

**Untersuchung  
zur Temperaturabhängigkeit der  
O<sub>2</sub>-Bindungseigenschaft von Hämocyanin aus  
Arthropoden verschiedener Biotope**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Werner Conze

geb. am 26.04.1964 in Paderborn

Mainz, 2005

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2005

Für: meine Mutter  
&  
Anne-Kristin,  
Hannah und Malte



<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	<b>6</b>
2.1	<b>Verwendete Tiere</b> .....	<b>6</b>
2.1.1	Bezugsquellen der Tiere .....	7
2.2	<b>Gewinnung der Hämolymphe</b> .....	<b>7</b>
2.3	<b>Verwendete Puffer</b> .....	<b>8</b>
2.4	<b>Präparation und Charakterisierung der Hämocyane</b> .....	<b>8</b>
2.4.1	Gelfiltration der Crustaceen-Hämocyane.....	8
2.4.2	Gelfiltration des <i>Eurypelma</i> -Hämocyanins .....	9
2.4.3	Analytische Gelfiltration .....	9
2.4.4	Aufkonzentrierung und Dialyse der Hämocyaninproben.....	9
2.4.5	Absorptionsspektroskopie .....	9
2.4.6	Native PAGE .....	10
2.4.7	SDS-PAGE .....	10
2.4.8	Temperaturstabilität der verwendeten Hämocyane.....	10
2.4.9	EM-Aufnahmen .....	11
2.4.10	Lipoprotein-Isolierung aus der Hämolymphe.....	11
2.5	<b>Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven</b> .....	<b>12</b>
2.5.1	Kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven.....	12
2.5.2	Diskontinuierliche Sauerstoffbindungskurven .....	13
2.6	<b>Theorie</b> .....	<b>13</b>
2.6.1	Analyse der Sauerstoffbindungskurven.....	13
2.6.2	Die Modelle .....	14
2.6.2.1	Das sequenzielle Modell.....	14
2.6.2.2	Das konzertierte Modell.....	15
2.6.2.3	Das Nesting-Modell .....	16
2.6.3	Das Bindungspolynom .....	17
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>20</b>
3.1	<b>Die Bestandteile der Arthropoden Hämolymphe</b> .....	<b>20</b>
3.2	<b>Charakterisierung der Hämocyane</b> .....	<b>20</b>
3.3	<b>Gelchromatographische Trennung der Hämocyane</b> .....	<b>20</b>
3.4	<b>Gelelektrophoretische Trennung der Hämocyane</b> .....	<b>23</b>
3.4.1	SDS-PAGE .....	23
3.4.2	NATIVE-PAGE.....	24
3.5	<b>EM-Aufnahmen</b> .....	<b>25</b>
3.6	<b>Das Nicht-Respiratorische-Protein (NRP)</b> .....	<b>26</b>
3.6.1	EM-Aufnahmen Nicht-Respiratorischer-Proteine einiger Cheliceren- und Crustaceen-Arten .....	27
3.6.2	SEC-Trennung der Hämolymphe aus zwei Crustaceen-Arten .....	28
3.7	<b>Lipoproteine</b> .....	<b>29</b>
3.8	<b>O<sub>2</sub>-Bindung der Hämocyane</b> .....	<b>33</b>
3.8.1	Relativer O <sub>2</sub> -Beladungsgrad einiger Hämocyane in Abhängigkeit von der Temperatur und pH .....	33
3.8.2	Die Sauerstoffbeladung für pH=pH(T) .....	33
3.8.3	Die Sauerstoffbeladung für pH=const bei variabler Temperatur .....	38
3.9	<b>Die Sauerstoffbindungseigenschaften verschiedener Hämocyane</b> .....	<b>40</b>
3.9.1	<b>I</b> (pH=pH(T)) <i>Astacus astacus</i> Hämocyanin.....	40
3.9.2	<b>II</b> (pH=const) <i>Astacus astacus</i> Hämocyanin.....	44

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.9.3	I (pH=pH(T)) <i>Paralithodes camtschatica</i> Hämocyanin .....	49
3.9.4	II (pH=const.) <i>Paralithodes camtschatica</i> Hämocyanin .....	52
3.9.5	I (pH=pH(T)) <i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanin .....	57
3.9.6	II (pH=const.) <i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanin .....	60
3.9.7	I (pH=pH(T)) <i>Homarus americanus</i> Hämocyanin.....	65
3.9.8	II (pH=const.) <i>Homarus americanus</i> Hämocyanin.....	68
3.9.9	I (pH=pH(T)) <i>Potamon potamios</i> Hämocyanin .....	73
3.9.10	II (pH=const.) <i>Potamon potamios</i> Hämocyanin .....	76
3.9.11	I (pH=pH(T)) <i>Calappa granulata</i> Hämocyanin.....	81
3.9.12	II (pH=const.) <i>Calappa granulata</i> Hämocyanin.....	84
3.9.13	I (pH=pH(T)) <i>Panulirus interruptus</i> Hämocyanin.....	89
3.9.14	II (pH=const.) <i>Panulirus interruptus</i> Hämocyanin.....	91
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION.....</u></b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Hämolymphe-Zusammensetzung.....</b>	<b>94</b>
4.1.1	Die Lipoproteine .....	94
4.1.2	Das Nicht-Respiratorische-Protein (NRP) .....	95
4.1.3	Die Hämocyanine .....	95
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der Hämocyanine hinsichtlich Funktion, Biotop, Struktur u. Stabilität</b>	<b>95</b>
4.2.1	<u>Gruppe (1): <i>Astacus astacus</i>, <i>Potamon potamios</i> und <i>Eurypelma californicum</i></u> .....	96
4.2.2	<u>Gruppe (2): <i>Paralithodes camtschatica</i>, <i>Homarus americanus</i>, <i>Calappa granulata</i> und <i>Panulirus interruptus</i></u> .....	109
4.2.3	Das MWC-Modell für <i>Panulirus interruptus</i> .....	126
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b>130</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Lipoproteine und das ‚Nicht-Respiratorische-Protein‘ (NRP) in der Hämolymphe .....</b>	<b>130</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Eigenschaften der untersuchten Hämocyanine in Abhängigkeit zum Biotop</b>	<b>130</b>
5.2.1	Die Gruppe (1) Hämocyanine ( <i>A. astacus</i> , <i>E. californicum</i> u. <i>P. potamios</i> ).....	130
5.2.2	Die Gruppe (2) Hämocyanine ( <i>P. camtschatica</i> , <i>H. americanus</i> , <i>C. granulata</i> u. <i>P. interruptus</i> ).	132
<b>6</b>	<b><u>LITERATUR.....</u></b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>158</b>
<b>8</b>	<b><u>LEBENS LAUF .....</u></b>	<b>159</b>

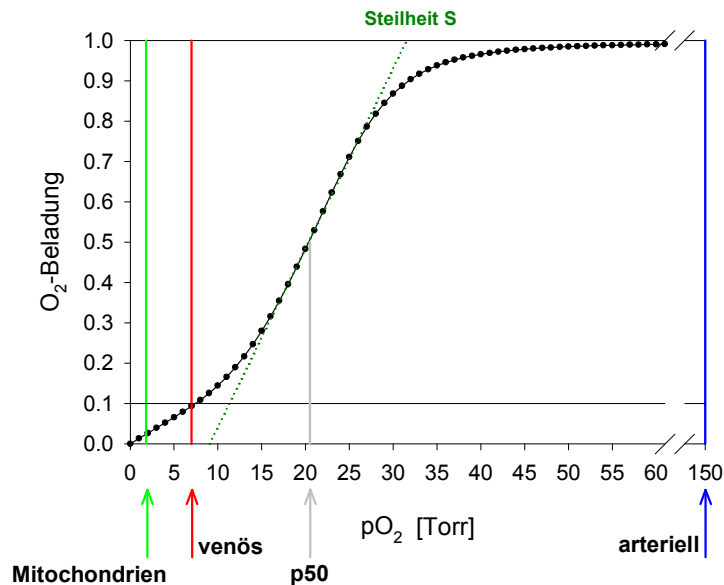
## 1 Einleitung

Die Evolution hat nur wenige O<sub>2</sub>-Transportproteine im Tierreich hervorgebracht. Sie alle nutzen entweder die Metallionen Fe<sup>2+</sup> oder Cu<sup>2+</sup> zur reversiblen Sauerstoffbindung in vier verschiedenen Typen von aktiven Zentren. Die Metallatome werden dabei über eine prosthetische Gruppe (Porphyrin-Ring) oder direkt (koordinativ) durch Histidine an die Proteinmatrix gebunden.

Metall-Atom	aktives Zentrum	Quartär-Struktur	Atmungsprotein
Fe <sup>2+</sup>	Häm	4-mer	<i>Hämoglobin</i>
	Häm	2x[6x(3x4)]-mer	<i>Erythrocrucorin</i>
	modifiziertes Häm	2x[6x(3x4)]-mer	<i>Chlorocrucorin</i>
	Fe-O <sub>2</sub> -Fe	8-mer	<i>Hämerythrin</i>
oxy Cu <sup>2+</sup> deoxy Cu <sup>+</sup>	Cu-O <sub>2</sub> -Cu	1x6-mer bis 8x6-mer	<i>Hämocyanin</i> (Arthropoden)
		1x10-mer, 2x10-mer	<i>Hämocyanin</i> (Mollusken)

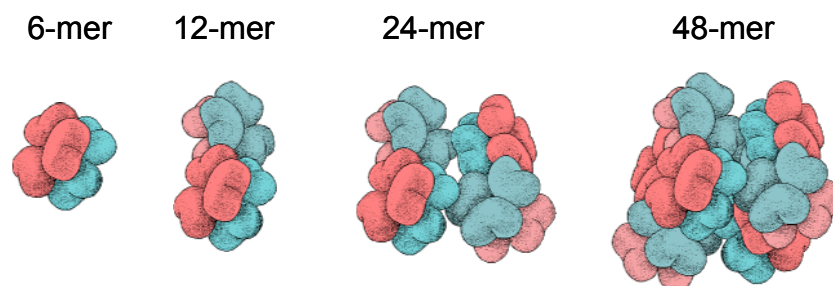
**Tab. 1.1-1:** Die im Tierreich vorkommenden O<sub>2</sub>-Transportproteine lassen sich auf zwei Metallatome, vier Typen von aktiven Zentren und sechs Quartärstrukturen zurückführen. [van HOLDE & MILLER, 1995; MARKL, 1995; ROYER et al., 2000]

Die Atmungsproteine sorgen für den Transport des Sauerstoffs von den respiratorischen Epithelien (Lunge, Kiemen), hin zu den O<sub>2</sub> verbrauchenden Gewebszellen (oxidativer Stoffwechsel). Die Beladung mit Sauerstoff in den Lungen, bzw. den Kiemen sollte leicht und schnell, d.h. mit einer möglichst hohen O<sub>2</sub>-Affinität erfolgen. Am Ort des Verbrauchs muss sich die O<sub>2</sub>-Affinität des Atmungsproteins deutlich verringert haben, um eine leichte und schnelle Abgabe des Sauerstoffs zu gewährleisten. Würde die Bindung des Sauerstoffs an das Atmungsprotein nicht-kooperativ, also rein nach dem Massenwirkungsgesetz erfolgen, wären die zuvor genannten Anforderungen nur sehr unzureichend erfüllt. Eine nicht-kooperative Bindung mit einer typischen hyperbolischen Bindungskurve, ist im Gegensatz zu der sigmoiden Kurve einer kooperativen O<sub>2</sub>-Bindung, nicht in der Lage in einem engen pO<sub>2</sub>-Bereich genügend Sauerstoff für die Zellatmung freizusetzen (Abb. 1.1-1). Eine sigmoide Bindungskurve und dadurch eine effektivere O<sub>2</sub>-Transportkapazität wird durch eine kooperative O<sub>2</sub>-Bindung erreicht. Kooperativität bedeutet, dass das Atmungsprotein seine O<sub>2</sub>-Affinität mit zunehmender Beladung durch Wechselwirkung zwischen den aktiven Zentren erhöht. Dies ist nur bei Proteinmolekülen mit mehreren Bindungsstellen möglich, meist sind dies oligomere Protein-Komplexe, wie dem Hämocyanin oder Hämoglobin. Zur Charakterisierung der Atmungsproteine wird die mittlere Affinität verwendet, die den O<sub>2</sub>-Partialdruck (p<sub>50</sub>) angibt, bei dem die Hälfte der Bindungsstellen besetzt ist.



**Abb. 1.1-1:** Die schematisierte sigmoide O<sub>2</sub>-Bindungskurve zeigt deutlich die hohe Transportkapazität der Atmungsproteine aufgrund der kooperativen O<sub>2</sub>-Bindung. Die Atmungsproteine werden bei einem hohen O<sub>2</sub>-Partialdruck in den respiratorischen Epithelien (blauer Pfeil) nahezu vollständig beladen und am Ort des Verbrauchs (grüner Pfeil) fast vollständig entladen.

Hämocyane sind Atmungsproteine, die extrazellulär in der Hämolymphe vieler Arthropoden und Mollusken zu finden sind. Hämocyane sind sehr große Moleküle mit Molekulargewichten von ca. 450 kDa bis 8000 kDa [MARKL & DECKER, 1992]. Die Quartärstrukturen der Hämocyane aus Arthropoden und Mollusken unterscheiden sich deutlich. Letztere sind zylindrische Moleküle, die bis zu 160 funktionelle Sauerstoffbindungscentren enthalten. Die funktionelle Einheit mit einer Proteinmasse von ca. 50 kDa bindet ein Molekül O<sub>2</sub> und jeweils sieben oder acht solcher aktiven Zentren werden von einer Polypeptidkette gebildet. Ganz anders sind die Arthropoden Hämocyane aufgebaut [MARKL & DECKER, 1992; van HOLDE & MILLER, 1982, 1995; van HOLDE et al, 2001; SALVATO & BELTRAMINI, 1990]. Diese lassen sich vollständig in ihre funktionellen Untereinheiten dissoziieren, welche ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa besitzen und jedes ein Molekül O<sub>2</sub> bindet. Die nativen Aggregate sind entweder Hexamere (1x6-mer) oder Vielfache davon: 2x6, 4x6, 6x6 oder 8x6. Die 2x6-mere sind typisch für viele Crustaceen-Arten, die 4x6-mere sind typisch für die erdgeschichtlich alten Spinnen, wie die Vogelspinnenart *Eurypelma californicum*, die 8x6-meren Aggregate sind typisch für Pfeilschwanzkrebse.



**Abb. 1.1-2:** Aggregationsstufen verschiedener Arthropoden-Hämocyane. Die 6- und 12-mere sind typisch für Crustaceen. Die 24- und 48-mere finden sich bei den Cheliceraten. Die Trimere der jeweiligen Hexamere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.



