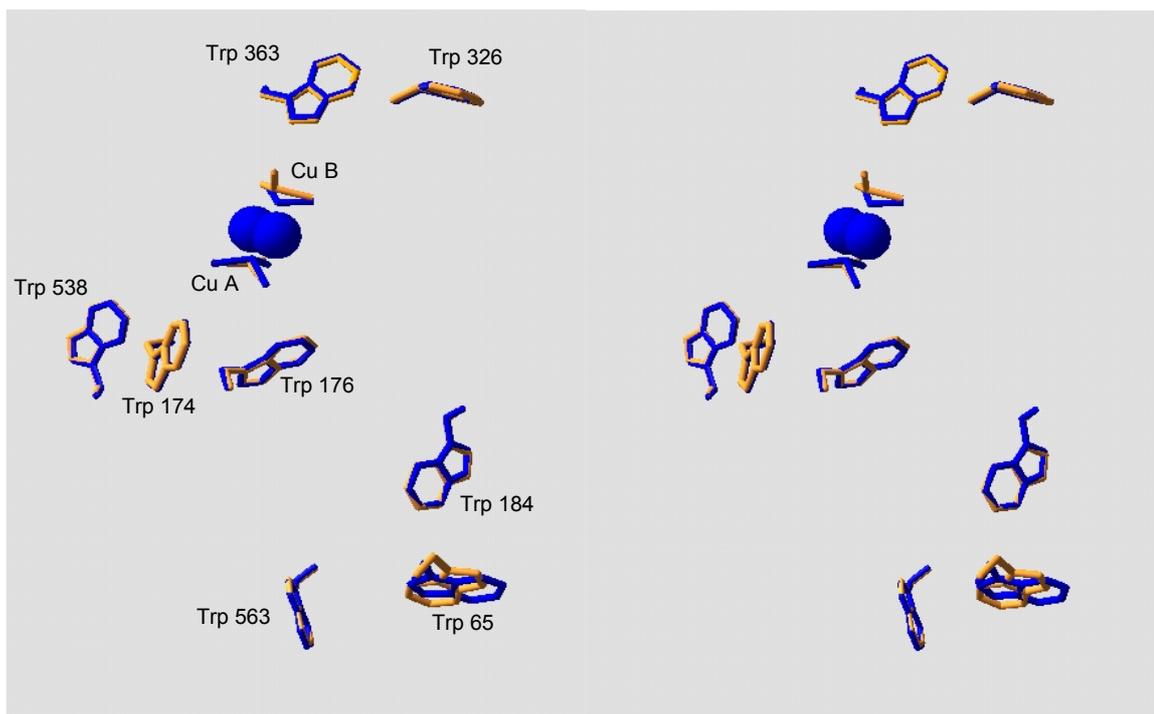


Abb. 4.14: Stereoabbildung der Position und Orientierung der Tryptophanseitenketten der oxygenierten und deoxygenierten Struktur der Untereinheit II des *L. polyphemus*-Hämocyanins [Magnus et al., 1994; Hazes et al., 1993].

Die Seitenketten der oxygenierten Struktur (1oxy.pdb) sind blau, die der deoxygenierten Struktur (1lla.pdb) orange dargestellt. Die beiden Sauerstoffatome sind als blaue Kugeln dargestellt.

Der Vergleich der oxygenierten und deoxygenierten Struktur zeigt nahezu keine Unterschiede in der Orientierung der Tryptophanseitenketten (Abb. 4.14). Diese Tatsache resultiert auch in einem geringeren Einfluß auf eine mögliche Änderung von κ^2 . Ein möglicher, großer Fehler im Orientierungsfaktor der Dipolmomente (κ^2) resultiert zwar in einem großen Fehler in R_0^6 , da der Försterabstand allerdings nur mit der sechsten Wurzel von κ^2 abhängt (Glng. 2.11.V), wird dieser drastisch reduziert. So wirken sich Unterschiede in κ^2 nur unwesentlich im Försterabstand R_0 aus (Formel 2.11.V). Die statistische Verteilung der Orientierung der Dipolmomente der Tryptophanseitenketten ist bei Raumtemperatur durch ihre Beweglichkeit im Protein gegeben (Lakovicz, 1983). Die errechneten Quantenausbeuten $[\Phi]$ zeigen somit lediglich geringe Unterschiede zwischen der oxy- (1oxy.pdb) und deoxy-Struktur (1lla.pdb; Tab. 3.13).

Die Abstandsverteilung der Tryptophane innerhalb der Untereinheiten zeigt ferner, daß sich nur wenige der Aminosäuren innerhalb der Übergangsregion der Transfer-effizienzkurve befinden und so durch mögliche Fehler bei der Abstandsbestimmung einen Einfluß auf den Fehler der berechneten Löschung haben können (Abb. 3.22A).

Somit ist der Einfluß der Konformation des Hämocyanins auf den Förstertransfer vernachlässigbar.

Bezogen auf das 24-mere Hämocyanin wurden zusätzlich die Abstände der Tryptophane zwischen den Untereinheiten b und c, die die Kontakte zwischen den 12-meren herstellen, berücksichtigt. Diese Abstände könnten allerdings fehlerbehaftet sein, da in dem hierzu verwendeten SAXS-Modell von Decker et al. [1996], das auf der EM-Rekonstruktion von de Haas et al. [1994] basiert, die Abstände der 12-mere zueinander von 11.9 nm auf 10.5 nm reduziert wurden um das EM-Modell an die SAXS Daten anzupassen. Hierdurch verändert sich der Abstand einiger Aminosäuren in der Kontaktregion der Untereinheiten b und c auf bis zu 1 Å (Pkt. 4.2.2), was angesichts der nicht-kovalenten Wechselwirkungen auf der Ebene der Untereinheiten nicht realistisch ist.

4.3.5 Fluoreszenzverhalten der Untereinheit e in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Bei der Denaturierung der Untereinheit e führen somit zwei Prozesse zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals: die zunehmende Exposition der Tryptophane zum polaren Lösungsmittel führt zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenzmaximums [Lakovicz, 1986] und die Zerstörung des Kupfer-Sauerstoffkomplexes zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, da die Löschung durch das aktive Zentrum nicht mehr möglich ist [Boteva et al., 1993; Pkt. 4.3.4].

Unabhängig von der Inkubationszeit (4 min, 1 h und 24 h) beginnt die Verschiebung des Emissionsmaximums schon bei 0.5 M GdnHCl und ist ab etwa 4 M GdnHCl abgeschlossen (Abb. 3.16). Dies zeigt, daß sich die Umgebung der Tryptophane schon bei geringen GdnHCl-Konzentrationen ändert, was auch die Messungen der Anisotropie bestätigen. Die Beweglichkeit der Tryptophanseitenketten wird ebenfalls nach kurzer Inkubationszeit schon bei geringen GdnHCl-Konzentrationen beeinflusst. Im Gegensatz dazu bleibt das aktive Zentrum innerhalb der ersten 4 Minuten bis zu einer Konzentration von 1.5 M GdnHCl stabil (Abb. 3.14). Die Messungen zeigen, daß hier ein kinetischer Prozeß vorliegt, da die Deoxygenierung nach 24 h bereits ab 0.5 M GdnHCl beeinflusst wird. Die Exposition der Tryptophane zum polaren Medium hat zunächst einen geringen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität (Abb. 3.17). Bei einsetzender Deoxygenierung durch den Einfluß von GdnHCl findet eine deutliche

Zunahme der Fluoreszenzintensität statt. Mit fortschreitender Denaturierung und starker Exposition der Tryptophane nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab. (Abb. 3.15, 3.16).

Boteva et al. [1993] verzeichneten nach Deoxygenierung der Untereinheit e einen Anstieg der Tryptophanfluoreszenz um den Faktor 3 und bei der Apo-Untereinheit um den Faktor 11. Bei meinen Untersuchungen steigt die Tryptophanfluoreszenz in Folge der Auffaltung von Untereinheit e nach 1 h und nach 24 h zunächst auch um den Faktor 3, nimmt bei höheren GdnHCl-Konzentrationen allerdings wieder ab und erreicht dann einen Plateau-Wert. Dies entspricht früheren Beobachtungen von Schraml [1991]. Auch hier findet bei der Denaturierung der Untereinheit d nach 24 h und bei der des Heterodimers bc nach 1 h und nach 24 h nach Erreichen eines Maximums eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität statt [Schraml, 1991]. Ein Verlauf der Fluoreszenzintensität wie bei den Denaturierungsexperimenten mit Untereinheit e von Penz [1990] konnte allerdings nicht festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde der Verlauf der Fluoreszenz anhand der Intensität bei 320 nm dargestellt. Nach 4 Minuten nimmt hier die Fluoreszenzintensität bis zu einer Konzentration von 5 M GdnHCl ab, während meine Experimente bei 320 nm ab 2.5 M GdnHCl eine leichte Zunahme zeigen. Auch der Verlauf der Intensitäten nach 24 Stunden unterscheidet sich. Der von Penz verzeichneten Abnahme der Intensität bis etwa 1 M GdnHCl folgt ein Anstieg bis 2 M GdnHCl. Ab 2 M GdnHCl findet wiederum ein Abnahme der Intensität statt. Lediglich die starke Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 320 nm von 2 M bis 4 M ist konsistent mit meinen Daten. Gründe für diese Unterschiede bleiben unklar. Trotz einer Überprüfung meiner Ergebnisse mit verschiedenen Chargen gereinigter Untereinheit e konnte ich die Ergebnisse von Penz [1990] nicht reproduzieren.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Erreichen des Maximums könnte unter anderem mit der Sensitivität von Tryptophan gegenüber einer Reihe von Quenchern zusammenhängen. Diese Sensitivität scheint mit der Neigung des Indolrings zusammenzuhängen, während des angeregten Zustandes Elektronen abzugeben [Creighton, 1997]. Eine mögliche Löschung kann somit durch Elektronenfänger in Form anderer Aminosäuren wie z. B. wie Histidin und Cystein verursacht werden. Auch durch Methionin kann die Tryptophanfluoreszenz gelöscht werden [Creighton, 1997]. Die Konzentrationen dieser Aminosäuren liegen in Untereinheit e zwischen 6 μ M und 20 μ M. Inwieweit sie im denaturierten Molekül zu einer Löschung

beitragen, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Penz [1990] macht für die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz durch die Denaturierung neben anderen Aminosäuren zusätzlich freierwerdendes Kupfer verantwortlich. Sowohl Kupfer-I- als auch Kupfer-II-Ionen sind in der Lage, die Fluoreszenz von Tryptophan zu löschen. Dies wurde für Tryptophane und andere Indolderivate in Lösung gezeigt [Steiner et al., 1969]. Die Reichweite des Löschprozesses kann über Distanzen von über 14 Å reichen [Strambini et al., 1991]. Geht man davon aus, daß bei hohen GdnHCl-Konzentrationen beide Kupferatome aus dem aktiven Zentrum in Lösung gehen [Penz, 1990], befinden sie sich dort in einer Konzentration von 1.4 µM. Aufgrund dieser äußerst geringen Konzentration ist es allerdings unwahrscheinlich, daß die gelösten Kupferionen die Tryptophanfluoreszenz in großem Ausmaß löschen.

Der Effekt des Denaturierungsmittels auf die Fluoreszenzintensität ist nach Creighton [1997] vernachlässigbar. Messungen einer Tryptophan-Lösung in GdnHCl nach Anregung mit 278 nm resultieren lediglich in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei λ_{max} um etwa 3%.

Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren der Untereinheit e mit einem Gemisch der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin im gleichen molaren Verhältnis wie im Hämocyanin zeigt, daß sich die Umgebung der freigelösten Aminosäuren gegenüber der im denaturierten Protein unterscheidet. Die Emissionsmaxima der Tryptophan-Tyrosinmischung sind mit 352 nm gegenüber 348 nm (λ_{ex} 280 nm) und mit 356 nm gegenüber 353 nm (λ_{ex} 295) in den langwelligen Bereich verschoben. Die Unterschiede der Emissionsmaxima nach Anregung mit 280 nm gegenüber der nach Anregung mit 295 nm liegen am Beitrag der Tyrosinfluoreszenz, der das Maximum leicht in den kürzerwelligen Bereich verschiebt. Somit liegen selbst bei der höchsten GdnHCl-Konzentration nicht so polare Bedingungen vor wie bei den frei gelösten Aminosäuren. Wahrscheinlich ist, daß im denaturierten Zustand in GdnHCl sowohl Reststrukturen auf Sekundärstrukturebene, als auch Bereiche mit hydrophober Umgebung zurückbleiben. Der denaturierte Zustand von Proteinen wird zwar häufig als komplett entfaltetes Zufallsknäuel angesehen, der keine definierte sondern eine fluktuierende Struktur besitzt [Creighton, 1992], NMR-Daten weisen allerdings daraufhin, daß selbst unter extrem denaturierenden Bedingungen Reststrukturen erhalten bleiben können [Baldwin, 1996; Neri et al., 1992; Damaschun et al., 1993; 1998; Wilson et al., 1996]. Hierfür sprechen auch meine CD-Daten, die nach

24-stündiger Denaturierung von Untereinheit \underline{e} kein vollständiges Zufallsknäuel zeigen (Abb. 3.24). Dennoch bleibt die Charakterisierung des Denaturierungsendzustandes schwierig. Denaturierungsexperimente von Damaschun et al. [1998] mit Phosphoglycerat-Kinase (PGK), einem Protein mit etwa 400 Aminosäuren, zeigen, daß mit 2 M GdnHCl der Stokes-Radius des Proteins auf etwa das Doppelte zunimmt. Auch SANS-Experimente weisen darauf hin, daß die PGK in eine zufallsknäuelartige Struktur denaturiert, die mit einer deutlichen Vergrößerung des Gyrationradius einhergeht. Der R_G nimmt hierbei um ein Mehrfaches zu. Dies ist konsistent mit der Vorstellung, daß die große Ausdehnung des Proteins durch die Denaturierung hauptsächlich durch die weitreichende Flexibilität der Proteinkette zustande kommt [Petrescu et al., 1998]. Dabei hängt der Denaturierungsendzustand stets vom Protein und den gewählten Bedingungen ab [Tanford, 1968; Kuwajima, 1989; Miranker and Dobson, 1996].