## 1 EINLEITUNG

---

Für die Hämocyanine aus Arthropoden sind umfangreiche Kenntnisse vorhanden, die vom Gen über die Primär-, Sekundär-, Tertiär- bis hin zur Quartärstruktur reichen [MARKL & DECKER, 1992]. Die am besten untersuchten Vertreter dieser Gruppe sind das 6-mere Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus*, das 4x6-mere Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und das 8x6-mere Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Die deoxygenierte Form des hexameren Hämocyanins *Panulirus interruptus* ist röntgenspektroskopisch mit einer Auflösung von 3.2 Å aufgeklärt [GAYKEMA et al., 1984; VOLBEDA et al., 1989]. Die Auflösung der oxy- und der deoxy-Form des Homohexamers aus der Untereinheit II des Hämocyanins aus *L. polyphemus* liegt bei 2.4 Å [HAZES et al., 1993; MAGNUS et al., 1994]. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Sauerstoff in einer  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Koordination gebunden wird. Auf der Basis der Röntgenstrukturen lässt sich eine typische Untereinheit eines Arthropoden-Hämocyanins in drei klar abgrenzbare Domänen unterteilen, die durch unterschiedliche Faltungsmotive charakterisiert sind. Die erste Domäne ist reich an  $\alpha$ -Helices, die Zweite enthält das aktive Zentrum mit den beiden Cu-Atomen, die komplex durch zwei Paare antiparallele  $\alpha$ -Helices (ein „four  $\alpha$ -helix bundle“ Faltungsmotiv) gebunden sind. Die dritte Domäne enthält ein siebensträngiges  $\beta$ -Barrel (Abb. 1.1-3).



**Abb. 1.1-3: Hämocyanin Untereinheit von *Limulus polyphemus* in schematischer Darstellung** (grün: Domäne 1; rot: Domäne 2; blau: Domäne 3; blau: Cu(I)-Ionen); Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm MOLSCRIPT erstellt [KRAULIS, 1991]

Die Anordnung der Untereinheiten in einem Hexamer leitet man von den bekannten Röntgenstrukturen ab. Diese Anordnung deckt sich weitgehend mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen hexamerer Hämocyanine. Auf der Basis von EM-Aufnahmen wurde auch die Anordnung der Hexamere zueinander für einige multimere Hämocyanine geklärt [MARKL et al., 1981; de HAAS et al., 1991; de HAAS & van BRUGGEN, 1994; DUWE & van HEEL, 1994; TAVEAU et al., 1997].

Das Sauerstoffbindungsverhalten von Arthropoden-Hämocyaninen und dessen Abhängigkeit von anorganischen und organischen Effektoren ist für mehrere Hämocyanine gut untersucht [Review-Artikel: TRUCHOT, 1992]. Protonen, Kationen (wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), organische Anionen wie L-Laktat und Urat beeinflussen die Affinität, sowie die Kooperativität der  $\text{O}_2$ -Bindung [ARISAKA & van HOLDE, 1979; MAGNUM, 1980, 1998; TRUCHOT & LALLIER, 1992; BRIDGES & MORRIS, 1986; MORRIS et al., 1986; ZEIS et al., 1992; NIES et al., 1992]. Welche Bereiche bzw. Aminosäuren bei den einzelnen Untereinheitentypen verändert sind,

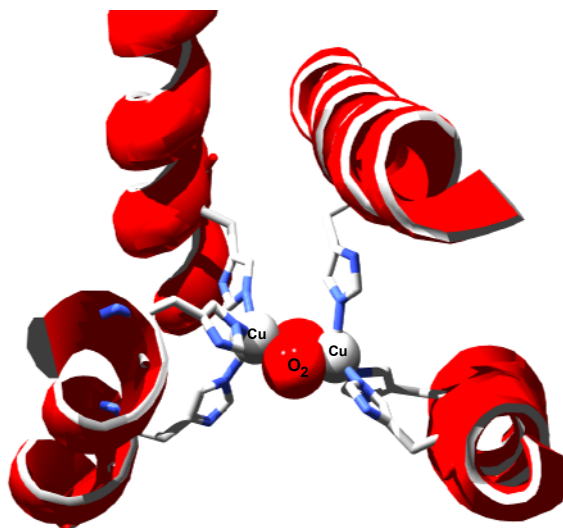
## 1 EINLEITUNG

---

um damit das O<sub>2</sub>-Bindungsverhalten den neuen Bedingungen besser anzupassen, ist dagegen nicht bekannt.

Sauerstoff wird von den Hämocyaninen hoch kooperativ gebunden [Review-Artikel: van HOLDE & MILLER, 1982, 1995; ELLERTON et al., 1983]. In mehreren Arbeiten wurden die O<sub>2</sub>-Bindungskurven mit Hilfe von unterschiedlichen Modellen analysiert. Im einfachsten Fall wird das MWC-Modell angewendet, welches für Hämocyanine, die größer als Hexamere sind, nicht gilt. Eine Erweiterung für große Hämocyanine stellt das Nested-MWC-Modell dar [DECKER et al., 1986; ROBERT et al., 1987], in dem der hierarchische Aufbau der Quartärstrukturen berücksichtigt wird. Eine grundlegende Annahme aller Modelle ist die Existenz von unterschiedlichen Konformationen und der reversible Übergang zwischen diesen. Der Nachweis verschiedener Konformationen von Hämocyaninen ist jedoch nur in wenigen Fällen gemittelt über viele Hämocyaninmoleküle gelungen. BROUWER et al. (1981) konnten mittels Lichtstreuung zeigen, dass die Deoxy-Form des 48-meren *L. polyphemus* Hämocyanins gegenüber der Oxy-Form stabilisiert ist. MAKINO (1987) zeigte differenzspektroskopisch für das hexamere Hämocyanin aus der Languste *P. japonicus* ein unterschiedliches Bindungsverhalten der Oxy- und der Deoxy-Form gegenüber einem Farbstoff. Mittels Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung konnten physikalisch unterschiedliche Konformationen beim 4x6-mer Spinnenhämocyanin während der Oxygenierung nachgewiesen werden [DECKER et al., 1996; HARTMANN & DECKER, 2002]. Zudem konnten im oxygenierten Zustand bei den 2x6-mer Hämocyaninen aus Hummer und Flusskrebs zwischen zwei Konformationen im oxygenierten Zustand unterschieden werden, von denen eine L-Laktat bzw. Urat bindet und die andere nicht [HARTMANN et al., 2001]. Welche Molekülbereiche bei diesen Konformationsübergängen betroffen sind, konnte jedoch bisher noch nicht geklärt werden.

Mit Hilfe der Röntgenstrukturen konnte für das schwach kooperative Homohexamer der *L. polyphemus* Untereinheit II gezeigt werden, dass beim Übergang von der Oxy- zur Deoxy-Form in der Proteinmatrix nahezu keine Bewegung zu erkennen ist. Lediglich das Cu-Zentrum selbst wird verändert, indem der Abstand zwischen den beiden Cu-Atomen von 4.6 Å auf 3.2 Å verkleinert wird [MAGNUS et al., 1994]. Obwohl auch die Rolle der Bindung eines Cl-Ions diskutiert wird [HAZES et al., 1993,1997], ist der Mechanismus jedoch weitgehend unklar.



**Abb. 1.1-4:** Das Sauerstoffbindungszentrum des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* in schematischer Darstellung. Die Cu(I)-Ionen (weiß/grau) binden in einer  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Koordination ein Sauerstoffmolekül (rot). Die in den  $\alpha$ -Helices (rot/grau) lokalisierten Histidine (weiß/blau) binden die Cu-Ionen koordinativ an einem Stickstoffatom. [Das Bild wurde mit dem Programm MOLSCRIPT. [KRAULIS, 1991]

Jede Untereinheit der Hämocyanine besitzt ein aktives Zentrum aus zwei Cu-Atomen. Das aktive Zentrum ist ein Typ 3 Cu-Zentrum, d.h. es ist zweikernig und ESR-inaktiv. Jedes Cu-Atom ist über drei Histidine koordinativ an das Protein gebunden (Abb. 1.1-4). Das Sauerstoffmolekül wird reversibel zwischen den beiden Cu-Atomen in einer *side-on*  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Koordination gebunden. Der Sauerstoff oxidiert dabei die beiden Cu(I)-Ionen zu Cu(II)-Ionen und liegt selbst als Peroxid  $\text{O}_2^{2-}$  vor. Bei der Bindung verringert sich der Cu-Cu-Abstand von 4.6Å auf 3.2Å. Abgesehen von zwei axialen Histidinen liegen alle Bindungspartner in einer Ebene [HIROTA et al., 1998; HAZES et al., 1993; VOLBEDA & HOL, 1989; MAGNUS et al., 1994; BALDWIN et al., 1992; KITAJIMA et al., 1992].

### 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die Arthropoden sind ein sehr artenreicher und erfolgreicher Tierstamm. Ihnen ist es im Laufe der Evolution gelungen, fast alle Lebensräume zu Wasser, auf dem Land und in der Luft zu besiedeln. Die Erschließung so unterschiedlicher Biotope setzt eine sehr gute physiologische Anpassungsfähigkeit voraus. Das physiologisch wichtigste Problem, welches für jeden Lebensraum während der Evolution gelöst werden mußte, ist eine optimale Sauerstoffversorgung der Körperzellen bei allen Umweltbedingungen zu gewährleisten. Bei sehr kleinen Tieren mit einem sehr günstigem Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpervolumen, stellt dies kein Problem dar. Die  $\text{O}_2$ -Versorgung wird hier über Diffusion und physikalische Löslichkeit des Sauerstoffs in der Hämolymphe sichergestellt. Mit zunehmender Größe der Tiere muss die Transportkapazität an gelöstem Sauerstoff erhöht werden, dies wird mit einem  $\text{O}_2$ -Transportprotein, dem Hämocyanin, in der Hämolymphe erreicht.

Das Hämocyanin-Molekül liegt frei in der Hämolymphe vor und ist den chemisch/physikalischen Bedingungen direkt ausgesetzt. Bekannt ist, dass der pH sich sehr stark durch den Bohr-Effekt auf die  $\text{O}_2$ -Affinität des Hämocyanins auswirkt und der pH in der Hämolymphe wird wiederum durch den physikalischen Parameter Temperatur erheblich beeinflusst. Poikilotherme Tiere, wie z.B. Crustaceen als Invertebraten, passen ihre Körpertemperatur der Umgebungstemperatur an. Dies hat einen signifikanten Einfluss auf den pH der Hämolymphe, da diese zum größten Teil aus Wasser besteht. Da der Dissoziationsgrad des Wassers und damit der pH von der Temperatur abhängt, wird sich auch der pH der Hämolymphe entsprechend verhalten. Tatsächlich ist dies für verschiedene Tiere gezeigt worden [SCHMIDT & NIELSON]. Eine Pufferung hinsichtlich der Temperaturveränderung scheint nicht zu existieren, d.h. die funktionellen Eigenschaften von Proteinen werden beeinflusst. Ob es hier einen optimalen Bereich für diese Proteine gibt ist praktisch nicht bekannt, da in der Regel der pH bei den verschiedenen Temperaturen nachgestellt wird und somit sich zumindest die Ionenstärke der Hämolymphe verändert.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, inwieweit bei Hämocyaninen aus verschiedenen Arthropoden, die in unterschiedlichen Biotopen leben, eine biotopabhängige (temperaturabhängige) Adaptation der  $\text{O}_2$ -Versorgung (Proteinfunktion) auf Ebene des Hämocyanins stattgefunden hat.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Tiere

Sechs *Crustaceen* Arten und eine *Cheliceren* Art lieferten für die vorliegende Arbeit ihr Hämocyanin. Das Biotop und die Lebensweise wird im folgenden kurz skizziert, um auf dieser Informationsbasis das O<sub>2</sub>-Bindungsverhalten der Hämocyanin-Spezien besser zu verstehen. Die Angaben stammen aus dem URANIA TIERREICH, (1994):

#### ***Astacus astacus***

Familie: ***Astacidea***

Der geographische Siedlungsraum dieser Flusskrebsart erstreckt sich vom Ural bis nach Irland und Spanien. Es sind nachtaktive Tiere, die in Felshöhlen unterhalb der Wasserlinie leben und ein Alter von bis zu 25 Jahren erreichen können. Das Habitat sind sehr saubere und langsam fließende oder stehende Binnengewässer mit einer Wassertemperatur von maximal 20°C. Die männlichen Tiere erreichen eine Körperlänge von ca. 25 cm; die weiblichen Tiere sind etwas kleiner.

#### ***Calappa granulata***

Familie: ***Calappidea***

Bei diesem Tier handelt es sich um eine Krabbenart, die im gesamten Mittelmeerraum zu finden ist. Das Mesolitoral und Sublitoral (in 30 m bis 150 m Tiefe) mit sandigem Meeresboden und einer Wassertemperatur von 10°C bis 20°C, ist das Habitat dieser *Eubrachyura*-Art. Diese sehr beweglichen Tiere erreichen eine Körpergröße von ca. 8 cm.

#### ***Homarus americanus***

Familie: ***Nephropidea***

Der geographische Siedlungsraum dieser Hummer-Art ist der West-Atlantik von Labrador bis nach Carolina. Die Männchen werden bis zu 60 cm groß und sind deutlich größer als die weiblichen Tiere, die eine Körperlänge von ca. 37 cm erreichen. Das Mesolitoral (bis 30 m Tiefe) an felsigen Küsten mit einer Wassertemperatur von 10°C bis 15°C, dient diesem Tier als Lebensraum. Während des Sommers lebt diese Hummerart in Felshöhlen und geht in der Nacht auf Nahrungssuche. Mit Beginn des Winters ziehen sich die Tiere in tiefere Gewässer zurück und graben sich im sandigen Meeresboden ein. Der Hummer gehört zu einer phylogenetisch sehr alten Tiergruppe, die seit dem oberen Jura (vor ca. 180 Mio Jahren) durch Fossilien her bekannt ist.

#### ***Panulirus interruptus***

Familie: ***Palinuridea***

Die kalifornische Küste mit ihrem küstennahen kalten Auftriebswasser (Wassertemperatur 5°C bis 12°C) ist das geographische Siedlungsgebiet dieser Langustenart. Die Männchen erreichen eine Größe von ca. 45 cm, die kleineren Weibchen werden bis zu 32 cm groß. Das Litoral und Sublitoral felsiger Küsten mit dichtem Algenbewuchs, ist das angestammte Habitat dieser *Crustaceen*-Art. Als Unterschlupf während des Tages dienen Felshöhlen aus denen die Tiere in der Nacht zum Nahrungserwerb aufbrechen. Zu Beginn des Winters wandert *P. interruptus* bis zu 130 km an der Küste entlang, um weiter südlich wärmere Gewässer zu erreichen. Diese Gattung lässt sich an Hand von Fossilien bis zur Kreidezeit vor 130 Mio Jahren zurückverfolgen.

#### ***Paralithodes camtschatica***

Familie: ***Lithodidae***

Der geographische Verbreitungsraum dieser Steinkraben-Art ist der Nord-Pazifik. Der Carapax (Rückenschild) der männlichen Tiere erreicht eine Größe von bis zu 23 cm und mit Gliedmaßen eine Gesamtgröße von 120 cm. Die Weibchen sind dagegen deutlich kleiner als die Männchen. Diese Tiere sind Kaltwasserbewohner (3°C bis 10°C), die in arktischen Gewässer im Litoral zu finden sind. Weiter südlich im Pazifischen Ozean leben die Tiere bis zu einer Tiefe von 150 m. Ihr bevorzugtes Habitat ist sandiger bis schlickartiger Meeresgrund. Die Steinkraben sind aus der Verwandtschaft der Einsiedlerkrebse hervorgegangen und haben ihren Hinterkörper zum Schutz untergeschlagen

### ***Potamon potamios***

Familie: **Potamidea**

Die Mittelmeer Region ist für diese bis zu 10 cm großen Süßwasserkrabben das geographische Verbreitungsgebiet. Als Lebensraum dienen die fließenden Binnengewässer. Diese Tiere weisen eine amphibische bis terrestrische Lebensweise auf (Temperaturbereich 5°C bis 30°C). Auf der Mittelmeer Insel Kreta zum Beispiel wandern diese Krabben im Herbst während der Nacht in Weinberge, um sich von den reifen Weintrauben zu ernähren.

### ***Eurypelma californicum***

Familie: **Theraphosidea**

Die südliche USA und Mexiko ist das Hauptverbreitungsgebiet dieser Vogelspinnenart. Die Tiere erreichen eine Körpergröße von bis zu 8 cm, wobei die Männchen etwas größer sind als die Weibchen. Diese Spinnen leben in Erdröhren arider Gebiete mit einem Temperaturbereich von 5°C bis 40°C. Sie sind sehr träge und ortsgebunden. Es sind Jagdspinnen, die ihrer Beute während der Nacht vor ihrer Behausung auflauern. Das Gift dieser Spinnen-Art ist für den Menschen relativ ungefährlich. Die Weibchen haben eine Lebenserwartung von bis zu 20 Jahren. Für die Männchen wird eine Lebensspanne von ca. 8 Jahren berichtet.

### 2.1.1 Bezugsquellen der Tiere

Der Flusskrebs *A. astacus* wurde lebend von einer Flusskrebszucht in Bayern bezogen. Der Hummer *H. americanus* wurde lebend bei einem ortsansässigem Fischhändler (Fisch Jakob, Mainz) gekauft. Prof. E. Stratakis von der Universität Heraklion auf Kreta stellte die Hämolymphe aus *C. granulata* und *P. potamios* zu Verfügung. SEC aufgereinigtes Hämocyanin von *P. camtschatica* stammt aus dem Arbeitskreis von Prof. Beltramini an der Universität Padua in Italien in Zusammenarbeit mit russischen Wissenschaftlern. Von Prof. Beintema an der Universität Groningen in den Niederlanden wurde SEC gereinigtes Hämocyanin von der Langustenart *P. interruptus* zur Verfügung gestellt.

Die Vogelspinnen der Art *E. californicum* wurden von der Firma „North Carolina Biological Supply“ aus Charlotte in den USA bezogen und im Institut gehalten. Die Tiere leben bei 23°C in 20 x 30 x 30 cm (H x B x T) großen Plastikwannen, die mit einem feinmaschigem Drahtgitter abgedeckt sind. Der Wannenboden ist mit einer 2 bis 3 cm dicken Torfschicht bedeckt. Der Tag-Nacht-Wechsel erfolgte über die Raumbelichtung im 12 Stunden Rhythmus. Die Fütterung mit adulten Waldgrillen erfolgte alle ein bis zwei Wochen. Wasser stand den Spinnen jeder Zeit in ausreichender Menge zur Verfügung. Alle verwendeten Tiere waren erwachsene Individuen. Das Geschlecht der Tiere wurde bei der Hämolymphegewinnung nicht berücksichtigt. Die Halterung und die Gewinnung der Hämolymphe aus diesen Arthropoden ist gesetzlich angezeigt worden.

### 2.2 Gewinnung der Hämolymphe

Alle Hämolymphentnahmen erfolgten aus betäubten und auf Eis gelegten Tieren. Die Hämolymphe wurde bei den *Crustaceen* durch Punktieren des dorsal gelegenen Perikards entnommen. Hierzu wurde in einem flachen Winkel in Richtung des Kopfes eine Kanüle auf der Dorsalseite des Tieres am hinteren Ende des Carapax eingestochen und die Hämolymphe in einer Spritze aufgezogen. Die Hämolymphe wurde direkt in Zentrifugengläser überführt und eine Stunde zur Gerinnung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Mit einem gereinigten Spatel wurde die geronnene Hämolymphe in den Zentrifugengläser grob zerkleinert. Zur Abtrennung der Gerinnungsmatrix und Zellbestandteile von der Hämolymphe, wurde anschließend für 40 min bei 30000 g und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge L7, Beckmann, Rotor Ti60). Der Überstand mit dem enthaltenen Hämocyanin wurde mit 0.2% Natriumazid versetzt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Bei *E. californicum* wurde die Hämolymphe durch Punktion des ebenfalls dorsal gelegenen Perikards im Opisthosoma mit einer Kanüle gewonnen. Die heraustretende Hämolymphe wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und sofort 1:2 mit eisgekühltem *Eurypelma*-Puffer verdünnt und auf Eis gelagert. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei

## 2 MATERIAL & METHODEN

4°C und 15000g (Universal 16/16R, Hettich) wurden Zellreste und andere Verunreinigungen entfernt. Der Hämolympüberstand wurde dann unmittelbar mit Hilfe der Gelfiltration weiter aufgereinigt.

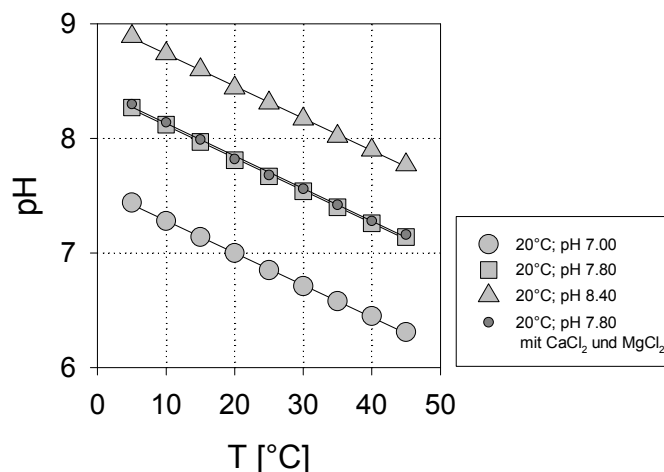
### 2.3 Verwendete Puffer

*Crustaceen* Puffer: 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.50 (20°C)  
20 mM CaCl<sub>2</sub>  
20 mM MgCl<sub>2</sub>

*Eurypelma* Puffer: 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.80 (20°C)  
5 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

Für die Versuche mit konstantem pH-Wert, wurden die gewünschten pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 oder 8.50) bei der jeweiligen Temperatur (10, 20 und 30°C) eingestellt. Bei den Versuchen mit variablem pH-Wert wurde der jeweilige Puffer bei 20°C auf die oben genannten Werte eingestellt und bei den sich verändernden Temperaturen (5, 10, 15, 20, 25 und 30°C) nicht nach korrigiert.

Die Änderung des pH-Werts in Abhängigkeit von der Temperatur ist bei den verwendeten TRIS-Puffersystemen sehr ausgeprägt und besitzt eine Größenordnung von  $\pm 0.028 \text{ pH} \cdot \text{K}^{-1}$  (Merck KGaA; Buffers for Bioprocessing).



**Abb. 2.3-1: Der pH-Verlauf von TRIS-HCl-Puffer in Abhängigkeit von der Temperatur.**

Der pH wurde bei 20°C jeweils auf 7.00, 7.80 und 8.40 eingestellt. Bei pH 7.80 wurde einmal mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> u. MgCl<sub>2</sub> und einmal ohne Kationen gemessen.

### 2.4 Präparation und Charakterisierung der Hämocyanine

#### 2.4.1 Gelfiltration der Crustaceen-Hämocyanine

Als Gelmatrix für die Gelfiltration der Crustaceen-Hämocyanine wurde das Toyopearl TSK HW 55(S) der Firma Tosoh Bioscience GmbH verwendet. Der Säulenkörper war ein XK-50 Gehäuse (Amersham Bioscience) und wurde an eine FPLC Anlage („Biologic Chromatography System“, Bio-Rad) angeschlossen. Die Proteinfractionen wurden mit einem Durchflussphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert und mit einem rechnergesteuerten Fraktionssammler (Modell 2128, Bio-Rad) aufgefangen. Ein Hämolympfvolumen von ca. 10 ml mit einer Proteinkonzentration von ca.  $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  wurde auf die Säule aufgegeben und mit einem konstanten Fluss von  $2.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  *Crustaceen*-Puffer eluiert. Das proteinhaltige Eluat wurde in 4 ml Fraktionen gesammelt. Die Gelfiltration der Hämolymphe erfolgte bei Raumtemperatur.

### 2.4.2 Gelfiltration des *Eurypelma*-Hämocyanins

Die abzentrifugierte Hämolymphe von *E. californicum* wurde auf einer Biogel 1.5M-Säule mit einem Durchmesser von 1.5 cm und einer Länge von 120 cm gravitationsgetrieben gereinigt. Das übliche Auftragsvolumen waren 2-3 ml Hämolymphe mit einer Proteinkonzentration von ca.  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die Flussrate lag zwischen  $15$  und  $18 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$  und die Gelfiltration wurde über Nacht im Kühlraum bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen mit einem Fraktionssammler (Modell 2110, Bio-Rad) aufgefangen. Die Hämocyaninkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (Hitachi U-3000) bestimmt.

### 2.4.3 Analytische Gelfiltration

Zur Abschätzung des Molekulargewichts und zur Überprüfung des Aggregationsgrades, der für die weiteren Versuche verwendeten Hämocyanine, wurde eine semi-analytische Gelfiltration durchgeführt. Die eingesetzte Säule, eine XK-16/60, war mit Sephadex S-300 als Gelmatrix (Amersham Biosciences) gefüllt. Betrieben wurde diese Säule mit dem zuvor schon beschriebenen FPLC-System. Die verschiedenen Hämocyaninspezies (6mer, 12mer, 24mer und 48mer) wurden einzeln auf die Säule gegeben und mit einem Fluss von  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Puffer eluiert. Die Probenmenge betrug jeweils 1 ml mit einer Hämocyanin-Konzentration von ca.  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### 2.4.4 Aufkonzentrierung und Dialyse der Hämocyaninproben

Die gesammelten Fraktionen wiesen nach der Gelfiltration eine geringe Hämocyaninkonzentration auf und mussten für  $\text{O}_2$ -Bindungskurven mit der Thin-Layer-Zelle und zur Reduzierung der Probenmengen konzentriert werden. Die Konzentrierung erfolgte mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten, mit einem Molekulargewichts Cut-Off von 30 kDa (UF15 Biomax 30K, Millipore) in einer Tischzentrifuge (Universal 16/16R, Hettich) mit einem Swingout-Rotor bei  $2500 \text{ g}$  und  $4^\circ\text{C}$ . Die Hämocyanin-Proben können mit diesen Ultrafiltrationseinheiten bis zu 30-fach konzentriert werden. Die aus Italien und den USA stammenden Hämocyanin-Proben wurden gegen *Crustaceen*-Puffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte mit Visking Dialyseschläuche (Serva) mit einer Ausschlussgrenze von 10-14 kDa bei  $4^\circ\text{C}$  unter ständigem Rühren für 24 Stunden gegen ein 1000-faches Puffervolumen. Nach 2-3 Stunden Dialyse wurde der Puffer einmal gewechselt.

### 2.4.5 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren der Hämocyaninspezies wurden mit einem zweistrahl Absorptionsspektrometer (Hitachi U-3000 oder Varian Cary 5E) zwischen 245 nm und 400 nm aufgenommen. Hierfür wurden Quarzküvetten (Hellma) mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet. Wenn notwendig, wurden die Hämocyaninproben vor der Messung verdünnt, so dass die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm kleiner als 1.5 war.

Ist der spezifische molekulare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{278}$ ) bekannt, kann die Proteinkonzentration einer Hämocyaninprobe mit Hilfe des Extinktionswertes bei 278 nm berechnet werden. In der Literatur ist für *H. americanus* ein  $\epsilon_{278}$  von  $1.385 \pm 0.045 \text{ [ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$  [NICKERSON & van HOLDE, 1971; RICHELLI, 1980] und für *A. astacus* ein  $\epsilon_{278}$  von  $1.425 \pm 0.145 \text{ [ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$  [HÜBLER et al., 1998] beschrieben. Für die Chelicerenart *E. californicum* wurde ein  $\epsilon_{278}$  von  $1.10 \text{ [ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$  [LOEWE et al., 1978] zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Das Absorptionsspektrum liefert auch Informationen über den nativen Zustand von Arthropoden-Hämocyaninen. Dazu werden zwei Extinktionsverhältnisse aus dem Absorptionsspektrum betrachtet:

- Das Verhältnis der Extinktion bei 280 nm zu der bei 250 nm sollte bei einem intakten Hämocyanin einen Wert von größer als zwei ergeben. Kleinere Werte weisen auf einen erhöhten Streulichtanteil hin, der durch denaturierte Hämocyaninmoleküle verursacht wird.

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

- Bei vollständiger Beladung mit Sauerstoff sollte das Verhältnis der Extinktion bei 280 nm zu der bei 340 nm erfahrungsgemäß einen Wert um die 4.5 ergeben. Größere Werte sind auf Schäden am aktiven Zentrum oder auf einen erhöhten Anteil von Begleitprotein zurückzuführen.

### 2.4.6 Native PAGE

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem in Anlehnung an LAEMMLI (1971) durchgeführt. Trenngel- und Sammelgelpuffer enthielten jeweils 250 mM TRIS-HCl, wobei der Trenngelpuffer auf pH 7.50 (20°C) und der Sammelgelpuffer auf pH 6.80 (20°C) eingestellt wurden. Der Laufpuffer bestand aus 25 mM TRIS-HCl und 600 mM Glycin bei einem pH zwischen 8.30-8.40. Für Trenn- und Sammelgel wurden homogene Polyacrylamidgele eingesetzt. Das Trenngel enthielt eine Acrylamidkonzentration (Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid) von 7.50 % und das Sammelgel enthielt 5 % Acrylamid. Beide Gele waren mit 0.80 % N,N'-Methylen-bisacrylamid quervernetzt. Das Sammelgel wurde pro Tasche mit 5 µg Protein beladen. Die Elektrophorese wurde in Minigelen bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zum Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, mit dem Übertritt der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel für 30 Minuten gefärbt (0.2 % (w/v) Serve Blue G, 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure), anschließend für 1 bis 2 Stunden entfärbt (25 % Ethanol, 10 % Essigsäure).

### 2.4.7 SDS-PAGE

Die SDS-Gelelektrophorese wurde im diskontinuierlichen Puffersystem nach LAEMMLI (1971) modifiziert von SEE & JACKOWSKI (1989) durchgeführt. Für das Trenngel wurde ein 375 mM TRIS-HCl Puffer mit pH 8.80 (20°C) verwendet, während der Sammelgelpuffer 125 mM TRIS-HCl mit pH 6.80 (20°C) enthielt. Der Laufpuffer hatte eine Konzentration von 25 mM TRIS-HCl und 600 mM Glycin bei einem pH zwischen 8.30-8.40 bei 20°C. Alle drei Puffer waren mit 0.10 % (w/v) SDS versetzt. Bei den verwendeten Trenngelen (Größe 10 cm \* 10 cm) handelte es sich um Polyacrylamidgele mit einem linearen Gradienten von 7.50 %-17.50 % Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid und einem kontinuierlichen Quervernetzungsgrad von 0.80 % N,N'-Methylen-bisacrylamid. Die Sammelgele (2 cm \* 10 cm) enthielten 3.90 % Acrylamid und besaßen einen Quervernetzungsgrad von 0.80 % N,N'-Methylen-bisacrylamid. Pro Sammelgeltasche wurden 2 µg Protein aufgegeben. Die Proteinproben wurden vorher für zehn Minuten bei 95°C in Denaturierungspuffer (1.25 % (w/v) SDS, 2.50 % β-Mercaptoethanol, 5 % Glycerin in 30 mM TRIS-HCl mit pH 6.80 (20°C) denaturiert. Die angelegte Spannung während der Migration der Proben durch das Sammelgel war 100 V, nach dem Übergang der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach der Elektrophorese wurden die Gele über Nacht in einer Färbelösung (0.2 % (w/v) Serve Blue G, 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure) gefärbt und danach mehrere Stunden in einer Entfärbelösung (25 % Ethanol, 10 % Essigsäure) entfärbt. Die SDS-PAGE wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein „High Molecular Weight Standard Mixture“ (Sigma) verwendet.