4.3.6 Stabilität des aktiven Zentrums der Untereinheit \underline{e} in Abhängigkeit der GdnHCl-Konzentration

Während nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten bis 1.5 M GdnHCl noch keine signifikante Deoxygenierung zu verzeichnen ist, steigt die Tryptophanfluoreszenzintensität zunächst leicht an (Abb. 3.14; 3.16 λ_{ex} , 295 nm). Dies könnte mit der beginnenden Exposition von Tryptophanen in Zusammenhang gebracht werden [Creighton, 1997]. Um den Einfluß von GdnHCl auf das aktive Zentrum besser charakterisieren und mit der Tryptophanfluoreszenz korrelieren zu können, ist in Abbildung 4.15 auf der folgenden Seite die OD_{340} gegen die Tryptophanfluoreszenzintensität bei λ_{max} aufgetragen.

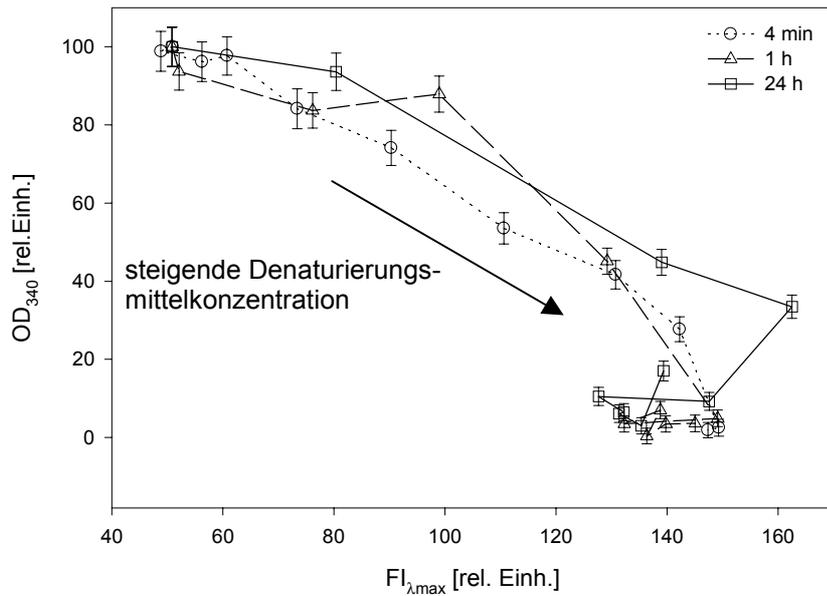


Abb. 4.15: OD₃₄₀ in Abhängigkeit der FI_{λmax} nach Anregung mit 295 nm unter dem Einfluß von GdnHCl.

Die Inkubationszeit betrug 4 min, 1 h und 24 h. Die Konzentration des Denaturierungsmittels ist nicht indiziert. Der Pfeil zeigt die steigende Denaturierungsmittelkonzentration an.

In einem Bereich zwischen etwa 90% und 30% O₂-Beladung findet die Abnahme der OD₃₄₀, unabhängig von der Inkubationszeit, nur annähernd linear mit der Zunahme der Fluoreszenzintensität statt (Abb. 4.15). Der Verlauf der Fluoreszenzintensität kann somit nicht ausschließlich auf die Deoxygenierung durch die Einwirkung von GdnHCl zurückgeführt werden. Durch die fortschreitende Auffaltung führt die zunehmende Entfernung eines Teils der Tryptophane vom aktiven Zentrum, die dann ihre Anregungsenergie nicht mehr durch Förstertransfer übertragen können (Pkt. 3.5.4), bereits zu einem Abweichen der Kurve von linearen Verlauf. Während z.B. nach 1 h Untereinheit e bei einer Konzentration von 2 M GdnHCl noch zu etwa 45% oxygeniert und bei 2.5 M bereits vollständig deoxygeniert ist (Abb. 3.14), findet in diesem Konzentrationsbereich nur noch eine Zunahme der Tryptophanfluoreszenzintensität von etwa 14% statt. Auch nach 24 h nimmt die Tryptophanfluoreszenz ab 1.5 M GdnHCl bereits wieder ab, obwohl die Deoxygenierung noch nicht abgeschlossen ist (Abb. 3.14, 3.16 λ_{ex} 295 nm). Mit fortschreitender Denaturierung ab einer O₂-Beladung von etwa 30% ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität besonders ausgeprägt (Abb. 3.33).

Bei Penz [1990] wird die anfängliche Zunahme der Fluoreszenzintensität unter dem Einfluß von GdnHCl dem Verlust von Kupfer A zugeordnet. Die unterschiedliche Stabilität der zwei Kupferatome A und B gegenüber CN⁻ wurde schon von Beltramini

et al. [1984] für die Hämocyanine von *Octopus vulgaris* und *Carcinus maenas* gezeigt. Die Kupferanalyse der Untereinheit \underline{e} von Penz [1990] bei 0.5 M GdnHCl nach 24 h weist einen Verlust von etwas mehr als 50% auf; ab 3.0 M GdnHCl ist kein Kupfer mehr gebunden. Meine Messungen zeigen dagegen, daß die OD_{340} -Werte nach 24 h bei 1 M GdnHCl um 45% abnehmen. Erst bei 2 M GdnHCl ist die vollständige Deoxygenierung erreicht. Ausgehend von dem Verlust von zunächst nur einem Kupferatom müssten auf der Basis der Daten der Kupferanalyse von Penz [1990] bereits bei 0.5 M GdnHCl sämtliche Untereinheiten deoxygeniert sein. Die Messungen der OD_{340} meiner Arbeit sprechen somit gegen diese Interpretation (Abb. 3.14). Eine Überprüfung meiner Ergebnisse mit verschiedenen Chargen gereinigter Untereinheit \underline{e} führte zu demselben Ergebnis. Die Unterschiede zu den Ergebnissen von Penz [1990] bleiben ungeklärt.

4.3.7 Energieübertragung von Tyrosin auf Tryptophan durch Förster-Transfer

Die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten bei höheren GdnHCl-Konzentrationen ist von der Anregungswellenlänge abhängig (Abb. 3.16). Während nach 24 h bei Anregung mit 280 nm bei 5 M GdnHCl die $FI_{\lambda_{max}}$ um 35% abnimmt, nimmt sie nach selektiver Anregung der Tryptophane mit 295 nm um lediglich 19% ab. Ferner steigt nach Anregung mit 280 nm die Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm an (Abb. 4.16). Die Differenz von 16% in der Abnahme der Tryptophanfluoreszenz und das Erscheinen des Tyrosinpeaks bei hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen könnte ein Hinweis auf eine mögliche Energieübertragung der Tyrosine auf die Tryptophane im nativen Molekül sein. Mit zunehmender Denaturierung des Proteins nehmen die Abstände der Fluorophore zueinander zu und ein Energietransfer ist dann nicht mehr möglich. Dies konnte für eine Reihe von nativen Proteinen gezeigt werden, bei denen die Transfereffizienz der Anregungsenergie von Tyrosin auf Tryptophan im nativen Zustand von 17-69% variierte und durch Denaturierung abnahm [Saito et al., 1981]. Auch T-Rnase T1, ein Protein mit 104 Aminosäuren und lediglich einem Tryptophan zeigt nach Denaturierung mit 6 M GdnHCl eine starke Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität und bei Anregung mit 280 nm das Ansteigen der Tyrosinfluoreszenz [Creighton, 1997].

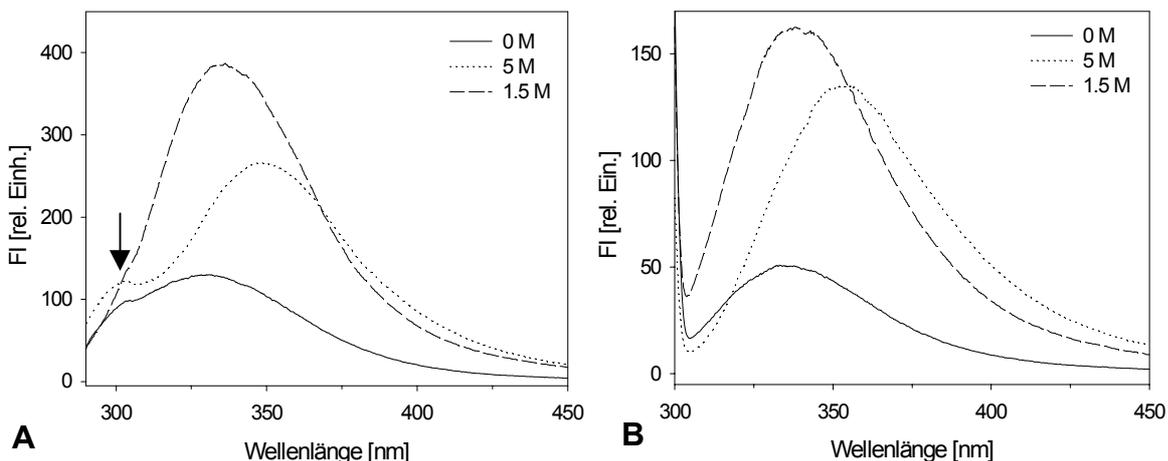


Abb. 4.16: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Untereinheit e nach Anregung mit 280 nm (A) und 295 nm (B) nach Inkubation in 1.5 M und 5 M GdnHCl.

Die Inkubationszeit betrug 24 h. Der Pfeil markiert den Anstieg der Tyrosinfluoreszenz bei 5 M GdnHCl nach Anregung mit 280 nm (A).

Die dreidimensionale, auf Untereinheit II von *Limulus polyphemus* modellierte Struktur der Untereinheit \underline{e} macht es möglich, die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers von Tyrosin auf Tryptophan durch Förstertransfer zu überprüfen. Der Försterabstand (R_0) für einen Energietransfer der Anregungsenergie von Tyrosin auf Tryptophan wird mit 14 Å [Lakowicz, 1986] bzw. 13-15 Å angegeben [van der Meer et al., 1994].

Für eine Abschätzung der Möglichkeit einer Energieübertragung im nativen Protein wurden die Abstände der Tyrosine zu den einzelnen Tryptophanen in der modellierten Untereinheit \underline{e} ermittelt (Tab. 4.7). Hierbei wurden die Abstände der C_ξ -Atome der Tyrosin- zu den $C_{\delta 2}$ -Atomen der Tryptophanseitenkette gemessen. Für den Orientierungsfaktor der Dipolmomente (κ^2) wurde in dieser Betrachtung ein statistischer Mittelwert von 2/3 angenommen [Lakowicz, 1986].

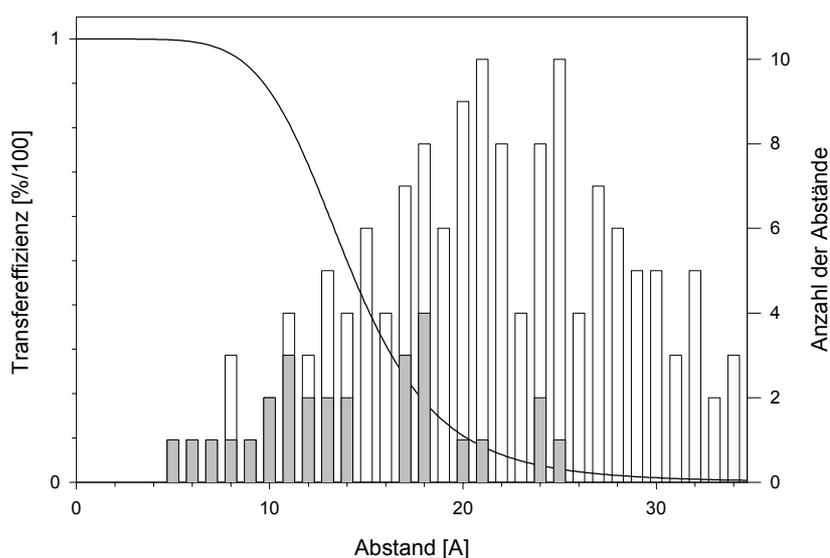


Abb. 4.17: Verteilung der Abstände der Tyrosine zum nächstgelegenen Tryptophan (dunkelgrau) und zu allen Tryptophanen (weiß) in Untereinheit \underline{e} von *E. californicum*.