### 2.4.8 Temperaturstabilität der verwendeten Hämocyanine

Da das O<sub>2</sub>-Bindungsverhalten der Hämocyanine in einem Temperaturbereich von 5°C bis 30°C untersucht wurde, musste überprüft werden, wie stabil die einzelnen Hämocyaninspezies mit steigender Temperatur sind. Dazu wurden Absorptionsspektren in einem Temperaturintervall von 5°C bis 60°C aufgenommen. Hämocyaninprobenansätze mit ca. 1.2 mg\*ml<sup>-1</sup> wurden in Quarzküvetten (optische Weglänge 10 mm) gefüllt und schrittweise mit einem temperierbaren Küvettenhalter von 5°C auf 60°C erwärmt. Nach einer Äquilibrierungszeit von 5 Minuten bei der jeweiligen Temperatur wurde ein Absorptionsspektrum von 245 nm bis 400 nm gefahren (Hitachi U-3000). Bis 25°C stieg die



## 2 MATERIAL & METHODEN

---

Temperatur in 2°C-Schritten, über 25°C in 1°C-Schritten. Anhand der Verhältnisse der Extinktionswerte  $E_{280}/E_{250}$  bzw.  $E_{280}/E_{340}$  kann eine beginnende Denaturierung bzw. eine zunehmende Entladung des Hämocyaninmoleküls beobachtet werden. Durch Abkühlen auf 20°C der zuvor erwärmten Proben und Aufnahme eines Absorptionsspektrum, wurde überprüft, bis zu welcher Temperatur eine Entladung des aktiven Zentrums (Abnahme von  $E_{340}$ ) reversibel war.

### 2.4.9 EM-Aufnahmen

Zur Überprüfung des Aggregations- und Reinheitsgrades der verwendeten Hämocyaninlösungen wurden mit Hilfe eines 80 kV Transmissions-Elektronen-Mikroskops (Carl Zeiss EM-900) von allen Hämocyaninspezies EM-Bilder mit 50.000 facher Vergrößerung angefertigt. Von den Negativen (Kodak Electron Microscop Film, Estar Thick Base 4489) wurden zwei- bis dreifach vergrößerte sw-Abzüge (Agfa-Gevaert AG, Kontraststufe 3) entwickelt. Als Präparationstechnik wurde die „Standard Droplet Technique“ und das „Negative Staining“ [HARRIS, 1997] angewandt. Die Hämocyaninkonzentration sollte zwischen  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  und  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  betragen. Die Hämocyaninlösung wurde auf zuvor mit Kohlenstoff bedampfte (10-40 nm) und ionisierte Kupfer-Netzchen (400 Mesh) gebracht. Durch dreimaliges Spülen mit Aqua bidest wurde nicht absorbiertes Hämocyanin von den Kupfer-Netzchen herunter gewaschen. Die Negativfärbung erfolgte dann anschließend mit dem Negativkontaktrierungsmittel Uranylacetat (2% (w/v), pH 4.5). Die Negativkontrastierung ist eine indirekte Färbemethode für Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 kDa. Die „Farbmoleküle“, hier Uranylacetat, binden an geladenen AS-Seitenketten auf der Proteinoberfläche und in genügend großen Hohlräumen im Innern des Proteins [HARRIS, 1997]. Durch die Anlagerung von Schwermetallatomen (Uran) an das Protein, werden die Elektronen des Elektronenstrahls abgelenkt und erzeugen ein inverses Bild vom Protein auf der Filmplatte. Alle Materialien für die Probenpräparation wurden von der Firma Plano, W. Plannet GmbH in Marburg bezogen.

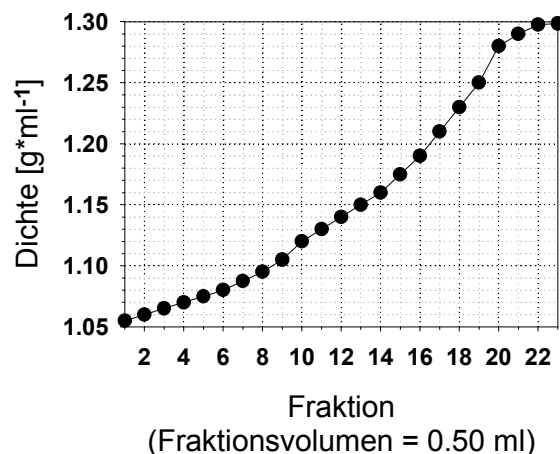
### 2.4.10 Lipoprotein-Isolierung aus der Hämolymphe

Die in der Hämolymphe enthaltenen Lipoproteine lassen sich mit einer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolieren. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurde eine KBr-Lösung verwendet. 2 ml Hämolymphe wurden mit 0.73 g KBr versetzt, um eine Dichte (Gewicht bezogen auf  $\text{H}_2\text{O}$ ) von  $1.23 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  zu erreichen. Diese 2 ml wurden dann in ein Zentrifugen-Proben-Behälter (*Ultra Clear; Fa. BECKMANN*) gefüllt, mit unterschiedlichen in der Dichte abnehmenden KBr-Lösungen und abschließend mit 0.5 M NaCl überschichtet. Folgende KBr-Lösungen wurden eingesetzt:

[ml]	[g*ml <sup>-1</sup> ]	[g] KBr
2.50	1.150	0.57
3.00	1.063	0.27
3.00	1.019	0.08

**Tab. 2.4-1: KBr-Lösungen** zur Dichtegradientenzentrifugation verschiedener Hämocyanine

Die befüllten Zentrifugenbehälter wurden anschließend für 18 Std. mit 40.000 rpm und 4°C in einem Swingout-Rotor (*SW-41; Fa. BECKMANN*) zentrifugiert (Zentrifuge: UZ L7, *BECKMANN*).



**Abb. 2.4-1: Typischer Dichteverlauf des KBr-Gradientens im Zentrifugenröhrchen.**  
Nach einer 18 stündigen Zentrifugation bei 4°C mit 40.000 rpm in einem Swing-Out-Rotor.

Die Lipoproteine sind nach der Zentrifugation gut als gelbe bis orange Banden im KBr-Gradienten zu erkennen. Von oben beginnend wurden 0.5 ml Aliquote entnommen und die UV/VIS-Spektren von 245 nm bis 500 nm der einzelnen Fraktionen aufgenommen. Die Fraktionen mit Lipoprotein und Hämocyanin wurden dann über Nacht bei 4°C gegen TRIS-HCl Puffer (pH 7.50 (20°C), 20 mM Ca<sup>2+</sup> u. Mg<sup>2+</sup>) mit einem Volumenverhältnis von 1:1000 dialysiert. Die so aufbereiteten Proben wurden zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlraum gelagert.

## 2.5 Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven

Die Bindung von O<sub>2</sub> an Hämocyanin wurde während dieser Arbeit mit zwei Methoden untersucht. Mit der einen Methode lassen sich kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven aufzeichnen, diese wird als die fluorometrisch-polarographische Methode nach LOEWE (1978) bezeichnet. Die andere Aufzeichnungsmethode liefert diskontinuierliche O<sub>2</sub>-Bindungskurven und wurde mit Hilfe einer optischen „Thin Layer“-Zelle [DOLMAN & GILL, 1978 und GILL, 1981], auf der Grundlage der Absorptionsänderung bei 340 nm in Abhängigkeit vom Oxygenierungsgrades des Hämocyaninmoleküls aufgenommen.

### 2.5.1 Kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven

Bei dieser Methode macht man sich die lineare Fluoreszenzzunahme mit zunehmender Deoxygenierung des Hämocyaninmoleküls zu nutze. Die Anregung erfolgte bei 280 nm unter Verwendung eines Interferenzfilters (Eppendorf), das emittierte Fluoreszenzlicht oberhalb von 310nm, wurde im rechten Winkel nach Durchtritt eines Kantenfilters (normales 4 mm Fensterglas) mit einem Elektronenvervielfacher detektiert. Um einen Innerfiltereffekt zu vermeiden, muss die Hämocyaninlösung eine Konzentration unterhalb von 0.2 mg\*ml<sup>-1</sup> besitzen. Dieser Konzentrationsbereich entspricht einer OD<sub>340</sub> von 0.025-0.05, d.h. die Reabsorption des emittierten Lichtes ist sehr gering, so dass kein Innerfiltereffekt zu erwarten ist. Die Anregungsquelle des Fluorimeters (Farrand) war eine Xenon-Dampflampe (Osram). Eine 1 cm<sup>2</sup> Quarzküvette mit 600 µl Hämocyaninlösung in einen temperierbaren Küvettenhalter wurde in die Probenkammer des Fluorimeters gestellt. Der Raum in der Küvette oberhalb der Probenlösung wurde dann mit 100% Sauerstoff bis zur Sättigung der Lösung geflutet und anschließend mit 100% Stickstoff begast. Der Stickstoff verdrängt kontinuierlich den in der Probenlösung gelösten Sauerstoff entsprechend der

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

Partialdruckverhältnisse. Mit zunehmender Deoxygenierung des Hämocyanins nahm die Fluoreszenzintensität zu und konnte mit einem X-Y-Schreiber (Houston Omnigraphic Model 2000 X-Y) aufgezeichnet werden. Die Y-Achse zeichnete das Fluoreszenzsignal und die X-Achse den Sauerstoffpartialdruck auf. Die Sauerstoffkonzentration in der Probenlösung wurde mit einer Clark-Elektrode (Bachhofer), die mit einer 6  $\mu\text{m}$  starken Teflonmembran bezogen war, gemessen. Um einen Kalibrierungspunkt zwischen 100% und 0% Sauerstoffpartialdruck auf der X-Achse festzulegen, wurde nach Erreichen der 0% Sauerstofflinie mit einem 5%  $\text{O}_2$ -Prüfgas kalibriert. Der Sauerstoffpartialdruck konnte mit dieser Apparatur auf  $\pm 0.5$  Torr genau bestimmt werden, die relative Sauerstoffsättigung des Hämocyaninmoleküls auf  $\pm 0.5\%$ .

### 2.5.2 Diskontinuierliche Sauerstoffbindungskurven

Diese Methode bietet die Möglichkeit Sauerstoffbindungskurven von hochkonzentrierten Hämocyanin- oder Hämolympplösungen aufzunehmen. Gemessen wird die Absorptionsänderung bei 340nm in Abhängigkeit von der  $\text{O}_2$ -Beladung des Hämocyaninmoleküls. Der Einsatz einer so genannten „Thin-Layer“ Zelle ermöglicht die Absorptionsmessung von Hämocyaninlösungen mit einer Schichtdicke von 25  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$ . Mit diesen geringen Schichtdicken lassen sich Hämocyaninlösungen mit über 60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  messen. Die Hämocyaninschicht befindet sich zwischen einer Quarzglasscheibe und einer 12  $\mu\text{m}$  starken UV/VIS transparenten, gaspermeablen Membran (Fa. YSI). Mit einem oder mehreren (maximal 4) 25  $\mu\text{m}$  dicken Abstandsringsen wird die gewünschte Schichtdicke eingestellt. Über die Membran besteht Kontakt zu einem Gasraum, der mit Sauerstoff, Stickstoff oder einem genau definiertem Gemisch aus beiden Gasen geflutet werden kann. Der exakte  $\text{O}_2$ -Partialdruck im Gasraum vor der Membran wird mit Hilfe einer  $\text{O}_2$ -Clark-Elektrode bestimmt. Die Messzelle ist so konstruiert, dass der optische Weg im rechten Winkel zum Quarzglas und der dahinter liegenden Hämocyaninschicht verläuft. Anschließend gelangt das Licht durch den Gasraum und einem weiteren Quarzglas zum Detektor des Photometers. Nach jedem neuen Befluten des Gasraums kann nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen Gasraum und Hämocyaninprobe online auf dem Monitor des Photometers (abhängig vom  $\text{O}_2$ -Partialdruck) eine Zu- oder Abnahme der Absorption bei 340 nm beobachtet werden. Der Zellblock wird mit einem temperierbaren Wasserbad auf die gewünschte Messtemperatur eingestellt. Gasbefeuchter erreichen bei den verwendeten Gasen eine Absättigung mit Wasserdampf, um ein Eintrocknen der Hämocyaninproben zu verhindern. Die Halterung mit der optischen Zelle und der  $\text{O}_2$ -Elektrode befindet sich in einem Doppelstrahl-Photometer CARY 5E (Fa. VARIAN).

## 2.6 Theorie

### 2.6.1 Analyse der Sauerstoffbindungskurven

Die aufgezeichneten Bindungskurven werden analysiert, in dem die Parameter des MWC-Modells bzw. des Nesting-Modells mit Hilfe eines Rechners (ATARI ST 1040) solange iterativ variiert werden, bis die gemessene und die berechnete Sauerstoffbindungskurve gut übereinstimmen. Die im Experiment ermittelten Sauerstoffpartialdrücke werden als Ligandenaktivitäten  $x$  in das Bindungspolynom des jeweiligen Modells eingesetzt.

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

Wegen möglichen versuchsbedingten Ungenauigkeiten hinsichtlich einer vollständigen Oxygenierung bzw. Deoxygenierung der Probe wird das gemessene spektroskopische Signal nach folgender Gleichung korrigiert [MARDEN et al., 1990]:

$$A(x) = \bar{X} \times [A(\infty) - A(0)] + A(0)$$

$A(0)$  und  $A(\infty)$  sind die Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte in Abwesenheit von Sauerstoff bzw. bei vollständiger Sauerstoffsättigung.

Die Analysensoftware benutzt die Methode der kleinsten Quadrate, wobei ein von MARQUARDT (1963) entwickelter und von GILL et al. (1987) modifizierter „non-linear least-square“-Algorithmus zur Anwendung kommt. Dieser Algorithmus minimiert die Varianz  $\sigma^2$  (=Quadrat der Standardabweichung eines Punktes) mit der Definition:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N - M} \times \left( \sum [A^{calc}(x_i) - A^{exp}(x_i)]^2 \right)$$

$N$  ist die Anzahl der nach dem digitalisieren der Bindungskurve eingelesenen Datenpunkte,  $M$  ist die Zahl der gefitteten Parameter des jeweiligen Modells. Durch die Festlegung eines Konvergenzkriteriums (Abbruchkriterium) wird der Optimierungsvorgang abgebrochen. Als Kriterium ist vorgegeben:

$$\frac{\sigma_i - \sigma_{i-1}}{\sigma_i} < 10^{-5}$$

Hierbei  $i$  ist die Anzahl der Programmdurchläufe.

### 2.6.2 Die Modelle

In der Literatur finden sich mehrere Modelle, die die molekularen Prinzipien von Allosterie und Kooperativität bei oligomeren Proteinen zu beschreiben versuchen. Grundsätzlich lassen sich diese Modelle in zwei Klassen unterteilen:

- das MWC-Modell [MONOD et al., 1965], ein konzertiertes Modell
- das KNF-Modell [KOSHLAND et al., 1966], ein sequenzielles Modell

Beiden gemeinsam ist die Annahme, dass die Untereinheiten der oligomeren Proteine in verschiedenen Konformationen vorliegen können, die sich in ihrer Affinität zum Liganden unterscheiden. Im Falle des Hämocyanins ist in dieser Arbeit der Ligand molekularer Sauerstoff.

#### 2.6.2.1 Das sequenzielle Modell

Durch die Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum einer Untereinheit kommt es zu einer Konformationsänderung dieser Untereinheit. Dadurch werden benachbarte Untereinheiten in ihrer räumlichen Struktur beeinflusst und somit deren Affinität zum Liganden verändert. Die Bindung weiterer Liganden führt zu weiteren Konformationsänderungen der Untereinheiten. Die Affinität der noch unbesetzten Bindungszentren wird dadurch erhöht. Allosterische Effektoren beeinflussen so die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten. Sie erhöhen oder erniedrigen auf diese Weise die Affinität des aktiven Zentrums zum Liganden. Das populärste sequenzielle Modell ist das KNF-Modell von KOSHLAND, NEMETHY und FILMER (1966). Für große Proteine, wie das Hämocyaninmolekül, sind sequenzielle Modelle zur Beschreibung des Bindungsverhalten, aufgrund einer sehr großen Zahl verschiedener Bindungsparameter nicht einsetzbar. In einem oligomeren Proteinkomplex müssen alle Wechselwirkungsbeziehungen zwischen den einzelnen Untereinheiten berücksichtigt werden, um ein sequenzielles Modell korrekt anwenden zu können. Bindet ein Ligand nacheinander (sequenziell) an die einzelnen Untereinheiten eines oligomeren Proteins, so

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

existiert nach jeder Bindung eine neue Konformation mit einer eigenen Bindungskonstante. Der Nachweis so vieler Konformationen ist in der Praxis kaum möglich.

### 2.6.2.2 Das konzertierte Modell

Im Gegensatz zu dem sequenziellen Modell wird bei dem konzertierten Modell davon ausgegangen, dass ein oligomeres Protein auch bei Abwesenheit eines Liganden in mindestens zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Die hoch affine Konformation wird mit einem „R“ (relax) und die niedrig affine Konformation wird mit einem „T“ (tense) bezeichnet. Konformationsübergänge werden von mehreren Untereinheiten gleichzeitig (konzertiert) durchgeführt, wobei die Symmetrie des oligomeren Proteins erhalten bleibt. Die Untereinheiten, die solch einen Konformationsübergang gemeinsam durchführen, werden als eine *allosterische Einheit* bezeichnet. Zu einer allosterischen Einheit können alle oder nur ein Teil der Untereinheiten eines Oligomers gehören. Ist kein Ligand vorhanden, so liegt die T-Konformation in großem Überschuss vor. Die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_o$  beschreibt das Verhältnis der T- und R-Konformationen bei Abwesenheit eines Liganden, ( $L_o = [T_o] / [R_o]$ ). Für  $L_o$  gilt daher immer ein Wert, der viel größer als „1“ ist. Ein Ligand mit einer geringen Konzentration trifft daher vorwiegend auf eine  $T_o$ -Konformation. Mit zunehmender Ligandenkonzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass der Ligand auch an eine  $R_o$ -Konformation bindet. Durch die Bindung an die  $T_o$ - oder  $R_o$ -Konformation wird das allosterische Gleichgewicht ( $L_o$ ) der ligandfreien  $T_o$ - und  $R_o$ -Konformationen verschoben. Bindet ein Ligand an eine der beiden Konformationen, so wird die Konzentration an  $T_o$  oder  $R_o$  um eine allosterische Einheit verringert. Da die  $T_o$ -Konformation in einem großen Überschuss vorliegt, wirkt sich eine Änderung der  $T_o$ -Konzentration kaum auf das allosterische Gleichgewicht aus. Ganz anders sieht es für die wenigen  $R_o$ -Konformationen aus: wird hier eine  $R_o$ -Konformation durch Bindung eines Liganden aus dem  $R_o$ -Pool herausgenommen, so kommt es durch die Umwandlung einer  $T_o$ -Konformation in eine  $R_o$ -Konformation zur Wiederherstellung des allosterischen Gleichgewichts. Besteht eine allosterische Einheit aus sechs Untereinheiten mit sechs Bindungsstellen, wie bei einem hexameren Hämocyanin, so werden durch die Bindung eines Liganden an eine  $R_o$ -Konformation eine hochaffine Bindungsstelle besetzt. Gleichzeitig werden aber sechs neue hochaffine Bindungsstellen durch die Umwandlung einer  $T_o$ -Konformation in eine  $R_o$ -Konformation geschaffen. Die Bindungsaffinität für die nächsten Liganden wird somit erhöht. Das konzertierte Modell setzt das Vorhandensein mehrerer Konformationen voraus. Die verschiedenen Konformationen stehen bei Abwesenheit eines Liganden in einem bestimmten, molekülspezifischen Konzentrationsverhältnis zueinander. Wichtig ist, dass die Liganden keinen Konformationsübergang induzieren, sondern die Konformation an die sie binden stabilisieren. Auch der Einfluss von Effektoren lässt sich mit einem konzertierten Modell plausibel erklären. Inhibitoren binden folglich bevorzugt an die niedrigaffine T-Konformation und stabilisieren diese zusätzlich, die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_o$  wird dadurch erhöht. Aktivatoren stabilisieren hingegen die R-Konformationen und  $L_o$  wird somit erniedrigt. Die Wirkung von Protonen auf die Sauerstoffbindung von Vertebraten-Hämoglobin und Arthropoden-Hämocyanin lässt sich auf diese Weise erklären. Das bekannteste konzertierte Modell wurde in den 60er Jahren von MONOD, WYMAN und CHANGEUX entwickelt und wird als MWC-Modell bezeichnet [MONOD et al., 1965].

Bei einigen allosterischen und kooperativen Enzymen wie der Glycogen-Phosphorylase, der Phosphofruktokinase und der Aspartat-Transcarbamylase, konnten allosterische und kooperative Eigenschaften durch Anwendung des MWC-Modells hinreichend beschrieben werden [PERUTZ, 1989; BARFORD und JOHNSON, 1990; SCHIRMER und EVANS, 1990; KANTROWITZ und LIPSCOMB, 1990; MOZZARELLI et al., 1991]. Auch das Bindungsverhalten des hexameren Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* konnte mit dem MWC-Modell sehr gut charakterisiert werden [CONNELLY et al., 1989]. Dagegen konnte die Funktion einiger anderen hexameren Hämocyaninen nicht immer mit dem einfachen MWC-Modell erklärt werden [MAKINO, 1986].

Die höher aggregierten Hämocyanine (d.h. ab den 2 x 6-mere) lassen sich in ihrem Sauerstoffbindungsverhalten allerdings nicht mehr mit dem einfachen MWC-Modell

beschreiben [DECKER et al., 1983; RICHEY et al., 1985; JOHNSON et al., 1988; BROUWER und SERIGSTAD, 1989]. Diese Unzulänglichkeit des MWC-Modells für höher komplexierte Hämocyanine führte zu einer Reihe von weiteren Modellen, die sich teilweise deutlich voneinander unterscheiden. Ohne näher auf die ersten vier Modelle einzugehen, lassen sich folgende Modelle nennen: das Three-State MWC-Modell [MINTON und IMAI, 1974], das Cooperon-Modell [COLTTA et al., 1986], das Inter-Cooperative—Units (ICU)-Modell [BROUWER und SERIGSTAD, 1989], das Statistische Thermodynamische Modell [DI CERA, 1990] und als fünftes das Nesting-Modell [Decker et al., 1986; ROBERT et al., 1987]. Da die untereinander eng verwandten Arthropoden-Hämocyanine eine sehr ähnliche Tertiär- und Quartärstruktur aufweisen [MARKL et al., 1986; MAGNUS et al., 1991; MARKL und DECKER, 1992; BEINTEMA et al., 1994; van HOLDE und MILLER, 1995], kann davon ausgegangen werden, dass auch die Funktion, also das Sauerstoffbindungsverhalten, auf ähnlichen Prinzipien beruht.

### 2.6.2.3 Das Nesting-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse der Hämocyanin Bindungsdaten das Nesting-Modell verwendet. Die Grundlage für dieses Modell bildet das MWC-Modell und wurde nach Vorstellungen von WYMAN (1972, 1984) entwickelt. Wie in dem einfachen MWC-Modell ist die Größe der allosterischen Einheit ein von der Struktur des Hämocyaninmoleküls vorgegebener Parameter. Weder der Sauerstoffbeladungsgrad noch Effektoren haben einen Einfluss auf das Ausmaß der allosterischen Einheit. Für das Arthropoden-Hämocyanin wird der kleinste strukturell identische Proteinbaustein in der Quartärstruktur als eine allosterische Einheit bezeichnet. Bei den aus zwölf Untereinheiten aufgebauten (12-mer) *Crustaceen*-Hämocyanin bildet das 6-mer und bei den 24-mer *Cheliceraten*-Hämocyaninen das 12-mer eine allosterische Einheit [DECKER & STERNER, 1990]. Diese Einheiten werden jetzt nicht isoliert betrachtet, sondern sind in das Gesamtmolekül eingebettet („genestet“) und können miteinander über strukturelle Verknüpfungen in Wechselwirkung treten. Diese strukturelle Verknüpfung der beiden Halbmoleküle kann auf wenigstens zwei etwas unterschiedliche Arten erfolgt sein, so dass der Gesamtzustand des Moleküls einmal die T-Konformation oder die R-Konformation ist. Die beiden Konformationen befinden sich in einem Gleichgewicht, welches durch die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_o = [T_o]/[R_o]$  beschrieben wird. Der R- oder T-Zustand des Gesamtmoleküls legt fest, welche untergeordneten Konformationen die Halbmoleküle (allosterische Einheiten) innerhalb des Oligomers annehmen können. Für den R-Zustand sind das eine rR- oder tR-Konformation und für den T-Zustand eine rT- oder tT-Konformation. Liegt ein Halbmolekül in der rR-Form vor, so kann das andere Halbmolekül nur in der rR-Form oder in der tR-Form vorliegen, nicht aber die rT- oder die tT-Konformation annehmen. Gleiches gilt für den übergeordneten T-Gesamtzustand des Moleküls mit den möglichen Konformationen: rT und tT. Effektoren können daher beim Nesting-Modell auf zwei Quartärstrukturebenen wirken. Einmal auf der Ebene der allosterischen Einheiten (Halbmoleküle) und einmal auf der Ebene des Gesamtmoleküls. Durch die Einführung zusätzlicher Konformationen beim Nesting-Modell gibt es insgesamt drei allosterische Gleichgewichtskonstanten:  $l_{R_o} = [tR_o]/[rR_o]$ ,  $l_{T_o} = [tT_o]/[rT_o]$  (für die Halbmoleküle) und  $L_o = [T_o]/[R_o]$  (für das Gesamtprotein). Effektoren beeinflussen durch eine gezielte Stabilisierung der Konformationen auf der Halbmolekülebene die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_o = [T_o]/[R_o] = ([tT_o] + [rT_o])/([tR_o] + [rR_o])$ . Man kann daher von einer Hierarchie allosterischer Gleichgewichte beim Nesting-Modell sprechen. Allosterische Effektoren haben dadurch die Möglichkeit eine Feinabstimmung des Sauerstoffbindungsverhalten von höher aggregierten (ab Dodekamere) Arthropoden-Hämocyaninen zu gewährleisten.

Mit dem MWC-Modell lässt sich die Funktion von hexameren Arthropoden-Hämocyaninen (z.B. *Panulirus interruptus*) ausreichend erklären und beschreiben [CONNELLY et al., 1989]. Bei den höher molekularen Hämocyaninen, wie dem 12-mer aus dem amerikanischen Hummer *Homarus americanus* und dem 24-mer der Vogelspinnenart *Eurypelma californicum* konnte das Bindungsverhalten am besten mit dem Nesting-Modell beschrieben

## 2 MATERIAL & METHODEN

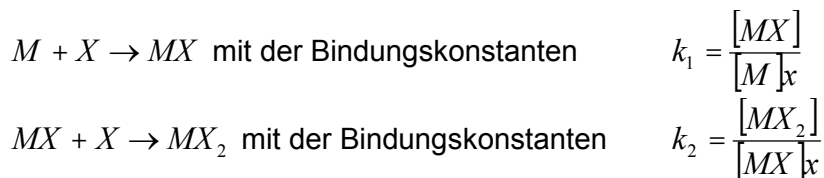
---

werden [DECKER et al., 1988; DECKER & STERNER, 1990]. Mittlerweile konnte mit Hilfe des Nesting-Modells das O<sub>2</sub>-Bindungsverhalten weiterer Hämocyane gut simuliert werden [van HOLDE & MILLER, 1995].

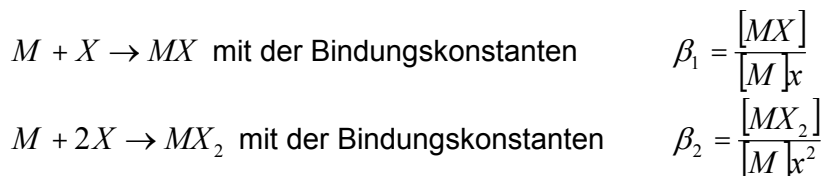
### 2.6.3 Das Bindungspolynom

Die Funktion und die Eigenschaften eines Liganden bindenden Makromoleküls kann durch seine Bindungsreaktion beschrieben werden. Die im Experiment aufgenommenen Bindungskurven repräsentieren die gebundene Menge des Liganden in Abhängigkeit verschiedener Ligandenkonzentrationen. Im Falle des Hämocyans ist der Ligand der molekulare Sauerstoff. Um eine quantitative Analyse der Bindungskurven durchführen zu können, betrachtet man die Bindung als eine reversible Gleichgewichtsreaktion, die mit dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden kann. Im folgenden soll die Wechselwirkung eines Liganden  $X$  mit einem Makromolekül mit zwei von einander unabhängigen Bindungsstellen beispielhaft hergeleitet werden.

Für solch ein Makromolekül ( $M$ ) existieren zwei Bindungsreaktionen mit den jeweiligen Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_2$ . Die Bindungsreaktionen lauten:



Die Beladung des Makromoleküls kann neben diesem schrittweisen Bindungsprozess auch als ein Einschrittprozess beschrieben werden:



Die Einschritt-Bindungsreaktion steht über die Bindungskonstanten aus der Zweischnitt-Bindungsreaktion wie folgt in Beziehung:

$$k_1 = \beta_1 \quad \text{und} \quad k_1 \cdot k_2 = \beta_2$$

Das Verhältnis von gebundener Menge  $X$  in mol an das Makromolekül ( $M$ ) zu der Gesamtkonzentration von  $M$  (alle Makromolekülspezies) gibt den Beladungsgrad  $\bar{X}$  an.

$$\bar{X} = \frac{[MX] + 2[MX_2]}{[M] + [MX] + [MX_2]} \quad (1)$$

Der Faktor 2 im Zähler erscheint, weil zwei Mol  $X$  für ein Mol  $MX_2$  gebraucht werden. Durch Umformen und Einsetzen unter Verwendung der Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  kann die Zweischnitt-Bindungsreaktion wie folgt beschrieben werden:

$$\bar{X} = \frac{k_1 x + 2 k_1 k_2 x^2}{1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2} \quad (2)$$

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

Daraus ergibt sich demnach für die Einschnitt-Bindungsreaktion:

$$\bar{X} = \frac{\beta_1 x + 2\beta_2 x^2}{1 + \beta_1 x + \beta_2 x^2} \quad (3)$$

Die beiden oben aufgeführten Gleichungen ergeben das Ausmaß der Bindung von  $X$  an das Makromolekül, ausgedrückt durch die Aktivität (Konzentration) von  $X$  und den Bindungskonstanten. Überträgt man die Bindungskurven in den Hill- oder Scatchard-Plot lassen sich die Bindungskonstanten näherungsweise bestimmen [WYMAN & GILL, 1989].