Die einzelnen Abstände der C_ξ -Atome der Tyrosin- zu den $C_{\delta 2}$ -Atomen der Tryptophanseitenkette wurden in der Struktur der modellierten Untereinheit \underline{e} mit dem Programm RASMOL (Vers. 2.7.1) bestimmt. Der Försterradius (R_0) wurde mit 14 Å angenommen [Lakowicz, 1986]. Die Abstände in dieser Darstellung wurden auf jeweils auf den vollen Zahlenwert gerundet.

Insgesamt wurden in Untereinheit \underline{e} 168 Abstände gemessen. Bei einem Försterabstand (R_0) von 14 Å [Lakowicz, 1986], liegen 16 (57%) der 28 Tyrosine in einem Abstand ≤ 14 Å zum nächstgelegenen Tryptophan (Tab. 4.7), der eine Transfereffizienz von 50% und mehr ermöglicht (Abb. 4.17).

Tabelle 4.7 auf der folgenden Seite zeigt die Verteilung sämtlicher Tyrosin-Tryptophanabstände in Untereinheit \underline{e} .

	Trp 169	171	179	267	321	530
D I						
Tyr 59	13.0	15.9	8.7	25.2	20.6	25.1
63	18.8	19.9	9.6	30.1	26.7	28.9
89	6.5	13.0	12.3	21.4	16.7	20.7
153	25.1*	27.6*	38.5	35.8	31.3	21.1
157	21.9*	22.4*	22.4	35.6	32.0	13.6
D II						
175	13.3*	4.8*	8.0*	22.4	20.5	14.8
196	21.3	11.3	18.9	18.6	20.2	15.4
197	20.6	10.0	19.1	24.3	24.7	11.4
206	20.1	16.8	28.6	26.2	24.0	11.4
231	18.8	22.2	31.5	26.7	31.4	19.9
244	13.0	20.8	27.1	26.3	16.1	22.0
279	36.4	28.0	27.3	17.6*	24.9	35.0
280	30.2	22.1	20.7	14.0*	20.1	30.3
314	30.9	25.7	24.2	7.8	15.2*	34.4
315	27.0	20.9	20.4	10.7	13.7*	29.1
356	18.0	14.6	26.7	23.0	20.3	12.6
358	18.3	15.4	23.4	14.0	11.8	18.6
369	29.4	19.6	23.7	18.0	22.9	24.3
376	35.5	24.7	30.4	31.6	35.3	24.9
D III						
414	16.8	25.7	28.9	42.1	35.4	25.1
428	18.1	23.2	32.5	39.2	33.6	16.7
438	32.0	25.2	34.3	43.6	42.9	17.5
462	37.9	31.8	43.3	40.1	40.7	24.1
525	17.4	17.2	15.8	37.6	34.6	19.8*
555	33.3	23.9	27.0	40.2	41.2	23.9
575	16.7	8.1	18.8	27.8	26.3	5.9
583	21.9	11.7	15.1	28.1	28.4	16.1
619	29.6	28.5	40.4	42.7	39.8	18.2

Tab. 4.7: Abstände zwischen den Tyrosin- und Tryptophanseitenketten der Untereinheit e von *E. californicum*.

Grau unterlegt ist der jeweils kürzeste Abstände eines Tyrosins zu einem Tryptophan. *: Abstände zwischen Tyrosin und Tryptophan, die sich auf dem gleichen Sekundärstrukturelement befinden. Untereinheit e wurde auf die Struktur der Untereinheit II des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* modelliert. Die Domänengrenzen sind mit D I-III bezeichnet.

Die Abstände zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, daß ein großer Teil der Tyrosine seine Anregungsenergie im nativen Molekül auf Tryptophane überträgt. Es wird deutlich, daß vor allem die Tyrosine der Domäne I und II prinzipiell dazu in der Lage sind, 50% und mehr ihrer Anregungsenergie auf Tryptophane zu übertragen. In Domäne III hingegen liegen lediglich die Tyrosine 575 und 583 in einer Entfernung bis zu 14 Å zum nächstgelegenen Tryptophan (Tab. 4.7).

Von den Tyrosinen, die einen Abstand von 14 Å und weniger zu einem Tryptophan aufweisen, liegen lediglich zwei Tyrosine (175, 280) auf dem gleichen Sekundärstrukturelement wie das entsprechende Tryptophan. Die Möglichkeit, ihre Anregungsenergie zu übertragen, können diese Tyrosine bei der Denaturierung erst dann verlieren, wenn die Sekundärstrukturelemente denaturiert werden (Pkt. 3.5.5). Die angestiegene Tyrosinfluoreszenz und ein Teil der Abnahme der Tryptophanfluoreszenz der Untereinheit e bei hohen GdnHCl-Konzentrationen wird somit vorwiegend durch die Auffaltung der Domänen I und II verursacht.

4.3.8 Verlauf der Denaturierung im Vergleich der verschiedenen spektroskopischen Methoden

Auch auf der Ebene von Untereinheit e soll der Vergleich der verschiedenen spektroskopischen Methoden, die jeweils unterschiedliche strukturelle Ebenen erfassen, den Verlauf der Denaturierung verdeutlichen. Dazu wurden die Übergangsbereiche der Signale der spektroskopischen Methoden vergleichend aufgetragen.

Abb 4.18 (folgende Seite): Zeitliche Abhängigkeit der Übergangsregionen verschiedener spektroskopischer Signale bei der Denaturierung von Untereinheit e.

Die Übergangsregionen der Signale der verschiedenen Methoden, die jeweils unterschiedliche Monitore für die Denaturierung darstellen sind hier, ausgehend von einem 5-95%-igem Signal-Level, in einem horizontalen Balkendiagramm für verschiedene Inkubationszeiten dargestellt. λ_{\max} (Ex 295 nm) und die Anisotropie erfassen die Tertiärstruktur. Die OD 340 und die FI λ_{\max} (Ex 295 nm) erfassen das aktive Zentrum in Domäne II bzw. die Fluoreszenz der Tryptophane, die im oxygenierten Zustand gelöscht werden. Die CD-Daten repräsentieren die Sekundärstruktur. Die Anisotropie wurde nach 24 h nicht mehr gemessen, da sich bereits nach 4-minütiger Inkubationszeit in GdnHCl keine Änderung mehr ergab.

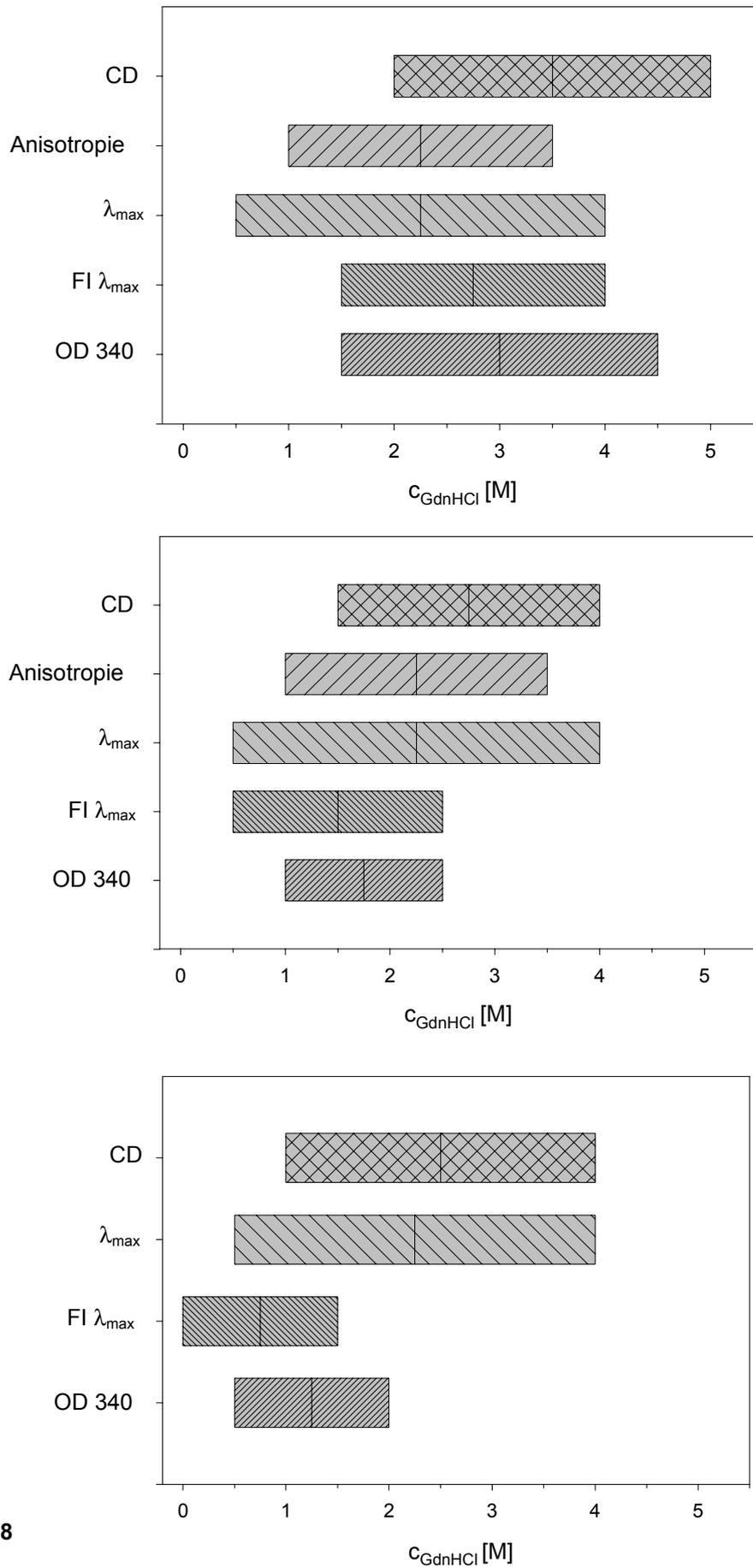


Abb. 4.18

Die Abbildung zeigt, daß die Denaturierung bei geringen GdnHCl-Konzentrationen zunächst durch die Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge der Tryptophanfluoreszenz und durch die Abnahme der Anisotropie geprägt ist. Beide Signale ändern sich nach einer Stunde nicht mehr. Das bedeutet, daß die Tryptophane schon nach kurzer Zeit bei relativ geringen Konzentrationen durch die Auflockerung der Tertiärstruktur dem Lösungsmittel exponiert werden und die Denaturierung in den äußeren Molekülbereichen der Untereinheit beginnt. Dies bestätigen auch die Messungen der Fluoreszenzanisotropie, die die zunehmende Beweglichkeit der Tryptophane anzeigen.

Erste Änderungen in der Tertiärstruktur beginnen nach 4 min bereits bei 0.5 M bis 1 M GdnHCl. Die Denaturierung des aktiven Zentrums beginnt dagegen erst bei 1.5 M GdnHCl. Die Deoxygenierung und der damit verbundene Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgt somit bei höheren GdnHCl-Konzentrationen (Abb. 3.17). Dies ist ein Indiz für die beginnende Auffaltung der Tertiärstruktur vor der Entfaltung des Inneren der Domäne II mit dem aktiven Zentrum.

Die Denaturierung des Kernbereiches der zweiten Domäne mit dem aktiven Zentrum ist auch nach einer Stunde noch nicht abgeschlossen. Die Übergänge der Signale verschieben sich nach 24 h noch zu kleineren Denaturierungsmittelkonzentrationen. Die CD-spektroskopischen Ergebnisse erfassen vorwiegend die Entfaltung der α -helikalen Anteile, die sich in den Domänen I und II befinden. Die Denaturierung erster Sekundärstrukturelemente beginnt nach 4 Minuten bei 2 M GdnHCl und verschiebt sich nach 24 Stunden bis 1 M GdnHCl. Sie beginnt somit bei etwas höheren GdnHCl-Konzentrationen als die Deoxygenierung und Denaturierung des aktiven Zentrums.

4.3.9 Beurteilung des Verlaufs der Denaturierung anhand der 3D-Struktur

Die modellierte Struktur der Untereinheit e sollte dazu dienen, die spektroskopischen Ergebnisse der Denaturierung anhand der räumlichen 3D-Struktur zu verifizieren und zu interpretieren (Abb. 4.19).

Eine Vorstellung der Wirkungsweise von GdnHCl geht davon aus, daß die Denaturierungsmittelmoleküle in das Protein wandern, mit den Atomen des Proteinrückgrates H-Brücken bilden, und es so entfalten [Dunbar et al., 1997]. Die spektroskopischen Ergebnisse der Denaturierung von Untereinheit e (Abb. 4.18),

sprechen zunächst für eine Beeinflussung der äußeren Bereiche des Proteins durch das Denaturierungsmittel. Das Molekülinnere mit dem Kernbereich der zweiten Domäne und dem aktiven Zentrum wird erst bei höheren GdnHCl-Konzentrationen entfaltet.