Die Bindungsreaktionen lassen sich auch durch eine sogenannte Zustands-Summen-Funktion darstellen. Diese Funktion ist die Summe der Konzentrationen aller möglichen Makromolekülspezies (mit und ohne Liganden) dividiert durch die Konzentration der unbesetzten Makromoleküle. In der Formelschreibweise sieht die Zustands-Summen-Funktion ( $Q$ ) wie folgt aus:

$$Q = \frac{[M] + [MX] + [MX_2] + \dots}{[M]}$$

Dieser Ausdruck entspricht dem Nenner der zuvor genannten Gleichung (1). Die Zustands-Summen-Funktion kann daher auch durch die Bindungskonstanten ausgedrückt werden:

$$Q = P = 1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2 = 1 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$$

Diese Gleichungsform ist ein Polynom von  $x$  und wird als ein Bindungspolynom mit dem Buchstaben  $P$  bezeichnet. Die Ableitung des Bindungspolynoms ( $\ln(P)$ ) nach  $\ln(x)$  ergibt dann wieder die Bindungskurve bzw. den Beladungsgrad  $\bar{X}$ . Ein Bindungspolynom für zwei Bindungsstellen wird wie folgt differenziert:

$$\bar{X} = \frac{d \ln(1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2)}{d \ln(x)} = \frac{x}{1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2} \times \frac{d(1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2)}{d(x)} = \frac{k_1 x + 2k_1 k_2 x^2}{1 + k_1 x + k_1 k_2 x^2}$$

Das Ergebnis dieser Ableitung ist die Gleichung (2) von Seite 17.

Werden komplizierte Modelle zur Beschreibung einer Bindungsreaktion von einem Liganden an ein Makromolekül eingesetzt, dann ist die Verwendung von Bindungspolynomen zur mathematischen Beschreibung einer Sättigungsfunktion eine erhebliche Erleichterung.

Das Bindungspolynom für das MWC-Modell, welches zur Analyse des hexameren *Panulirus interruptus* Hämocyanin verwendet wurde, setzt sich wie folgt zusammen:

$$P = \frac{1}{1 + L_o} \times (1 + k_R x)^6 + \frac{L_o}{1 + L_o} \times (1 + k_T x)^6$$

Es sind  $k_R$  und  $k_T$  die Bindungskonstanten der beiden im MWC-Modell möglichen Konformationen und  $L_o$  die allosterische Gleichgewichtskonstante. Der Wert 6 gibt die Größe der allosterischen Einheit an.



## 2 MATERIAL & METHODEN

---

Das Nesting-Modell zur Beschreibung der Sauerstoffbindung an das Hämocyanin aus einigen Crustacea- und Chelicerata-Arten kann mit folgendem Bindungspolynom beschrieben werden [ROBERT et al, 1987; DECKER & STERNER, 1990]:

$$P = \frac{1}{1 + L_o} \times (P^{N'}_{R,N-mer}) + \frac{L_o}{1 + L_o} \times (P^{N'}_{T,N-mer})$$

$P_{R,N-mer}$  und  $P_{T,N-mer}$  sind die Bindungspolynome für die allosterischen Einheiten ( $N=6$  für die Crustaceen Hämocyanine und  $N=12$  beim *E. californicum* Hämocyanin), wenn das Gesamtmolekül in der R- bzw. in der T-Konformation vorliegt.  $N'$  ist die Zahl der gekoppelten allosterischen Einheiten. Für die hier untersuchten Hämocyanine besitzt  $N'$  einen Wert von 2 und  $L_o$  ist gegeben durch  $[T_0]/[R_0]$ . Die zu Beginn dieses Absatzes genannten Bindungspolynome  $P_{R,N-mer}$  und  $P_{T,N-mer}$  lauten:

$$P_{R,N-mer} = \frac{1}{1 + l_{R,o}} \times (1 + k_{rR}x)^N + \frac{l_{R,o}}{1 + l_{R,o}} \times (1 + k_{iR}x)^N$$

$$P_{T,N-mer} = \frac{1}{1 + l_{T,o}} \times (1 + k_{rT}x)^N + \frac{l_{T,o}}{1 + l_{T,o}} \times (1 + k_{iT}x)^N$$

Es sind  $k_{rR}$ ,  $k_{iR}$ ,  $k_{rT}$  und  $k_{iT}$  die Bindungskonstanten der vier postulierten Konformationen und  $l_{R,o}$  sowie  $l_{T,o}$  die allosterischen Gleichgewichtskonstanten auf der Ebene der allosterischen Einheiten. Der Buchstabe  $N$  steht für die Größe der allosterischen Einheit.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Bestandteile der Arthropoden Hämolymphe

Das Hämocyanin als respiratorisches Protein macht mit ca. 80% den Hauptteil der Hämolympheproteine bei vielen Arthropoden und Mollusken aus. Neben dem Hämocyanin lassen sich ein nichtrespiratorisches Protein (NRP), verschiedene Lipoproteine und eine Vielzahl anderer Proteine isolieren. Gelelektrophoretisch konnten z.B. in der Molluskenhämolymphe bis zu zwanzig und mit der 2D-Elektrophorese bis zu sechzig Proteine nachgewiesen werden [ALLEN und CONLEY, 1982; KANIA et al., 1980]. In der Hämolymphe (HL) der Crustaceenart *Cancer magister* wurden eisenbindende Proteine (Transferrine) beschrieben, bei dem Xiphosuren *Limulus polyphemus* wurden C-reaktiv ähnliche Proteine (CRP) isoliert und näher charakterisiert [NGUYEN et al., 1986a; 1986b]. Auch Gerinnungsproteine finden sich in der Hämolymphe zahlreicher Crustaceen, so wurde bei *Panulirus interruptus* ein in der HL gelöstes sgn. Coagulogen (ähnlich dem Fibrinogen bei Säugern) mit einer  $M_r$  von 420 kDa isoliert [AKETAGAWA et al., 1986; GHIDALIA et al., 1981; SPURLING, 1981; TOKUNAGA et al., 1987].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die HL der Arthropoden eine Vielzahl von Proteinen aufweist, die entweder zum Stofftransport, zur Abwehr oder Gerinnung eingesetzt werden. Die totale Proteinkonzentration in der Hämolymphe kann je nach Tierart und Entwicklungsstadium 1 bis 200  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  betragen. In ihrer Gesamtheit tragen die HL-Proteine auch zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und zur Pufferung der HL bei [URICH, 1991].

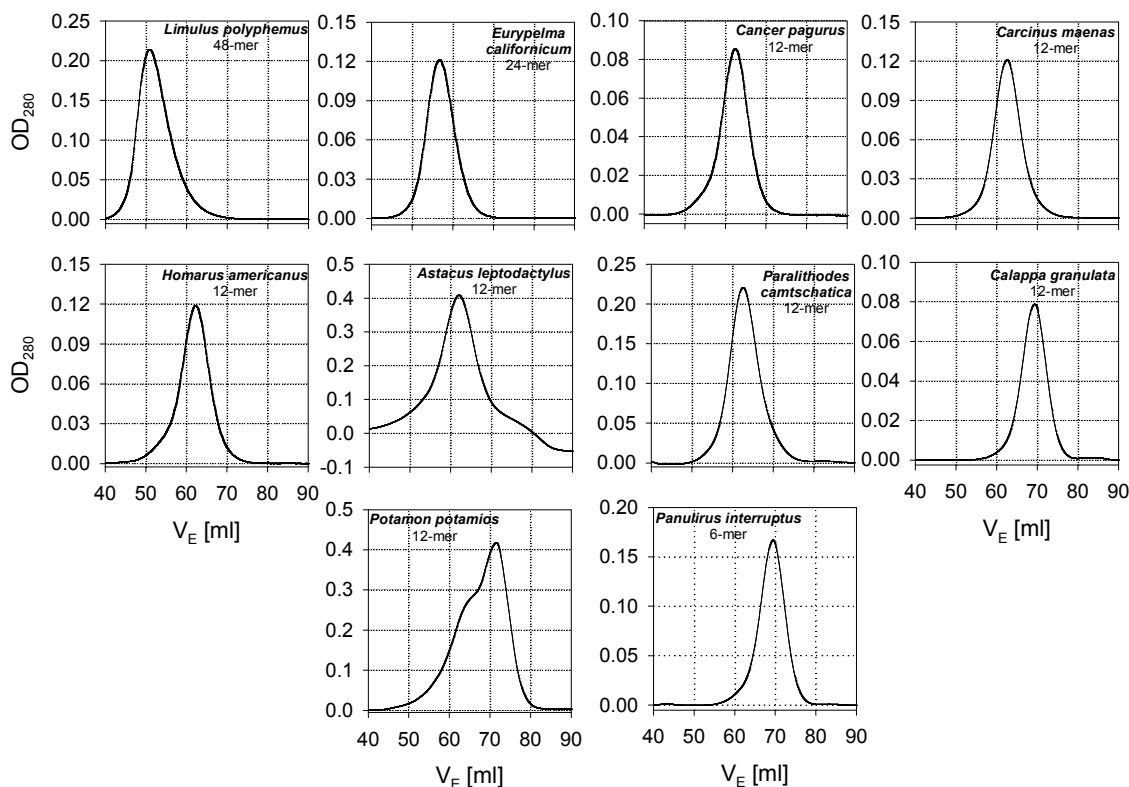
#### 3.2 Charakterisierung der Hämocyanine

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Hämocyanine wurde die Gelfiltrationschromatographie (SEC), die native Gelelektrophorese (PAGE) und die Lichtstreuung eingesetzt. Es zeigte sich, dass die  $M_r$ -Bestimmung mit den zuvor aufgeführten Methoden mit einem Fehler von mindestens 10% behaftet ist [HÜBLER, Dissertation, 2001].

#### 3.3 Gelchromatographische Trennung der Hämocyanine

Die Abb. 3.3-1 zeigt die Elutionsprofile der untersuchten Hämocyanine. In der Tabelle 3.3-1 sind die Elutionsvolumina der untersuchten Hämocyanin mit den zugehörigen Molekulargewichten in kDa aufgeführt. Die zugehörige Eichgerade ist in der Abb. 3.3-2 zu sehen.

### 3 ERGEBNISSE

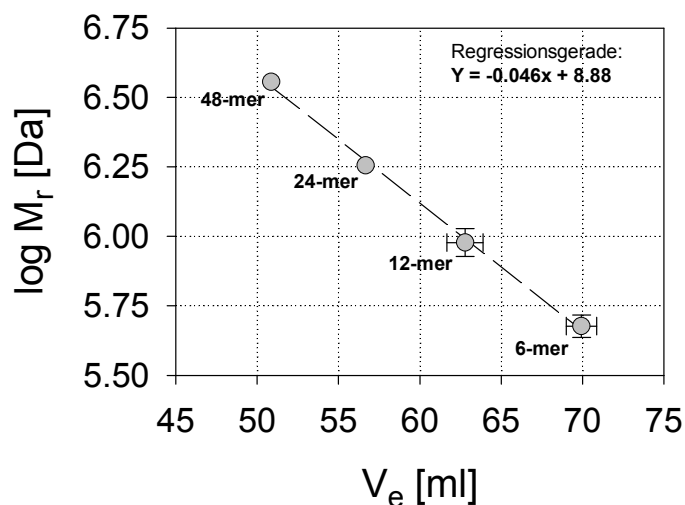


**Abb. 3.3-1:** SEC-Elutionsprofile aller untersuchten Hämocyanine. Säule: XK-16/60; Säulenmaterial: Sephadex S-300; Flussrate:  $0.80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Probenmenge: 1 ml mit  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Temperatur: Raumtemperatur; Laufpuffer: TRIS-HCl pH 7.50<sub>(20°C)</sub>, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  u.  $\text{MgCl}_2$

Tier	Hämocyanin	$M_r$ [kDa]	$V_E$ [ml]
<i>A. astacus</i>	12-mer	950	62.06
<i>C. pagurus</i>	12-mer	950	62.16
<i>H. americanus</i>	12-mer	950	62.26
<i>C. maenas</i>	12-mer	950	62.46
<i>P. camtschatica</i>	12-mer	950	62.46
<i>E. californicum</i>	24-mer	1800	56.66
<i>L. polyphemus</i>	48-mer	3600	50.86
<i>P. interruptus</i>	6-mer	475	69.26
<i>C. granulata</i>	6-mer	475	69.26
<i>P. potamios</i>	6-mer	475	71.26
<i>P. potamios</i>	12-mer	950	65.26

**Tab. 3.3-1:**  $M_r$  von Hämocyaninen mittels der SEC. Säule: XK-16/60; Säulenmaterial: Sephadex S-300; Flussrate:  $0.80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Probenmenge: 1 ml mit  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Temperatur: Raumtemperatur; Laufpuffer: TRIS-HCl pH 7.50<sub>(20°C)</sub>, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  u.  $\text{MgCl}_2$

Durch die Lagerung der Hämolymphe bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für etwa ein Jahr, zerfiel das Hämocyanin von *C. granulata* und *P. potamios* vollständig, bzw. nahezu vollständig in Halbmoleküle (6-mer). Die Hämocyanine der beiden Tiere weisen daher das gleiche Elutionsvolumen auf wie das Hexamer von *P. interruptus*. Eine PAGE (Abb. 3.4-2) der frischen Proben vor der Einfrierung, zeigt deutlich für beide Hämocyaninspezies ein noch intaktes 12-mer.



**Abb. 3.3-2:  $M_r$ -Bestimmung nativer Hämocyanine durch die analytische Gelfiltration.**

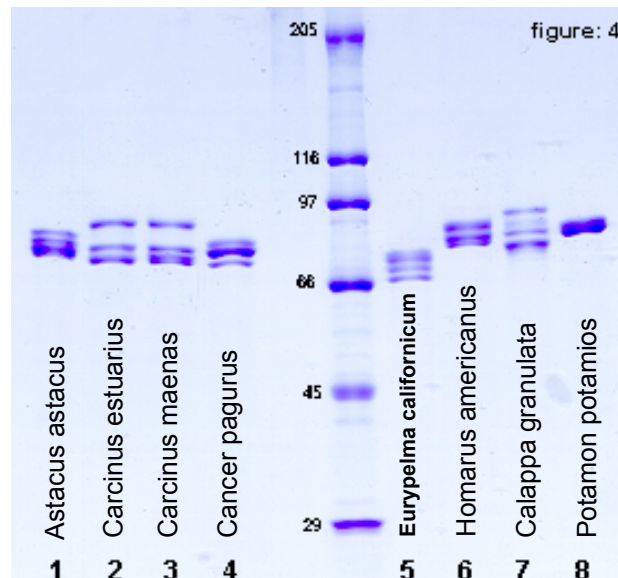
Säule: XK-16/60; Säulenmaterial: Sephadex S-300; Flussrate:  $0.80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Probenmenge:  $1 \text{ ml}$  mit  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Temperatur: Raumtemperatur; Laufpuffer: TRIS-HCl pH 7.50<sub>(20^{\circ}\text{C})</sub>, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  u.  $\text{MgCl}_2$

Die Elutionsvolumina für das bekannte 48-mer (*L. polyphemus*) und 24-mer (*E. californicum*) wurden nur einmal bestimmt. Der Wert für das 12-mer ist dagegen der Mittelwert von sechs verschiedenen Dodekameren aus verschiedenen Crustaceen Spezies. Das  $V_e$  für das 6-mer wurde vom Hämocyanin aus *P. interruptus* und von in Hexamere dissoziiertem Hämocyanin aus *P. potamios* und *C. granulata* bestimmt. Der angegebene Fehler ist die Abweichung der drei Stichprobenmesswerte vom Mittelwert der Messwerte.

### 3.4 Gelelektrophoretische Trennung der Hämocyane

#### 3.4.1 SDS-PAGE

Um die Untereinheiten der jeweiligen Hämocyane darstellen zu können, wurden die Atmungsproteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die folgende Abbildung 3.4-1 zeigt das Bandenmuster der untersuchten Hämocyane nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung mit der SDS-PAGE.



**Abb. 3.4-1: SDS-PAGE der untersuchten Hämocyane.** pH 8.80 (20°C) Gradienten-Gel 7.5-17.5 %. Die Anode befand sich am unteren Ende des Gels. Eine Mischung aus 6 Proteinen mit einem Molekulargewicht von 26 kDa bis 205 kDa dienten als Markerproteine. v.l.n.r.: *A. astacus* (12-mer), *C. estuarius* (12-mer), *C. maenas* (12-mer), *C. pagurus* (12-mer), *E. californicum* (24-mer),  $M_r$ -Marker, *H. americanus* (12-mer), *C. granulata* (12-mer), *P. potamios* (12-mer)

Die Abbildung zeigt bei allen untersuchten Hämocyänen eine deutliche Heterogenität in Bezug auf ihre Untereinheitenzusammensetzung. Eine Ausnahme ist das Hc von *P. potamios* mit nur einer Bande. Das Molekulargewicht der Untereinheiten wurde mit Hilfe der Markerproteine aus der Laufstrecke mit folgender Formel berechnet [MAKOWSKI & RAMBSY, 1997].

$$\log M_w = c + d * (\%T)$$

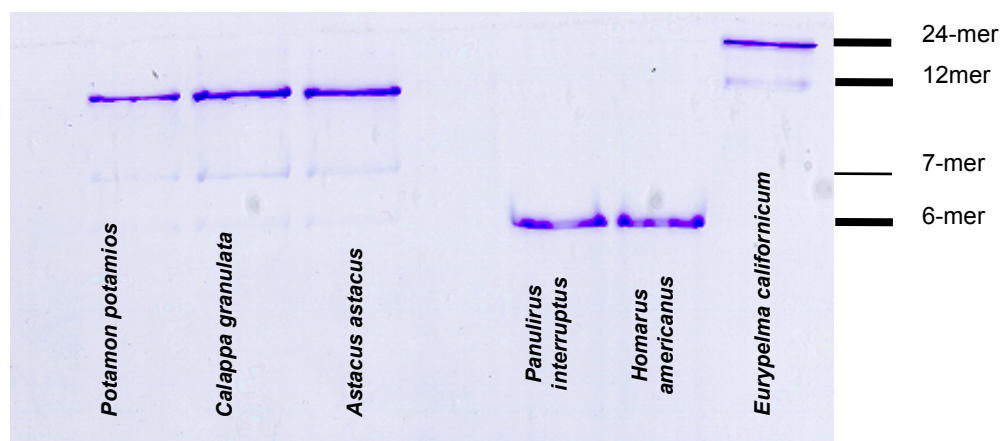
Der Logarithmus des Molekulargewichts eines Proteins ist proportional zur Polyacrylamidkonzentration (%T), bei der es sich bei Abschluß der Elektrophorese befindet. Bei „c“ und „d“ handelt es sich um Materialkonstanten des Gels, die für jedes neu gegossene Gel bestimmt werden müssen. Folgende Molekulargewichte wurden ermittelt:

Tierart	Bande	M <sub>w</sub> [Da]	Tierart	Bande	M <sub>w</sub> [Da]
<i>Astacus astacus</i>	1	75000	<i>Carcinus estuarius</i>	1	74000
	2	77000		2	77500
	3	80000		3	85500
	4	82500			
<i>Carcinus maenas</i>	1	73500	<i>Cancer pagurus</i>	1	74000
	2	74500		2	77000
	3	76500		3	80000
	4	85000			
<i>Eurypelma californicum</i>	1	69000	<i>Homarus americanus</i>	1	77500
	2	72000		2	79000
	3	74500		3	83500
	4	76000			
<i>Calappa granulata</i>	1	75000	<i>Potamon potamios</i>	1	79000
	2	78500			
	3	81500			
	4	83000			

**Tab. 3.4-1: Molekulargewichte der Hämocyaninuntereinheiten aus verschiedenen Arten.** Aus der SDS-PAGE Abb.3.4-1 (Seite 23) abgeleitet.

### 3.4.2 NATIVE-PAGE

Mit Hilfe der Nativen Gelelektrophorese lassen sich die Hämocyanine hinsichtlich ihres relativen Molekulargewichts miteinander vergleichen. Allerdings behalten nicht alle Hämocyanine bei pH 8.8 ihre native Quartärstruktur bei. So zerfällt während der elektrophoretischen Trennung das 12-mer Hämocyanin von *H. americanus* und *P. camtschatica* vollständig in 6-mer, im Gel befindet sich die Protein-Bande von *H. americanus* und *P. camtschatica* (hier nicht explizit gezeigt) daher auf gleicher Höhe mit dem 6-mer Hämocyanin von *P. interruptus* (Abb. 3.4-2).

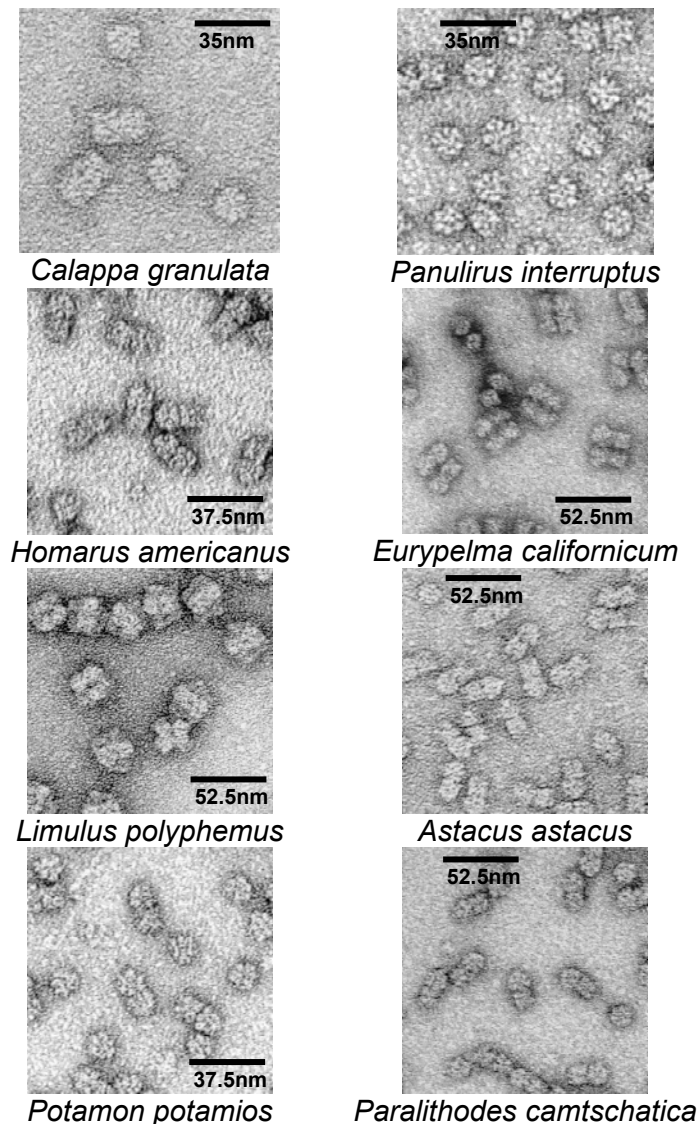


**Abb. 3.4-2: Native-PAGE der untersuchten Hämocyanine.** pH 7.50<sub>(20°)</sub> Gradienten-Gel 5-15 %. Die Anode befand sich am unteren Ende des Gels.

Neben den Hauptbanden sind bei den 12-mer Hämocyaninen zwei weitere sehr schwache Banden zu sehen. Die erste Bande entspricht einem 7-mer Hämocyanin. Bei der zweiten Bande handelt es sich um in 6-mere zerfallenes Hämocyanin. Das 24-mer von *E. californicum* ist ebenfalls zu einem geringen Teil in 12-mere zerfallen, worauf die schwache Bande auf Höhe der 12-mere hindeutet. Wie schon früher gezeigt wurde ist das Hummer Hämocyanin quantitativ vollständig in 6-mere dissoziiert. Hier findet sich nur eine Bande auf Höhe der 6-mer Hämocyanine.

#### 3.5 EM-Aufnahmen

Eine weitere Möglichkeit, um Informationen über die Quartärstruktur der untersuchten Hämocyanine zu erhalten, ist die TransmissionsElektronenMikroskopie (TEM). Die folgenden Abbildungen zeigen EM-Aufnahmen der untersuchten Hämocyaninmoleküle bei einer etwa 50.000 fachen Vergrößerung.



**Abb. 3.5-1: Natives Hämocyanin verschiedener Arthropoden im Elektronenmikroskop.**

Die Präparation erfolgte nach der Droplet-Technik und einer Negativfärbung; die Vergrößerung war etwa 50.000x

Die hier gezeigten Arthropoden Hämocyanine unterscheiden sich in ihrer Aggregationshöhe deutlich von einander. So ist das Hämocyanin von *P. interruptus* in der Aufsicht als ein rosettenförmiges Hexamer auf dem EM-Bild zu erkennen (Abb. 3.5-1). Liegt das Hexamer seitlich, wird es im EM-Bild als Rechteck abgebildet. Als räumliche Struktur ergibt sich für

das Hexamer eine Art trigonales Antiprisma [van HOLDE und MILLER; 1995] an dessen Kanten sich die Untereinheiten befinden.

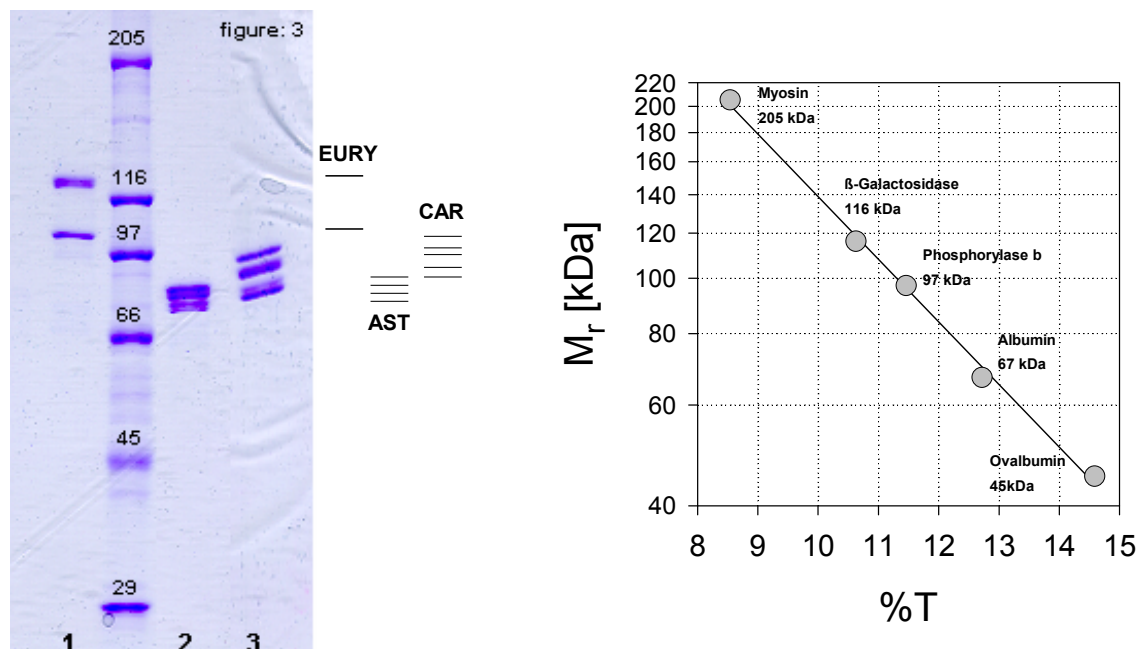
Das Hämocyanin von *H. americanus*, als Vertreter für die meisten Crustaceen, besteht aus zwei Hexameren, die sich an ihren Längsseiten zu einem Dodekamer zusammen lagern (Abb. 3.5-1). Die Symmetrieachsen der beiden Hexamere sind dabei um 90° gegeneinander verdreht.

Die Vogelspinnenart *E. californicum* besitzt ein aus vier Hexameren aufgebautes 24-meres Hämocyanin. Auf dem EM-Bild sind die Hämocyanin-Moleküle gut als eine Art von 4er-Paketen in der Aufsicht zu erkennen. Die vier Hexamere liegen in einer Ebene und sind gegen einander um einige Grad gekippt. In der Seitenansicht sind die zu einander gekippten Hexamere zu sehen (Abb. 3.5-1).

Das 48-mer Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *L. polyphemus* besteht aus acht Hexameren und kann vereinfacht als zwei übereinander gelegte 24-mer Hämocyanine beschrieben werden (Abb. 3.5-1) [van HOLDE und MILLER; 1995].

### 3.6 Das Nicht-Respiratorische-Protein (NRP)

Neben dem Hämocyanin lässt sich mit der SEC ein weiteres Protein in der Hämolymphe von Crustaceen und Cheliceraten nachweisen. Das Protein wird als ein Nicht-Respiratorisches-Protein (NRP) bezeichnet, da es keine Absorptionsbande bei 340 nm besitzt. Die Abbildung 3.6-1 zeigt zwei Crustaceen (*A. astacus* und *C. maenas*) und ein Cheliceraten (*E. californicum*) NRP in einem SDS-Gel.



**Abb. 3.6-1: SDS-PAGE von drei Arthropoden NRPs und M<sub>r</sub>-Eichgerade.** SDS-PAGE pH 8.80<sub>(20°C)</sub> Gradienten-Gel 7.50-17.50%. Eine Mischung aus 6 Proteinen mit einem Molekulargewicht von 29 kDa bis 205 kDa dienen als Markerproteine. Die Regressionsgerade lautet:  $\log M_r [\text{kDa}] = 3.2382 - 0.1095 \cdot (\%T)$

Das Spinnen NRP auf der Spur 1 zeigt 2 Bänder. Die beiden Crustaceen NRPs auf den Spuren 2 (*A. astacus*) und 3 (*C. maenas*) zeigen sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu dem Spinnen NRP ein deutlich verschiedenes Bandenmuster. Das *A. astacus* NRP besitzt 4 und das *C. maenas* NRP 5 Bänder.