Die Betrachtung der dreidimensionalen Struktur zeigt, daß Domäne II von zwei Seiten durch die Domänen I und III vom Denaturierungsmittel abgeschirmt ist (Abb. 4.19) und mit dem `Four- α -Helix-Bundle` ein stabiles Supersekundärstrukturmotiv besitzt, das zu einer erhöhten Stabilität führen könnte. Domäne III besitzt möglicherweise durch β -Barrel-Faltungsmotiv und die zwei Disulfidbrücken eine erhöhte Stabilität (Pkt. 4.3.2). Die Ergebnisse der Verschiebung von λ_{\max} und der Anisotropie zeigen allerdings, daß sich die Umgebung der Tryptophane, die sich mit Ausnahme von Trp 530 in Domäne II befinden, nach 4 Minuten bereits bei kleinen GdnHCl-Konzentrationen ändert. Für diese Änderung kommen zunächst die Tryptophane 179, 267 und 321 in Frage, da sie sich nahe der Moleküloberfläche befinden. Trp 179 ist Bestandteil der α -Helix 2.1 und wird durch die Aminosäuren 180-188 nach außen abgeschirmt. Trp 267 liegt auf α -Helix 2.3 und zeigt von da aus ins Molekülinnere. Trp 321 liegt auf α -Helix 2.5 wird durch die Aminosäuren Asp 258 und Ile 259 der α -Helix 2.3 zum Außenmedium abgeschirmt. Die jeweils kürzesten Entfernungen dieser Aminosäuren zur Oberfläche sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tryptophan AS-Nr.	kürzester Abstand zur Moleküloberfläche [Å]
179	6.7 (Pro 181, Arg 188)
267	5.7 (Arg 270)
321	6.4 (Asp 258, Ile 259)

Tab. 4.8: Tryptophane mit den kürzesten Entfernungen zur Moleküloberfläche von Untereinheit e.

Die Abstände wurden mit dem Programm RasMol (Vers. 2.7.1) bestimmt. Die Aminosäuren an der Moleküloberfläche, zu deren Seitenketten der Abstand des C δ -Atoms der Tryptophanseitenketten bestimmt wurde, stehen in Klammern.

Die Tryptophane liegen ferner in einem Bereich, der nicht durch die Domänen I und III abgeschirmt ist. Es ist somit wahrscheinlich, daß diese zuerst durch die Auffaltung der Tertiärstruktur beeinflusst werden. Die übrigen Tryptophane 169, 171, 530 liegen

mit Abständen zwischen 13 Å und 20 Å zur Oberfläche weiter im Inneren der Domäne II. Die Kupfermoleküle des aktiven Zentrums liegen zentral in Domäne II (Abb.4.19). Der kürzeste Abstand zur Oberfläche beträgt zwischen 17 Å und 19 Å. Abbildung 4.19 zeigt die Lage der Tryptophane in der modellierten Struktur der Untereinheit e.

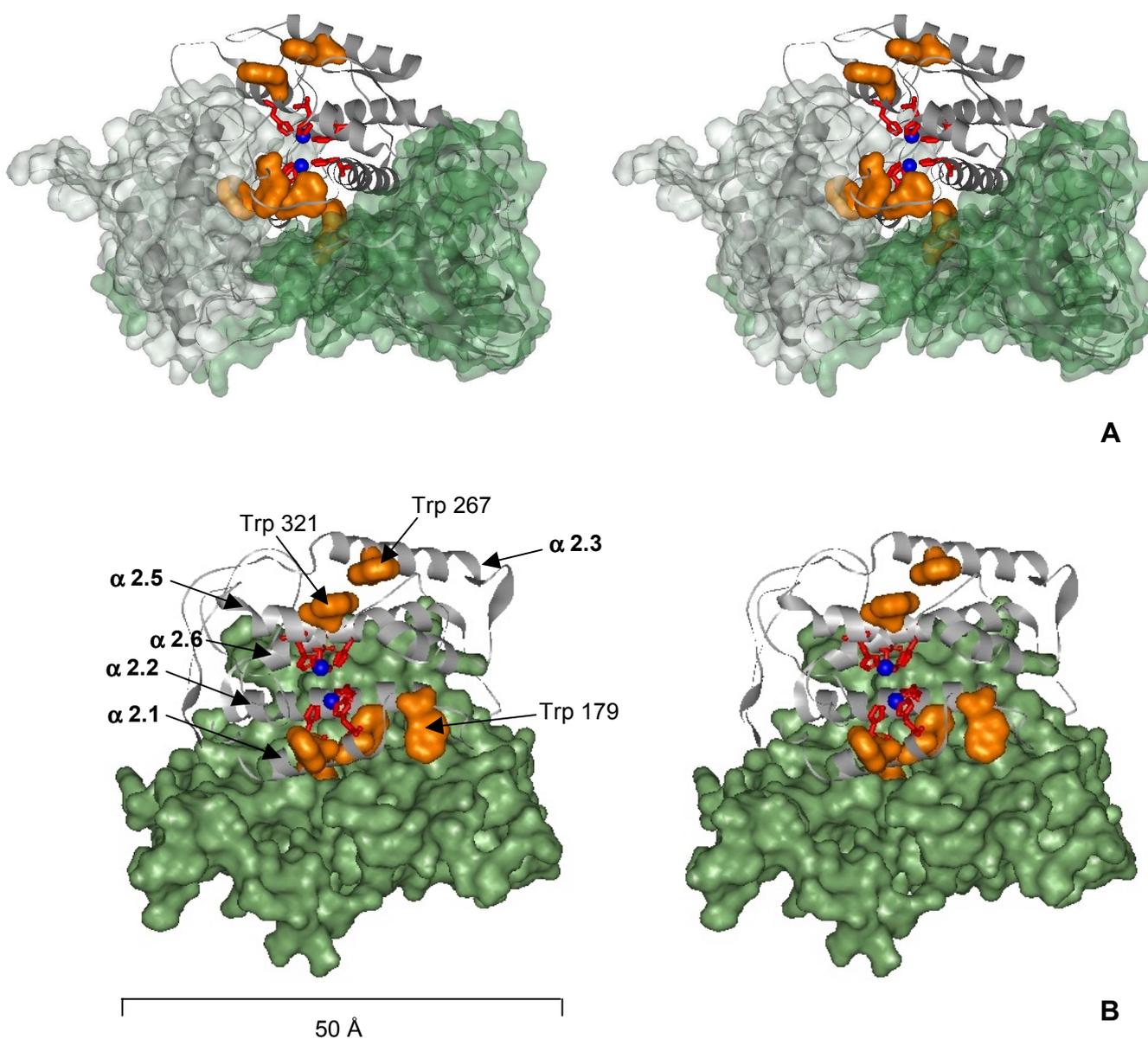


Abb. 4.19: Stereoabbildung der Lage der Tryptophane in der modellierten Untereinheit e.

A: Domäne I (grau) und Domäne III (grün) sind mit einer Oberfläche belegt (H_2O , Radius 1.4 Å). Von Domäne II sind die Sekundärstrukturelemente in Ribbon-Darstellung gezeigt. Die Tryptophane sind mit van der Waals Radien (orange) dargestellt. Die Histidine 168, 172, 199, 319, 323 und 359 (gelb), die die Kupfer-Atome (blau) koordinativ binden, sind als Stäbchen dargestellt. **B:** Abb. A um 90° gegen den Uhrzeigersinn um die y-Achse gedreht. Domäne I ist hier zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Die Tryptophane 169, 171, 179 und 321 sind Teil der α -Helices, die Histidine tragen, die für die Koordination der Kupferatome verantwortlich sind. Tryptophan 267 liegt auf α -Helix 2.3 und Tryptophan 530 in Domäne III an einer Schnittstelle zu Domäne II. Mit Ausnahme von Trp 171 und 530 zeigen die Indolseitenketten nach außen, weg vom aktiven Zentrum. Dies könnte die Tatsache erklären, daß die Tryptophane bereits nach kurzer Zeit bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen, ohne daß zunächst die sie tragenden α -Helices in ihrer räumlichen Anordnung verändert werden.

Die Betrachtung der dreidimensionalen Struktur von Untereinheit e kann somit die spektroskopischen Ergebnisse, die zunächst eine Beeinflussung der äußeren Regionen des Proteins durch das Denaturierungsmittel zeigen, bevor das relativ stabile aktive Zentrum mit dem 'Four- α -Helix-Bundle' und dem Cu-O₂-Cu-Komplex denaturiert wird, bestätigen. Tatsächlich ist auch für andere 'Four- α -Helix-bundle'-Proteine eine ausgeprägte Stabilität nachgewiesen worden [Steif et al., 1993]. Damit konnte auch die frühere Annahme der Stabilisierung der Untereinheiten von *E. californicum* durch den Cu-O₂-Cu-Komplex bestätigt werden [Penz, 1990].

Die Denaturierung der Sekundärstruktur erfolgt bei höheren Denaturierungsmittel-Konzentrationen und die Daten der CD-Spektroskopie weisen noch auf geringe Anteile von Reststrukturen hin. Eine genaue Zuordnung der Stabilität der Sekundärstrukturelemente der einzelnen Domänen auf Basis der unterschiedlichen Faltungsmotive ist allerdings aufgrund der spektroskopischen Ergebnisse nicht möglich. Da bei 222 nm maßgeblich α -Helices detektiert werden, die das vorwiegende Faltungsmotiv der Domänen I und II darstellen, ist dies ein Indiz dafür, daß zunächst die Sekundärstrukturelemente dieser beiden Domänen entfaltet werden. Die strukturellen Gegebenheiten sprechen zunächst für die Entfaltung der Domäne I. Sie besitzt im Gegensatz zu Domäne II mit dem 'Four- α -Helix-bundle' keine übergeordnete, besonders stabile Supersekundärstruktur und auch keine Schwefelbrücken wie Domäne III. Sie ist ferner kaum durch die anderen Domänen vom Lösungsmittel abgeschirmt.

4.4 Thermische Stabilität des oligomeren Hämocyanins und der Untereinheiten von *Eurypelma californicum*

4.4.1 Denaturierung mittels `Differential-Scanning`-Kalorimetrie

Das 24-meres Hämocyanin von *Eurypelma californicum* weist eine extrem hohe Thermostabilität auf, die auf seine oligomere Struktur zurückzuführen ist [Sternier et al., 1995]. Die Denaturierungstemperaturen hängen hierbei von den Pufferbedingungen und der Anwesenheit divalenter Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} ab. Die höchste Stabilität bis 93.7°C weist das oligomere Hämocyanin in Tris-HCl-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} auf. Ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} liegt der T_m -Wert um etwa 6°C darunter (Tab. 3.14). Die stabilisierende Rolle von Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen konnte mit Lichtstreuexperimenten von Sternier et al. [1995] gezeigt werden. Bei den Experimenten mit 24-merem Hämocyanin in Tris-Puffer könnte Tris, das als allosterischer Effektor wirkt [Sternier et al., 1994], einen Einfluß auf die Stabilität haben. Danach beeinflusst Tris die Wechselwirkung zwischen den 12-meren und könnte durch die Bindung an das Oligomer die Dissoziation verzögern.

In Na-Phosphat-Puffer liegt der T_m -Wert bei 78.5°C . Die wesentlich niedrigere Denaturierungstemperatur deutet auf eine teilweise Dissoziation in diesem Puffer hin, die auch nach Lagerung des Hämocyanins bei Raumtemperatur auftrat. Dies konnte durch erste Lichtstreuexperimente nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Während die Exposition von unpolaren Resten, die im Inneren des Proteins liegen und durch die Denaturierung zunehmend exponiert werden, in einer Steigerung der Wärmekapazität resultiert [Kauzmann, 1959], fällt bei der Denaturierung des 24-meren Proteins in Tris-HCl-Puffer, Na-P-Puffer und in Ringer-Lösung bei Erreichen des T_m -Wertes auf, daß eine drastische Abnahme der Wärmekapazität stattfindet, da das Protein ausfällt. 24-meres Hämocyanin und Untereinheiten, die in GlyOH-Puffer temperaturdenaturiert wurden, fallen hingegen bei Erreichen des T_m -Wertes nicht aus. Dies kann mit dem unterschiedlichen Start-pH und der zum Teil starken Temperaturabhängigkeit der pK-Werte der verwendeten Puffer zusammenhängen. Bei Erreichen der jeweiligen Denaturierungstemperatur weisen die Proben in Tris-HCl-, Na-P-Puffer und in Ringer-Lösung pH-Werte im neutralen bis leicht

sauren Bereich zwischen 5.7 und 7.3 auf. In GlyOH-Puffer hingegen liegen die pH-Werte im neutralen bis leicht alkalischen Bereich zwischen 7.8 und 8.4 (Tab. 3.14). Penz [1990] konnte für die Untereinheit \underline{e} von *Eurypelma californicum* zeigen, daß bei Raumtemperatur in einem Bereich von pH 6.5 bis pH 10.5 keine Entfaltung stattfindet. Die absorptions- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften ändern sich in diesem pH-Bereich nur geringfügig und mittels Immungel-elektrophorese konnte gezeigt werden, daß die Epitope und somit die Oberflächenstrukturen noch erhalten bleiben. Außerhalb dieses pH-Bereiches fand eine Entfaltung des Proteins statt.

Der pH-Wert hat dagegen einen Einfluß auf die Temperaturstabilität und vor allem auf den Denaturierungszustand des Proteins. Verschiedene pH-Werte bedingen eine unterschiedliche Ionisierung von Aminosäureresten und haben so einen Einfluß auf elektrostatische Wechselwirkungen des Proteins [Tanford, 1970]. So führen Ibarra-Molero et al. [1999] die starke Abhängigkeit der Temperaturstabilität von Ubiquitin bei verschiedenen pH-Werten auf die pH-Abhängigkeit elektrostatischer Wechselwirkungen zurück. Auch für Barstar, ein aus 4 α -Helices und einem 3-strängigem β -Faltblatt bestehenden Barnase-Inhibitor, konnte eine deutliche pH-Abhängigkeit des T_m -Wertes festgestellt werden [Khurana et al., 1995].

4.4.2 Thermische Stabilität der Sekundärstruktur

Untersucht man die Thermodenaturierung auf der Ebene der Sekundärstruktur, so ist in Tris-HCl-Puffer, sowohl bei oligomerem als auch bei dissoziiertem Hämocyanin, ein massiver Verlust der Sekundärstrukturelemente zu verzeichnen (Abb. 3.30; 3.31). Dies kann zumindest zum Teil durch die Bildung von Aggregaten, die dann zu Boden sinken, erklärt werden.

Die Denaturierung der Sekundärstruktur des 24-mers in Tris-HCl beginnt bei etwa 84°C. Ab 100°C bleibt die Elliptizität konstant, wobei kaum noch Sekundärstrukturelemente detektiert werden können (Abb. 3.30 A; 3.31 A). Die Denaturierung der Sekundärstruktur der Untereinheiten in Tris-HCl-Puffer beginnt bei 52°C und endet bei 100°C. Der weitaus frühere Beginn der Denaturierung ist aufgrund der Stabilisierung der Untereinheiten im oligomeren Molekül zu erwarten [Sternier et al., 1995, Hübler et al., 1998]. Vergleicht man den Verlauf der Denaturierung der Sekundärstrukturelemente, so zeigt sich für das 24-mer ein relativ steiler Übergang

innerhalb von 15°C gegenüber einem relativ flachen Übergang von etwa 50°C bei einem Untereinheitengemisch. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Dissoziation des Oligomers erst bei relativ hoher Temperatur erfolgt und die Untereinheiten dann sofort denaturieren. Lichtstreuexperimente mit oligomerem Hämocyanin zeigten die beginnende Dissoziation des Oligomeres ab 80°C [Sternier et al., 1995].

Der Sekundärstrukturverlust über den großen Temperaturbereich von 50°C kann ein Hinweis auf unterschiedliche Stabilitäten der drei verschiedenen Domänen mit ihren unterschiedlichen Faltungsmotiven sein [Tanford, 1968; Privalov, 1979; Steif et al. 1993; Pkt. 4.2.1, 4.2.2, 4.2.9]. Eine Differenzierung bezüglich der Thermostabilität der jeweiligen Domänen kann allerdings nicht vorgenommen werden.

Die Messungen der Elliptizität des Hämocyanins in GlyOH-Puffer bei 222 nm zeigen, daß unabhängig vom Oligomerisierungsgrad, die Übergänge der Wärmekapazität (C_p) nicht zwingend einen Verlust an Sekundärstruktur bedeuten (Abb. 3.31; 3.32). Der konstante Anstieg der Elliptizität bei Untereinheit d zwischen 40°C und 110°C bei 222 nm spricht dagegen für eine temperaturbedingte Drift des Signals (Abb. 3.32). Der Unterschied in der Denaturierung des Hämocyanins in den verschiedenen Puffern, der mit DSC-Experimenten zu sehen ist, ist somit auch auf der Sekundärstrukturebene zu erkennen.

Das nahe verwandte Crustaceenhämocyanin von *Homarus americanus* zeigt ein anderes Verhalten. Im Vergleich zur Temperaturdenaturierung in Tris-HCl-Puffer resultiert die Denaturierung in GlyOH-Puffer in einer Erhöhung der Schmelztemperatur der Sekundärstruktur von etwa 75° nach 88°C (Abb. 3.33), die Sekundärstruktur bleibt aber im Gegensatz zu der des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* nicht erhalten. T_m -Werte der Temperaturdenaturierung anderer 12-merer Crustaceenhämocyanine wie der von *Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus* und *Maja squinado* in Tris HCl-Puffer, pH 7.5 liegen zwischen 72°C und 76°C und somit im gleichen Temperaturbereich. Auch diese Experimente resultieren in einem fast vollständigen Verlust der Sekundärstruktur [Georgieva et al., 1998].

Die erhöhte Temperaturstabilität des *Homarus*-Hämocyanins in GlyOH-Puffer kann darauf zurückzuführen sein, daß das Crustaceenhämocyanin in diesem Puffer bei Raumtemperatur nicht bzw. sehr schlecht dissoziiert. Ein weiterer entscheidender Unterschied zur Temperaturdenaturierung in Tris-HCl-Puffer ist der mit pH 9.6 unterschiedliche Start-pH-Wert des GlyOH-Puffers. Die pH-Änderung mit der Temperatur ist der von Tris-HCl-Puffer sehr ähnlich. Am T_m -Punkt bei 88°C weist der

GlyOH-Puffer einen pH-Wert von pH 7.8, die drei verschiedenen Tris-Puffer im Gegensatz hierzu am jeweiligen T_m -Punkt pH-Werte zwischen 6.1 und 6.2 auf (Abb. 3.33). Damit liegt der pH-Wert des GlyOH-Puffers bei hohen Temperaturen eher im pH-Bereich der Hämolymphe. Hier weist das Crustaceenhämocyanin eine höhere Temperaturstabilität auf. Auch hier spielt der unterschiedliche Ausgangs-pH des Puffers bei 20°C also eine entscheidende Rolle bei der Temperaturdenaturierung.

Was die zumindest teilweise Erhaltung der Sekundärstrukturelemente bei der Temperaturdenaturierung betrifft, ist dies nichts Ungewöhnliches, wie das Beispiel von Bacteriorhodopsin, ein aus sieben transmembranen α -Helices bestehendes Protein, zeigt [Brouillette et al., 1997]. Privalov et al. [1989] konnten außerdem für mehrere globuläre Proteine den Verbleib ausgedehnter Reststrukturen nach der Temperaturdenaturierung zeigen. Die CD-Spektren hitzedenaturierter globulärer Proteine wie Myoglobin, Cytochrom c, Ribonuclease, Staphylococcus Nuclease, Catalase und Collagen waren den CD-Spektren der säuredenaturierten Proteine sehr ähnlich, unterschieden sich aber deutlich von denen, die mit 6 M GdnHCl denaturiert wurden (bei 222 nm). Die Unterschiede zwischen den Spektren werden jedoch kleiner, je höher die Temperatur ist. Privalov et al. [1989] gehen davon aus, daß hitzedenaturierte Proteine im Vergleich zu GdnHCl-denaturierten Proteinen somit noch einen beträchtlichen Anteil an Sekundärstrukturen besitzen. Dieser Anteil nimmt allerdings mit zunehmender Temperatur ab und ist bei 100°C nahezu nicht mehr vorhanden.

4.4.3 Thermische Stabilität der Epitope

Die Unterschiede in der Temperaturstabilität der Messungen auf kalorimetrischer Basis und auf der Ebene der Sekundärstruktur spiegeln sich auch in der Temperaturstabilität der Epitope wider, die an der Oberfläche der Hämocyanine lokalisiert sind. Weder bei 24-merem Hämocyanin, noch bei einzelnen Untereinheiten werden nach der thermischen Denaturierung in Tris-HCl-Puffer noch Epitope erkannt (Abb. 3.34 B, G, J). Dies war aufgrund der Präzipitation des Proteins im DSC zu erwarten. Nach der thermischen Denaturierung von Untereinheiten in GlyOH-Puffer hingegen, bleiben Restepitope erhalten (Abb. 3.34 D, F, I), die von den Antikörpern erkannt werden können. Dies deutet darauf hin, daß bei der thermischen

Denaturierung in GlyOH-Puffer noch Anteile an Tertiär- bzw. Sekundärstruktur erhalten bleiben müssen. Mit den Ergebnissen der Immunelektrophorese und den CD-Messungen in GlyOH-Puffer kann man somit darauf schließen, daß die Änderungen der Hitzekapazität lediglich auf die Zerstörung der Quartär- und eines Großteils der Tertiärstrukturkontakte zurückzuführen sind, nicht aber den vollständigen Verlust der Sekundärstrukturelemente bedeuten. Selbst wenn Konformationsepitope (diskontinuierliche Epitope) durch die weitgehende Zerstörung Tertiärstrukturelemente nicht mehr erkannt werden können wäre es möglich, daß noch kontinuierliche Epitope (Sequenz- oder lineare Epitope) erkannt werden, die lediglich einen Kettenabschnitt des Proteins darstellen,.

4.4.4 Adaptation an die Lebensbedingungen in extremen Biotopen

Abbildung 4.20 zeigt einen Vergleich der T_m -Werte (DSC) des Cheliceratenhämocyanins von *Eurypelma californicum* mit den T_m -Werten von Crustaceenhämocyaninen mit unterschiedlicher Aggregationshöhe.

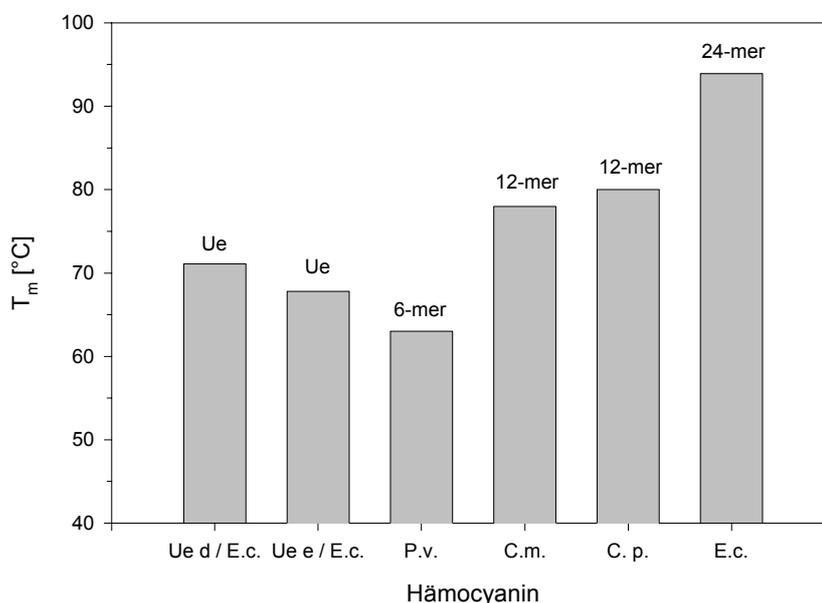


Abb. 4.20: Vergleich der T_m -Werte (DSC) verschiedener Arthropodenhämocyanine mit unterschiedlicher Aggregationshöhe.

E.c.: *Eurypelma californicum*; P.v.: *Palinurus vulgaris*; C.m.: *Carcinus maenas*; C.p.: *Cancer pagurus*.

Vergleicht man die T_m -Werte der Arthropodenhämocyanine mit verschiedenen Aggregationshöhen so zeigt sich, daß das 24-mere Hämocyanin von *Eurypelma californicum* gegenüber den 12-meren Crustceenhämocyaninen von *C. maenas* und *C. pagurus* und dem 6-meren Hämocyanin von *P. vulgaris* [Guzman-Casado et al., 1990], eine weitaus höhere Temperaturstabilität aufweist (Abb. 4.20). Die T_m -Werte der 12-meren Crustceenhämocyanine liegen wiederum über dem des 6-meren Hämocyanins von *P. vulgaris*. Eine deutliche Abhängigkeit der Temperaturstabilität der Hämocyanine von der Aggregationshöhe ist zu erkennen. Ferner zeigt sich, daß auch die einzelnen Untereinheiten unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Die Untereinheiten d und e der Spinne *E. californicum* zeigen eine höhere Temperaturstabilität als das 6-mere Hämocyanin von *P. vulgaris* [Guzman-Casado et al., 1990]. Diese Unterschiede sind unabhängig von der Aggregationshöhe und müssen letztlich in der Sequenz und der dreidimensionalen Struktur der Untereinheiten begründet sein.

Ob die Temperaturstabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* das Ergebnis einer Anpassung an die Lebensbedingungen im Habitat ist, kann lediglich abgeschätzt werden. Die Spinnen sind dämmerungsaktive Tiere und leben in Erdhöhlen in der Wüste im Südwesten der USA. Während eines Tages kann sich hier der Boden auf bis zu 80°C erhitzen. In der Nacht kühlt die Temperatur auf Werte von 0° bis 10°C ab. Auch wenn die Erdhöhlen die großen Temperaturschwankungen zum Teil auffangen, können diese noch etwa 20°-40° C betragen. Trotz der extremen Bedingungen in diesem Biotop, muß die Sauerstoffversorgung der Spinne stets gewährleistet bleiben. Die Habitate der untersuchten Crustaceen liegen dagegen im litoralen und sublitoralen Bereich der Meere, wo die Temperaturen weitaus niedriger liegen und die Temperaturschwankungen moderat sind.

Es scheint somit naheliegend, daß die Unterschiede in der Temperaturstabilität zwischen dem Cheliceratenhämocyanin von *E. californicum* und den Crustaceenhämocyaninen die unterschiedlichen Lebensbedingungen der jeweiligen Habitate reflektieren.

5. Zusammenfassung

Es wurde die Stabilität des nativen 24-meren Hämocyanins und der Untereinheit e der Vogelspinne *Eurypelma californicum* gegenüber GdnHCl und gegenüber der Temperatur untersucht.

Molekulargewichtsbestimmung der Arthropodenhämocyanine

- Zur Bestimmung der molaren Massen wurde eine Vielwinkel-Laser-Lichtstreuapparatur aufgebaut. Hierzu war es notwendig, die spezifischen Extinktionskoeffizienten (ϵ) und Brechungsindex-Inkrementen (dn/dc) der untersuchten Hämocyanine experimentell zu ermitteln.
- Die mit drei verschiedenen Verfahren (Bradford, Lowry, Scopes) bestimmten Extinktionskoeffizienten der untersuchten Arthropodenhämocyanine zeigten deutliche Unterschiede ($1.02-1.47 \text{ ml (cm*mg)}^{-1}$). Die Bestimmung der ϵ -Werte innerhalb einer Art war lediglich innerhalb eines Fehlers von etwa 10% möglich.
- Die mit dem Scanning-Michelson-Interferometer bestimmten Brechungsindex-Inkrementen wichen teilweise deutlich von Literaturwerten ab, was auf die zum Teil fehlerhaften ϵ -Werte zurückgeführt werden kann, die zur Berechnung der Konzentration der Hämocyanine verwendet wurden.
- Die mit einer FPLC gekoppelte Vielwinkel-Laser-Lichtstreuapparatur erlaubte eine schnelle Auftrennung und Bestimmung der Molekulargewichte oligomerer Hämocyanine in Lösung. Die Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten und Brechungsindex-Inkrementen führten zu einer Schwankungsbreite der Molekulargewichte der untersuchten Arthropodenhämocyanine mit unterschiedlicher Aggregationshöhe von bis zu 24%.
- Zur Bestimmung der Molekulargewichte einzelner Untereinheiten des Spinnen-Hämocyanins wurde die Methode der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) erfolgreich angewendet. Hierbei erwies sich Sinapinsäure als geeignete Matrix. Die Molekulargewichte der einzelnen Untereinheiten und die mittleren Molekulargewichte der Untereinheitengemische zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den aus Sequenzdaten errechneten Werten und wichen nicht mehr als 0.1 –0.3% ab.

Stabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*

- Die Denaturierung des 24-meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum* mit GdnHCl zeigt, daß das Protein zunächst dissoziiert, bevor die einzelnen Untereinheiten denaturieren. Die Denaturierung des Oligomers und die eines Untereinheitengemisches verläuft über dieselben molekularen Spezies. Es entstehen keine langlebigen Intermediate. Die irreversible Deoxygenierung durch Einwirkung von GdnHCl ist abgeschlossen, noch bevor eine vollständige Denaturierung der Sekundärstrukturelemente erfolgt.
- Die Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch das oxygenierte aktive Zentrum kann vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden. Sie bleibt innerhalb des 24-mers weitgehend auf die einzelnen Untereinheiten beschränkt. Eine Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch benachbarte aktive Zentren findet kaum statt.
- Die Stabilität eines Monomers gegenüber GdnHCl und gegenüber der Temperatur wurde bei Untereinheit e verfolgt.
- Die fluoreszenzspektroskopischen Daten zeigen zunächst eine Beeinflussung der äußeren Molekülbereiche durch das Denaturierungsmittel. Als Basis für die Interpretation der Ergebnisse auf molekularer Ebene dient die Lage und Orientierung der Tryptophanseitenketten in der modellierten 3D-Struktur von Untereinheit e. Demnach sollten die Tryptophane 179, 267 und 321, die in Domäne II nahe der Moleküloberfläche lokalisiert sind, als erste für den Kontakt mit dem Lösungsmittel in Frage kommen. Zwei der Tryptophane (179, 321) sind Teil der α -Helices 2.1 und 2.5, die die Histidine tragen, die für die Koordination der beiden Kupferatome des aktiven Zentrums verantwortlich sind und zwischen die ein Molekül Sauerstoff reversibel gebunden werden kann. Die Denaturierung des aktiven Zentrums in Domäne II mit dem `Four- α -Helix-Bundle` erfolgt jedoch erst bei höheren GdnHCl-Konzentrationen als die Entfaltung der Umgebung der Tryptophane.
- Auf Basis der modellierten 3D-Struktur von Untereinheit e ergeben sich aufgrund der Position und des Abstandes der Cysteine zueinander zwei potentielle Schwefelbrücken in Domäne III. Inwieweit sie zur Stabilität beitragen kann letztlich nicht beantwortet werden.

- Selbst bei sehr hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen wie 6 M GdnHCl liegt kein reines Zufallsknäuel vor und es sind noch Reste von Sekundärstrukturelementen mittels CD-Spektroskopie nachzuweisen.
- Mittels der `Differential-Scanning`-Kalorimetrie konnte für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* eine ausgeprägte Temperaturstabilität nachgewiesen werden, die deutlich vom Oligomerisierungsgrad abhängt. Die Stabilität und die Art des Denaturierungsendzustandes sind hierbei abhängig vom verwendeten Puffer, dessen Ausgangs-pH und der An- bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Erfolgt bei der Denaturierung keine Verklumpung des Proteins, bleiben die Sekundärstrukturelemente erhalten, und es sind noch Reste von Epitopen an der Moleküloberfläche nachzuweisen.
- Neben einer Stabilisierung der Untereinheiten im Oligomer zeigen diese auch eine unterschiedliche intrinsische Stabilität. Die Untereinheiten d und e des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* weisen eine höhere Temperaturstabilität als vergleichbare Hämocyanin-Untereinheiten aus Crustaceen auf.
- Die außerordentliche Temperaturstabilität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* im Vergleich zu der der untersuchten Crustaceenhämocyanine spiegelt vermutlich die extremen Lebensbedingungen im Habitat der Vogelspinne wider. Während die Vogelspinne in den trockenen, heißen Gegenden im Südwesten der USA vorkommt und im Laufe eines Tages hohen Temperaturen und großen Temperaturschwankungen ausgesetzt ist, liegen die Habitate der untersuchten Crustaceen meistens im litoralen und sublitoralen Bereich der Meere, wo die Temperaturen weitaus niedriger liegen und die Temperaturschwankungen moderat sind.

6. Literatur

Antonini E, Brunori M, Colosimo A, Kuiper HA, Zolla L.

Kinetic and thermodynamic parameters for oxygen binding to the allosteric states of *Panulirus interruptus* hemocyanin
Biophysical Chemistry 1983; 18: 117-24.

Babul J, Stellwagen E.

Measurement of protein concentration with interferences optics.
Anal Biochem. 1969 Apr 4;28(1):216-21.

Bak HJ, Beintema JJ.

Panulirus interruptus hemocyanin. The elucidation of the complete amino acid sequence of subunit a.
Eur J Biochem. 1987 Dec 1;169(2):333-48.

Baldwin MJ, Root DE, Pate JE, Fujisawa K, Kitajima N Solomon EI.

"Spectroscopic Studies of a Side-on Peroxide-Bridged Binuclear Copper(II) Model Complex of Relevance to the Active Sites in Oxyhemocyanin and Oxytyrosinase"
J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10421-10431.

Baldwin RL.

How Hofmeister ion interactions affect protein stability.
Biophys J. 1996 Oct;71(4):2056-63.

Baldwin RL.

Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Nov;83(21):8069-72.

Becker A, Köhler W, Müller B.

A scanning Michelson interferometer for the measurement of the concentration and temperature derivative of the refractive Index of liquids.
Ber. Bunsengesellschaft Phys. Chem 1995, 99:600-608

Beltramini M, Ricchelli F, Piazzesi A, Barel A, Salvato B.

Removal of copper from *Octopus vulgaris* haemocyanin. Preparation of the half-apo and apo derivatives.
Biochem J. 1984 Aug 1;221(3):911-4.

Boisset N, Taveau JC, Lamy J, Wagenknecht T, Radermacher M, Frank J.

Three-dimensional reconstruction of native *Androctonus australis* hemocyanin.
J Mol Biol. 1990 Dec 5;216(3):743-60.

Boisset N, Penczek P, Taveau JC, Lamy J, Frank J, Lamy J.

Three-dimensional reconstruction of *Androctonus australis* hemocyanin labeled with a monoclonal Fab fragment.
J Struct Biol. 1995 Jul-Aug;115(1):16-29.

Boteva R, Ricchelli F, Sartor G, Decker H.

Fluorescence properties of hemocyanin from tarantula (E.C.): a comparison between the whole molecule and isolated subunits.
J Photoch Photobiol B Biol. 1993; 17: 145-53.

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Breslow R, Guo T.

Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(1):167-9.

Brouillette CG, Muccio DD, Finney TK.

pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding.
Biochemistry. 1987 Nov 17;26(23):7431-8.

Buzy A, Gagnon J, Lamy J, Thibault P, Forest E, Hudry-Clergeon G.

Complete amino acid sequence of the Aa6 subunit of the scorpion *Androctonus australis* hemocyanin determined by Edman degradation and mass spectrometry.
Eur J Biochem. 1995 Oct 1;233(1):93-101.

Cantor CR, Schimmel PR.

Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function.
W.H Freeman and Company; New York; USA; 1980.

Chiti F, van Nuland NA, Taddei N, Magherini F, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM.

Conformational stability of muscle acylphosphatase: the role of temperature, denaturant concentration, and pH.
Biochemistry. 1998 Feb 3;37(5):1447-55.

Compton SJ, Jones CG.

Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay.
Anal Biochem. 1985 Dec;151(2):369-74.

Creighton, TE.

Protein structure; A practical approach.
Oxford University Press; 1997.

Damaschun G, Damaschun H, Gast K, Misselwitz R, Muller JJ, Pfeil W, Zirwer D.

Cold denaturation-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase from yeast.
Biochemistry. 1993 Aug 3;32(30):7739-46. Damaschun et al., 1993

Damaschun G, Damaschun H, Gast K, Zirwer D.

Denatured states of yeast phosphoglycerate kinase.
Biochemistry (Mosc). 1998 Mar;63(3):259-75. Review.

Davidson B, Fasman GD.

The single-stranded polyadenylic acid-poly-L-lysine complex. A conformational study and characterization.

Biochemistry. 1969 Oct;8(10):4116-26.

Davidson B, Fasman GD.

The conformational transitions of uncharged poly-L-lysine. Alpha helix-random coil-beta structure.

Biochemistry. 1967 Jun;6(6):1616-29.

Debeire P, Montreuil J, Goyffon M, van Kuik JA, van Haalbeeck H, Vliegenthart GFG.

Primary structure of the oligosaccharide moiety of hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*.

Carbohydrate Res. 1986; 151: 305-10.

Decker H.

Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Dissertation 1981; Ludwig Maximilians Universität München.

Decker H, Richey B, Gill SJ.

Structural and functional studies on the hemocyanin of the mangrove crab *Scylla Serrata*

Invertebrate oxygen carriers 1986; ed. Bernt Linzen; Springer Verlag Heidelberg.

Decker H, Connelly PR, Robert CH, Gill SJ.

Nested allosteric interaction in tarantula hemocyanin revealed through the binding of oxygen and carbon monoxide.

Biochemistry. 1988 Sep 6;27(18):6901-8.

Decker H, Sterner R.

Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons.

J Mol Biol. 1990a Jan 5;211(1):281-93.

Decker H, Sterner R.

Hierarchies in the structure and function of oxygen-binding proteins.

Naturwissenschaften. 1990b Dec;77(12):561-8.

Decker H, Hartmann H, Sterner R, Schwarz E, Pilz I.

Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin.

FEBS Lett. 1996 Sep 16;393(2-3):226-30.

de Haas F, van Bruggen EF.

The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. A tentative mechanism for cooperative behavior.

J Mol Biol. 1994 Apr 8;237(4):464-78.

Dewey TG, Hammes GG.

Calculation on fluorescence resonance energy transfer on surfaces.
Biophys J. 1980 Dec;32(3):1023-35.

Doolittle, RF.

in Fasman, G.D. (ed.) Predictions of protein structures and the principles of protein conformation.
Plenum Press 1989

Dunbar J, Yennawar HP, Banerjee S, Luo J, Farber GK.

The effect of denaturants on protein structure.
Protein Sci. 1997 Aug;6(8):1727-33.

Durstewitz G, Terwilliger NB.

cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean Cancer magister and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family.
Mol Biol Evol. 1997 Mar;14(3):266-76.

Edelhoch H.

Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.
Biochemistry. 1967 Jul;6(7):1948-54. Edelhoch, 1967

Ellerton HD, Ellerton NF, Robinson HA.

Hemocyanin--a current perspective.
Prog Biophys Mol Biol. 1983;41(3):143-248.

Eichberg J, Mokrasch LC.

Interference by oxidized lipids in the determination of protein by the Lowry procedure.
Anal Biochem. 1969 Sep;30(3):386-90.

Ellerton NF, Ellerton HD.

Quaternary structure of arthropod hemocyanins.
Biochem Biophys Res Commun. 1982 Oct 29;108(4):1383-7.

Ellerton HD, Carpenter DE, Van Holde KE.

Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of Cancer magister.
Biochemistry. 1970 May 26;9(11):2225-32.

Erker W, Hübler R, Decker H.

Multi-donor multi-acceptor quenching of oxy-hemocyanins by Förster-Transfer
2001, in Vorbereitung.

Fasman GD.

Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules
Plenum Press, New York; 1996.

Fazekas de St. Groth S, Webster RG, Datyner A.

The new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.
Biochim et Biophys Acta. 1963; 71: 377-91

Förster T.

Fluoreszenz organischer Verbindungen
Vandenhoeck und Ruprecht, 1951; Göttingen, BRD

Gaykema WPJ, Hol WGJ; Vereijken J.M, Soeter NM, Bak HJ, Beintema JJ.

3.2 Å structure of the copper containing oxygen-carrying protein Panulirus interruptus haemocyanin
Nature 1984, 309, No.5963: 23-29

Gaykema WP, Volbeda A, Hol WG.

Structure determination of Panulirus interruptus haemocyanin at 3.2 Å resolution. Successful phase extension by sixfold density averaging.
J Mol Biol. 1986 Jan 20;187(2):255-75.

Georgieva DN, Stoeva S, Ali SA, Abbasi A, Genov N, Voelter W.

Circular dichroism study of the hemocyanin thermostability
Spectrochimica acta 1998; Part A 54: 765-71.

Goldberg ME.

Tertiary structure of Escherichia coli beta-D-galactosidase.
J Mol Biol.1969; 46: 441-446

Goldfarb A, Saidel LJ, Mosovich E.

The ultra violet absorption spectra of proteins
J. Biol Chem. 1951, 193: 397

Gondko R, Michalak W.

Some physicochemical properties of haemocyanin of crayfish
Invertebrate oxygen binding proteins; structure active-site and function; 1981; 41-7; eds. Lamy J and Lamy J; Marcel Dekker, New York & Basel.

Gueffroy DE.

Buffers; A guide for the preparation and use of buffers in biological systems
Behring Diagnostics, Gueffroy ed.;1986.

Guex, N and Peitsch, MC.

Swiss-PdbViewer: A Fast and Easy-to-use PDB Viewer for Macintosh and PC.
Protein Data Bank Quaterly Newsletter 1996:77: 7

Guzman-Casado M, Parody-Morreale A, Mateo PL, Sanchez-Ruiz JM.

Differential scanning calorimetry of lobster haemocyanin.
Eur J Biochem. 1990 Feb 22;188(1):181-5.

Hazes B, Magnus KA, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk KH, Hol WG.

Crystal structure of deoxygenated Limulus polyphemus subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation.
Protein Sci. 1993 Apr;2(4):597-619.

Hedwig GR, Lilley TH, Linsdell H.

calorimetric and volumetric studies of the interactions of some amides in water and in 6 mol dm⁻³ aqueous guanidinium chloride.
J Chem Soc faraday Trans. 1991; 87: 2975-82.

Herskovits TT, San George RC, Erhunmwunsee LJ.

Light-scattering investigation of the subunit dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin. Effects of salts and ureas.
Biochemistry. 1981 Apr 28;20(9):2580-7.

Herskovits TT; Russell MW, Carberry SE.

Light scattering investigation of the subunit structure and sequential dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin
Biochemistry 1984; 23: 1875-81.

Herskovits TT, Erhunmwunsee LJ, San George RC, Herp A.

Subunit structure and dissociation of *Callinectes sapidus* hemocyanin.
Biochim Biophys Acta. 1981 Jan 30;667(1):44-58.

Herskovits TT, Hamilton MG.

Hemocyanin of the chiton, *Stenoplax conspicua* (Dall).
Comp Biochem Physiol B. 1987;88(1):127-32.

Herskovits TT.

Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins.
Comp Biochem Physiol B. 1988;91(4):597-611.

Herskovits TT, Blake PA, Hamilton MG.

Subunit dissociation and denaturation of *Fasciolaria tulipa* hemocyanin.
Comp Biochem Physiol B. 1988;90(4):869-74.

Herskovits TT, Otero RM, Hamilton MG.

The hemocyanin of the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Linné).
Comp Biochem Physiol B. 1990;97(4):623-9.

Hoff R.

Lichtstreuexperimente am Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum*
Fortgeschrittenenpraktikum II in Experimentalphysik 1990; Ludwig Maximilian-Universität München

Holtzauer M.

Methoden in der Proteinanalytik
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1996

Holtzauer M.

Biochemische Labormethoden
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997

Huber R.

Beweglichkeit und Starrheit in Proteinen und Protein-Pigment-Komplexen
Angew. Chemie 1988; 100: 79-89.

Hübler R, Fertl B, Hellmann N, Decker H.

On the stability of the 24-meric hemocyanin from *Eurypelma californicum*.
Biochim Biophys Acta. 1998 Apr 2;1383(2):327-39.

Huglin MB.

Is the refractive index increment (dn/dc) wavelength dependent?
Light Scattering From Polymer Solutions 1972; Ed. M.B. Huglin; Academic Press: New York.

Hvidt S, Rodgers ME, Harrington WF.

Temperature-dependent optical rotatory dispersion properties of helical muscle proteins and homopolymers.
Biopolymers. 1985 Sep;24(9):1647-62.

Ibarra-Molero B, Loladze VV, Makhatadze GI, Sanchez-Ruiz JM.

Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of
Biochemistry. 1999 Jun 22;38(25):8138-49.

Jaenicke E.

Untersuchungen zur Bindung der Liganden Urat, Koffein L-Laktat und Ecdyson an
Hämocyanin.
Diplomarbeit; Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz;1998.

Jaenicke R.

Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions.
Eur J Biochem. 1991 Dec 18;202(3):715-28.

Jaenicke R.

Stability and folding of domain proteins.
Prog Biophys Mol Biol. 1999;71(2):155-241.

Jeffrey PD, Shaw DC, Treacy GB.

Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Characterization of a
dimeric subunit and its involvement in the formation of the 25S component.
Biochemistry. 1978 Jul 25;17(15):3078-84.

Jekel PA, Bak HJ, Soeter NM, Vereijken JM, Beintema JJ.

Panulirus interruptus hemocyanin. The amino acid sequence of subunit b and anomalous
behaviour of subunits a and b on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS.
Eur J Biochem. 1988 Dec 15;178(2):403-12.

Jekel PA, Neuteboom B, Beintema JJ.

Primary structure of hemocyanin from *Palinurus vulgaris*.
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1996 Oct;115(2):243-6.

Johnson ML, Yphantis DA.

Subunit association and heterogeneity of *Limulus polyphemus* hemocyanin.
Biochemistry. 1978 Apr 18;17(8):1448-55. Johnson, W.C., Jr., 1990

Johnson WC Jr.

Analysis of circular dichroism spectra.
Methods Enzymol. 1992;210:426-47

Kaufmann R.

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology.
J Biotechnol. 1995 Jul 31;41(2-3):155-75. Review.

Kauzmann W.

Some factors in the interpretation of denaturation
Adv. Protein Chem. 1959; 14:1-63.

Kim KS, Woodward C.

Protein internal flexibility and global stability: effect of urea on hydrogen exchange rates of bovine pancreatic trypsin inhibitor.
Biochemistry. 1993 Sep 21;32(37):9609-13.

Kitajima N, Fujisawa K, Moro-oka Y.

$\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-Peroxo Binuclear Copper Complex, [Cu(HB(3,5-iPr}_2\text{pz)}_3\text{)]}_2\text{(O}_2\text{)}$
J. Am. Chem. Soc. 114, 1989; 111: 8975-8976.

Kitajima N, Fujisawa K, Fujimoto C, Moro-oka Y, Hashimoto S, Kitagawa T, Toriumi K, Tatsumi K, Nakamura A.

A New Model for Dioxygen Binding in Hemocyanin.
Synthesis, Characterization, and Molecular Structure of the $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ Peroxo Dinuclear Copper(II) Complexes $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-R}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$ (R= i-Pr and Ph).
J. Am. Chem. Soc. 1992; 114: 1277-91.

Klarman A, Shaklai N, Daniel E.

Oxygen binding by hemocyanin from *Levantina hierosolima*. I. Exclusion of subunit interactions as a basis for cooperativity.
Biochemistry. 1975 Jan 14;14(1):102-4.

Klarman A, Gottlieb J, Daniel E.

Quaternary structure and arrangement of subunits in hemocyanin from the scorpion *Leirus quinquestriatus*.
Biochemistry. 1979 May 29;18(11):2239-44.

Koepf EK, Petrassi HM, Sudol M, Kelly JW.

WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state.
Protein Sci. 1999 Apr;8(4):841-53.

Kronmann MJ; Holmes LG.

The fluorescence of native, denatured, and reduced denatured proteins.
Photochem. Photobiol.; 1971; 14: 113-134

Khurana R, Hate AT, Nath U, Udgaonkar JB.

pH dependence of the stability of barstar to chemical and thermal denaturation.
Protein Sci. 1995 Jun;4(6):1133-44.

Kuiper HA, Gaastra W, Beintema JJ, van Bruggen EF, Schepman AM, Drenth J.

Subunit composition, x-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of Panulirus interruptus hemocyanin.
J Mol Biol. 1975 Dec 25;99(4):619-29.

Kuwajima K, Mitani M, Sugai S.

Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific Ca²⁺ binding on the folding kinetics of alpha-lactalbumin.
J Mol Biol. 1989 Apr 5;206(3):547-61.

Lakovicz JR

Principles of fluorescence spectroscopy
Plenum Press, New York; 1983

Lakowicz JR, Maliwal BP, Cherek H, Balter A.

Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides.
Biochemistry. 1983 Apr 12;22(8):1741-52.

Lamy J, Bijlholt MC, Sizaret PY, Lamy J, van Bruggen EF.

Quaternary structure of scorpion (Androctonus australis) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy.
Biochemistry. 1981 Mar 31;20(7):1849-56.

Larson BA, Terwilliger NB, Terwilliger RC.

Subunit heterogeneity of Cancer magister hemocyanin.
Biochim Biophys Acta. 1981 Feb 27;667(2):294-302.

Legler G, Muller-Platz CM, Mentges-Hettkamp M, Pflieger G, Julich E.

On the chemical basis of the Lowry protein determination.
Anal Biochem. 1985 Nov 1;150(2):278-87.

Lehrer SS.

Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion.
Biochemistry. 1971 Aug 17;10(17):3254-63.

Linzen B, Soeter NM, Riggs AF, Schneider HJ, Schartau W, Moore MD, Yokota E, Behrens PQ, Nakashima H, Takagi T.

The structure of arthropod hemocyanins.
Science. 1985 Aug 9;229(4713):519-24.

Linzen B.

Blue blood: structure and evolution of hemocyanin
Naturwissenschaften. 1989 May;76(5):206-11.

Loeffler MC, Su SS, Li NC, Casassa EF.

A light-scattering study of the effect of calcium chloride on the molecular weight of Busycon hemocyanin.
Bioinorg Chem. 1978;8(2):133-8.

Loehr JS, Freedman TB, Loehr TM.

Oxygen binding to hemocyanin: a resonance Raman spectroscopic study.
Biochem Biophys Res Commun. 1974 Jan 23;56(2):510-5.

Loewe R, Linzen B.

Haemocyanins in spiders, I. Subunits and stability region of Dugesiella californica haemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1973 Feb;354(2):182-8.

Loewe, R.

Hemocyanins in spiders, V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin.
J Comp Physiol; 1978; B 128: 161-68.

Lottspeich F, Zorbas H.

Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin;1998.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.

Protein measurement with the Folin phenol reagent
J Biol Chem. 1951; 193: 265-275

Lumry R, Eyring H.

Conformational changes of proteins
J Phys Chem. 1954; 58: 110-20.

Magnus KA, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol WG.

Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences.
Proteins. 1994 Aug;19(4):302-9.

Markl J, Schmid R, Czichos-Tiedt S, Linzen B.

Haemocyanins in spiders, III. Chemical and physical properties of the proteins in Dugesiella and Cupiennius blood.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1976 Dec;357(12):1713-25.

Markl J, Strych W, Schartau W, Schneider HJ, Schoberl P, Linzen B.

Hemocyanins in spiders, VI[1]. Comparison of the polypeptide chains of *Eurypelma californicum* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1979 May;360(5):639-50.

Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B.

Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1980 May;361(5):649-60.

Markl J, Savel A, Linzen B.

Hemocyanins in spiders, XIV. Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1981a Sep;362(9):1255-62.

Markl J, Kempter B, Linzen B, Bijlholt MM, van Bruggen EF.

Hemocyanins in spiders, XVI[1]. Subunit topography and a model of the quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1981b Dec;362(12):1631-41.

Markl J, Decker H, Linzen B, Schutter WG, von Bruggen EF.

Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of *Eurypelma* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1982 Jan;363(1):73-87.

Markl J, Decker H.

Molecular structure of arthropodan hemocyanins.
Advances in Comparative and Environmental Physiology 1992, 13, 325-376

Miller KJ, Eldred NW, Arisake F, van Holde KE.

Structure and function of hemocyanin of Thalassinid shrimp
J Comp Physiol 1977; B 115: 171-84.

Miranker AD, Dobson CM.

Collapse and cooperativity in protein folding.
Curr Opin Struct Biol. 1996 Feb;6(1):31-42.

Morimoto K, Kegeles G.

Subunit interactions of lobster hemocyanin. I. Ultracentrifuge studies.
Arch Biochem Biophys. 1971 Jan;142(1):247-57.

Murphy KP, Privalov PL, Gill SJ.

Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds.
Scienc 1990; 247: 559-61

Nakashima H, Behrens PQ, Moore MD, Yokota E, Riggs AF.

Structure of hemocyanin II from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Sequences of the overlapping peptides, ordering the CNBr fragments, and the complete amino acid sequence.
J Biol Chem. 1986 Aug 15;261(23):10526-33.

Neri D, Billeter M, Wider G, Wuthrich, K.

NMR determination of residual structure in a urea-denatured protein; the 434 repressor.
Science 1992; 257: 1559-

Neuteboom B, Jekel PA, Beintema JJ.

Primary structure of hemocyanin subunit c from *Panulirus interruptus*
Eur J Biochem. 1992 May 15;206(1):243-9.

Nozaki, Y.

The preparation of guanidine hydrochloride.
Methods in Enzymol. 1971; 26: 43-50.

Nickerson and van Holde, 1971

A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin - I. Circular dichroism and absorption spectra
Comp. Biochem. Physiol., 1971; 39B:855-72

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T.

How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.
Protein Sci. 1995 Nov;4(11):2411-23.

Pace CN.

Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves.
Methods Enzymol. 1986;131:266-80.

Penz, FK

Zur Entfaltung der Untereinheit ϵ des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*
Dissertation, 1990

Perutz MF.

Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in Proteins
Q Rev Biophys. 1989; 22: 139-236.

Petrescu AJ, Receveur V, Calmettes P, Durand D, Smith JC.

Excluded volume in the configurational distribution of a strongly-denatured protein.
Protein Sci. 1998 Jun;7(6):1396-403.

Pfeil W, Privalov PL.

Thermodynamic investigations of proteins. II. Calorimetric study of lysozyme denaturation by guanidine hydrochloride.
Biophys Chem. 1976 Jan;4(1):33-40.

Pierce J, Suelter CH.

An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination.
Anal Biochem. 1977 Aug;81(2):478-80.

Porter RR.

Structural studies of immunoglobulins.
Science. 1973 May 18;180(87):713-6.

Privalov PL.

Stability of proteins: small globular proteins.
Adv Protein Chem. 1979;33:167-241.

Privalov PL, Tsalkova TN.

Micro- and macro-stabilities of globular proteins.
Nature. 1979 Aug 23;280(5724):693-6.

Privalov PL, Gill SJ.

Stability of protein structure and hydrophobic interaction.
Adv Prot Chem. 1988; 39: 191-234.

Privalov PL, Tiktopulo EI, Venyaminov SY, Griko YV, Makhatadze GI, Khechinashvili NN.

Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state.
J Mol Biol. 1989 Feb 20;205(4):737-50.

Reeck GR.

Handbook of biochemistry. Selected data of molecular biology (Sober, HA ed.)^{2nd} ed., The Chemical Rubber Co., Ohio, 1970, 218.

Reeck GR, Fisher L.

A statistical analysis of the amino acid compositions of proteins.
Int J Pept Protein Res. 1973;5(2):109-17.

Rej R, Richards AH.

Interference by Tris buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure.
Anal Biochem. 1974; 62: 240-47.

Ricchelli F, Salvato B, Filippi B, Jori G.

Conformational changes of Carcinus maenas haemocyanin induced by urea.
Arch Biochem Biophys. 1980 Jun;202(1):277-88.

Ricchelli F, Jori G, Tallandini L, Zatta P, Beltramini M, Salvato B.

The role of copper and quaternary structure on the conformational properties of Octopus vulgaris hemocyanin.
Arch Biochem Biophys. 1984 Dec;235(2):461-9.

Ricchelli F.

Emission Quenching Mechanisms in Octopus vulgaris Hemocyanin: Steady State and Time-Resolved Fluorescence Studies.
Biochemistry 1987, 26: 6933-39.

Richey B.

The Binding of Oxygen and Carbon Monoxide to Arthropod Hemocyanin: An Allosteric Analysis
Dissertation 1984, University of Colorado

Righetti PG, Chillemi F.

Isoelectric focusing of peptides
J Chromatogr. 1978; 157; 243-51

Robert CH, Decker H, Richey B, Gill SJ, Wyman J.

Nesting: hierarchies of allosteric interactions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr;84(7):1891-5.

Rogalla A, Gondko R.

Some physico-chemical properties of *Astacus astacus* hemocyanin
Comp Biochem Physiol. 1981; 68B: 603-6.

Rosenthal HL, Sobieszczanska WA.

Influence of reducing sugars on protein determination by the Lowry procedure.
Anal Biochem. 1970 Apr;34(2):591-3.

Roxby R, Miller K, Blair DP, Van Holde KE.

Subunits and association equilibria of *Callinassa californiensis* hemocyanin.
Biochemistry. 1974 Apr 9;13(8):1662-8.

Saito Y, Tachibana H, Hayski H, Wada A.

Excitation energy transfer between tyrosine and tryptophan in proteins evaluated by the simultaneous measurement of fluorescence and absorption.
Photochem Photobiol. 1981, 14:113-34.

Sali A, Blundell TL.

Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints
J. Mol. Biol. 1994, 234: 779-815.

Salvato B, Beltramini M.

Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site
Life Chem Rep. 1990; 8:1-47

Salvato B ; Zatta P.

The binding capacity of hemocyanins of sodium dodecylsulphate
Comp Biochem Physiol. 1978; 60B;: 107-9.

Sanchez-Ruiz JM, Lopez-Lacomba JL, Cortijo M, Mateo PL.

Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin.
Biochemistry. 1988 Mar 8;27(5):1648-52.

Sanchez R, Sali A.

Advances in comparative protein-structure modelling.
Curr Opin Struct Biol. 1997 Apr;7(2):206-14.

Savel-Niemann A, Markl J, Linzen B.

Hemocyanins in spiders. XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Co-operativity and Bohr effect in dissociation intermediates.
J Mol Biol. 1988, Nov 20;204(2):385-95.

Schmidt W.

Optische Spektroskopie
VCH, Weinheim Deutschland 1994.

Schmid FX.

Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes.
Protein Structure, a practical approach 2nd ed., Creighton TE, ed., IRL Press, 1997.

Schneider HJ, Markl J, Schartau W, Linzen B.

Hemocyanins in spiders, IV[1]. Subunit heterogeneity of *Eurypelma* (*Dugesiella*) hemocyanin, and separation of polypeptide chains.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1977 Sep;358(9):1133-41.

Schoonman MJL., Knetgel R.M.A., Grootenhuis P.D.J.

Practical Evaluation of Comparative Modelling and Threading Methods.
Computers Chem, 1998, Vol 22, No. 5: 369-75.

Schraml A.

Zur Stabilität der Untereinheiten d und bc des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*.
Diplomarbeit, LMU München, 1991.

Scopes RK.

Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm.
Anal Biochem. 1974 May;59(1):277-82.

Shaklai N, Daniel E.

Fluorescence properties of hemocyanin from Levantina hierosolima.
Biochemistry. 1970 Feb 3;9(3):564-8.

Sharp KA.

The hydrophobic effect.
Curr Opin Struct Biol. 1991; 1:171-4

Simpson RB, Kauzmann W.

The kinetics of protein denaturation. I. The behaviour of the optical rotation of ovalbumin in urea solutions.
J Am Chem Soc. 1953; 75: 5139-52.

Siuzdak G.

Mass Spectrometry For Biotechnology.
San Diego, Calif., Academic Press; 1996.

Steif C, Weber P, Hinz HJ, Flossdorf J, Cesareni G, Kokkinidis M.

Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four-alpha-helical-bundle protein ROP.
Biochemistry. 1993 Apr 20;32(15):3867-76.

Steiner RF, Kirby EP.

The interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers.

J Phys Chem. 1969 Dec;73(12):4130-5.

Sterner R, Bardehle K, Paul R, Decker H.

Tris: an allosteric effector of tarantula haemocyanin.

FEBS Lett. 1994 Feb 14;339(1-2):37-9.

Sterner R, Vogl T, Hinz HJ, Penz F, Hoff R, Föll R, Decker H.

Extreme thermostability of tarantula hemocyanin.

FEBS Lett. 1995 May 1;364(1):9-12.

Strambini GB, Gabellieri E.

Quenching of indole luminescence by copper ions: a distance dependent study

J. Phys. Chem. 1991; 95: 4347-52

Tal M, Silberstein A, Nusser E.

Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer.

J Biol Chem. 1985 Aug 25;260(18):9976-80.

Tanford C.

Protein denaturation.

Adv Protein Chem. 1968;23:121-275.

Tanford C.

Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation.

Adv Protein Chem. 1970;24:1-95. Review. No abstract available.

Thayer MM, Haltiwanger RC, Allured VS, Gill SC, Gill SJ.

Peptide-urea interactions as observed in diketopiperazine-urea cocrystal.

Biophys Chem. 1993 Apr;46(2):165-9.

Tseneklidou-Stoeter D, Gerwig GJ, Kamerling JP, Spindler KD.

Characterization of N-linked carbohydrate chains of the crayfish, *Astacus leptodactylus* hemocyanin.

Biol Chem Hoppe Seyler. 1995 Sep;376(9):531-7.

van der Meer BW, Coker G, Chen S.

Resonance Energy Transfer

VCH, New York, 1994.

van Holde KE, van Bruggen EFJ.

The Hemocyanins

in: Subunits in Biological Systems 1971; (eds.S.N. Timasheff, G.D. Fasman); 1-53; Marcel Dekker, NewYork.

van Holde KE, Miller KI.

Haemocyanins.

Q Rev Biophys. 1982 Feb;15(1):1-129.

van Holde KE, Miller KI., Lang WH.

Molluscan Hemocyanins

Adv Comp Environ Physiol. 1992;13:257-300.

van Holde KE, Miller KI.

Hemocyanins.

Adv Protein Chem. 1995;47:1-81.

van Kley H, Hale SM.

Assay for protein by dye binding.

Anal Biochem. 1977 Aug;81(2):485-7.

Van Kuik JA, Sijbesma RP, Kamerling JP, Vliegenthart JF, Wood EJ.

Primary structure determination of seven novel N-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine as constituents of xylose-containing N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein.

Eur J Biochem. 1987 Dec 1;169(2):399-411. van Kuik et al., 1987

Vertes A, Irinyi G, Gijbels R.

Hydrodynamic model of matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

Anal. Chem., 1993; 65: 2389-2393.

Voit R, Schneider HJ.

Tarantula hemocyanin mRNA. In vitro translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e.

Eur J Biochem. 1986 Aug 15;159(1):23-9.

Voit R, Feldmaier-Fuchs G.

Arthropod hemocyanins. Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the tarantula hemocyanin subunits a and e.

Biol Chem. 1990 Nov 15;265(32):19447-52.

Voit R, Feldmaier-Fuchs G.

cDNA cloning and sequencing of tarantula hemocyanin subunits.

Biol Met. 1990;3(2):87-9.

Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T.

Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits

J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39339-44.

Volbeda A, Hol WG.

Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution.

J Mol Biol. 1989 Sep 20;209(2):249-79.

Voll W, Voit R.

Characterization of the gene encoding the hemocyanin subunit e from the tarantula *Eurypelma californicum*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul;87(14):5312-6.

Wen J, Arakawa T, Philo JS.

Size exclusion chromatography with on-line light scattering , absorbance and refractive index detectors for studying proteins and their interactions

Anal biochem. 1996; 240: 155-66.

Wetlaufer DB.

Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Mar;70(3):697-701.

Wilson G, Hecht L, Barron LD.

Residual structure in unfolded proteins revealed by Raman optical activity.

Biochemistry. 1996 Sep 24;35(38):12518-25.

Wyatt PJ.

Light scattering and the absolute characterization of macromolecules

Anal Chim Acta 1993; 272:1-40

Wyatt PJ, Papazian L.

The interdetector volume in modern light scattering and high performance size exclusion chromatography.

LCGC 1993; 11: 862-72.

Zatta P.

Protein lipid interactions in *Carcinus maenas* (Crustacea) hemocyanin.

Comp Biochem Physiol. 1981; 69B: 731-35.

Zhu H, Ownby DW, Riggs CK, Nolasco NJ, Stoops JK, Riggs AF.

Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron.

J Biol Chem. 1996 Nov 22;271(47):30007-21.