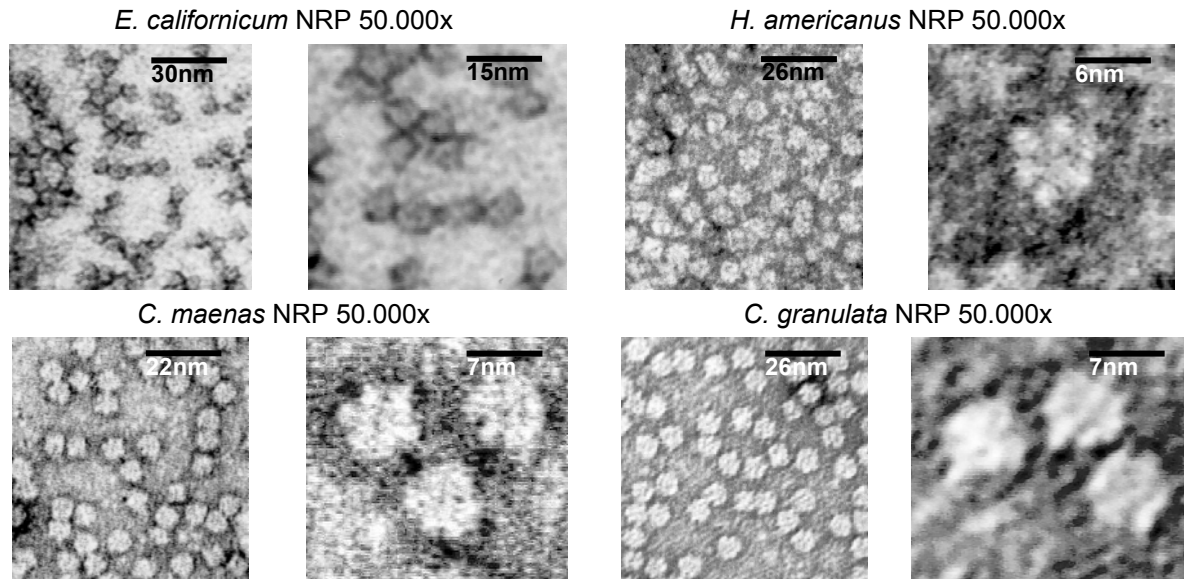
Banden Nr.	<i>E. californicum</i> M <sub>r</sub> [Da]	<i>A. astacus</i> M <sub>r</sub> [Da]	<i>C. maenas</i> M <sub>r</sub> [Da]
1	126.370	85.030	96.180
2	102.490	83.330	95.020
3		81.460	92.880
4		79.630	86.980
5			85.030

**Tab. 3.6-1: M<sub>r</sub>-Bestimmung der verschiedene Arthropoden-NPRs** aus der SDS-PAGE (Abb. 3.6-1).

Auch bei den im SDS-Gel ermittelten Molekulargewichten zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen den hier untersuchten NPRs. Mit 126 kDa und 102 kDa besitzt das NPR von *E. californicum* die größten Untereinheitentypen. Den fünf Untereinheitentypen des NPRs von *C. maenas* lassen sich Molekulargewichte von 96 kDa bis 85 kDa zu ordnen. Das *A. astacus* NPR mit vier Banden von 85 kDa bis 80 kDa hat von den drei untersuchten NPRs die kleinsten Untereinheiten.

### 3.6.1 EM-Aufnahmen Nicht-Respiratorischer-Proteine einiger Cheliceren- und Crustaceen-Arten

Um eine bildliche Darstellung der Quartärstruktur der Proteine zubekommen wurden die isolierten NPRs einiger Tiere mittels der Elektronenmikroskopie (TEM) näher charakterisiert. In der folgenden Abbildung sind die TEM-Aufnahmen der untersuchten NPRs in jeweils zwei verschiedenen Ausschnittsvergrößerungen zu sehen.

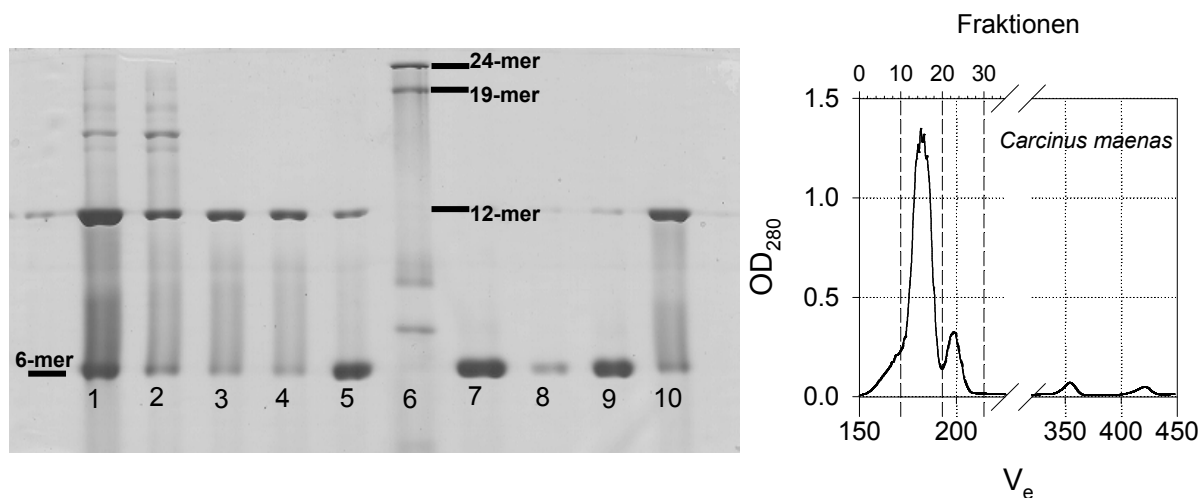


**Abb. 3.6-2: NPRs verschiedener Arthropodenarten im Elektronenmikroskop (TEM).** Die Präparation der Proben erfolgte nach der Droplet-Methode und einer Negativfärbung. Die Vergrößerung ist etwa 50.000x.

Die EM-Aufnahmen zeigen einen deutlichen Unterschied in der Quartärstruktur zwischen den Crustaceen NPRs und dem Cheliceraten NPR. Die untersuchten Crustaceen NPRs besitzen eine dem Hämocyanin-Hexamere sehr ähnliche Struktur. Die Größendimension liegt bei 16 nm im Durchmesser. Das NPR der Vogelspinne ist dagegen mit 9,5 nm x 6,5 nm (Länge x Breite) deutlich kleiner und hat eine eher linsenförmige Gestalt.

### 3.6.2 SEC-Trennung der Hämolymphe aus zwei Crustaceen-Arten

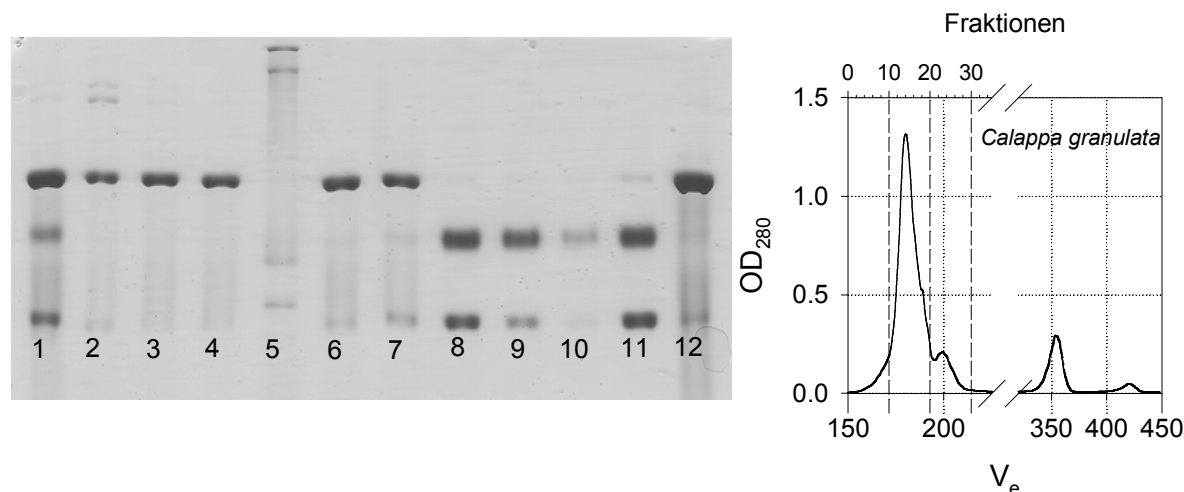
Um eventuelle Unterschiede zwischen NRPs aus zwei Crustaceen Arten aufzuklären, wurden nach einer gelchromatographischen Hämolympfreinigung die gesammelten Fraktionen mit Hilfe der NATIVE-PAGE näher charakterisiert. Vergleicht man die NRPs beider Krebsarten miteinander (Spur 7, 8, 9 für *C. maenas* (Abb. 3.6-3), bzw. 8, 9, 10, 11 für *C. granulata* (Abb. 3.6-4)), so zeigt sich, dass die im EM-Bild identischen Proteine im nativen Gel ein unterschiedliches Bandenmuster aufweisen.



Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Hämolymphe	Frakt. Nr.9 (HC)	Frakt. Nr.16 (HC)	Frakt. Nr.18 (HC)	Frakt. Nr.21 (HC)	Marker	Frakt. Nr.25 (NRP)	Frakt. Nr.28 (NRP)	NRP rein	HC rein

**Abb. 3.6-3: Hämolymphe aus *Carcinus maenas*** SEC-Fraktionen mit zugehörigem Elutionsprofil. NATIVE PAGE; pH 8.00; 7.5% bis 17.5% Acrylamidgradient

Alle Banden der Hämolympspur (1) finden sich in den untersuchten SEC-Fraktionen wieder. Die Hämolymphe von *C. maenas* enthält geringe Mengen von größeren Proteinaggregaten (wahrscheinlich HC). Dem folgt als Hauptbestandteil das 12-mere Hämocyanin. Die unterste Bande entspricht dem hexameren NRP.



Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Probe	Hämolymphe	Frakt. Nr.6 (HC)	Frakt. Nr.9 (HC)	Frakt. Nr.13 (HC)	Marker	Frakt. Nr.15 (HC)	Frakt. Nr.17 (HC)	Frakt. Nr.23 (NRP)	Frakt. Nr.25 (NRP)	Frakt. Nr.27 (NRP)	NRP rein	HC rein

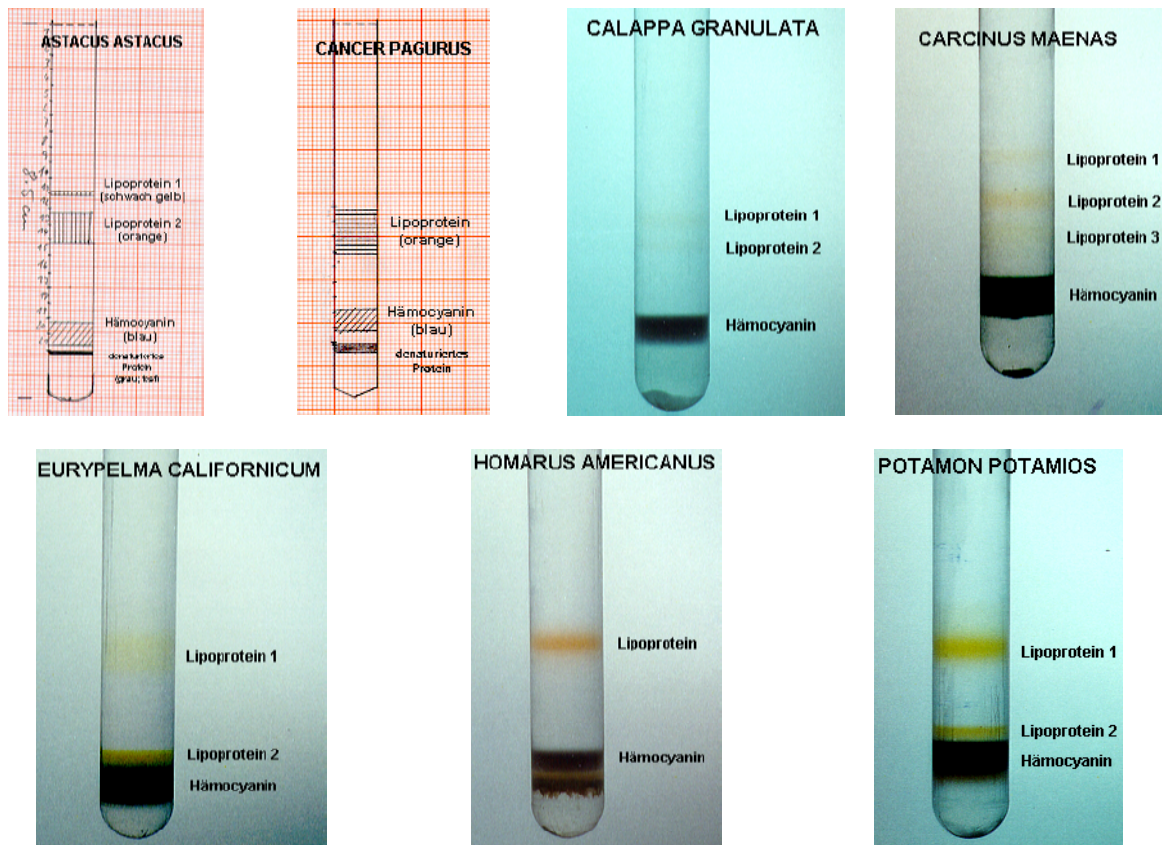
**Abb. 3.6-4:** Hämolymphe aus *Calappa granulata*; SEC Fraktionen mit zugehörigem Elutionsprofil; NATIVE PAGE; pH 8.00; 7.5% bis 17.5% Acrylamidgradient.

Die in Spur 1 aufgetragene Hämolymphe zeigt alle Banden, die sich in den anschließenden SEC-Fractionen wiederfinden. Die Hämolymphe von *C. granulata* enthält geringe Mengen von größeren Proteinaggregaten (wahrscheinlich HC). Dem folgt als Hauptbestandteil der Hämolymphe das 12-meres Hämocyanin. Dem Hämocyanin folgt das NRP. Das NRP ist in zwei Banden aufgespalten. Die obere Bande kann nicht zweifelsfrei einer genauen Aggregationshöhe zugeordnet werden, wogegen die untere Bande einem 6-mer Protein entspricht.

### 3.7 Lipoproteine

Neben dem Hämocyanin als Hauptproteinbestandteil und dem NRP, finden sich weiterhin Lipoproteine mit unterschiedlicher Dichte in der Hämolymphe. Die Lipoproteine lassen sich mit Hilfe der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolieren. Diese Proteinklasse lässt sich aufgrund ihrer gelb-orange Färbung gut im Dichtegradienten erkennen. Die Abbildungen auf der nächsten Seite zeigen die Lipoproteinbandenverteilung nach einer 18 h Zentrifugation mit 50.000 g in einem KBr-Dichtegradienten für einige Arthropoden-Arten.

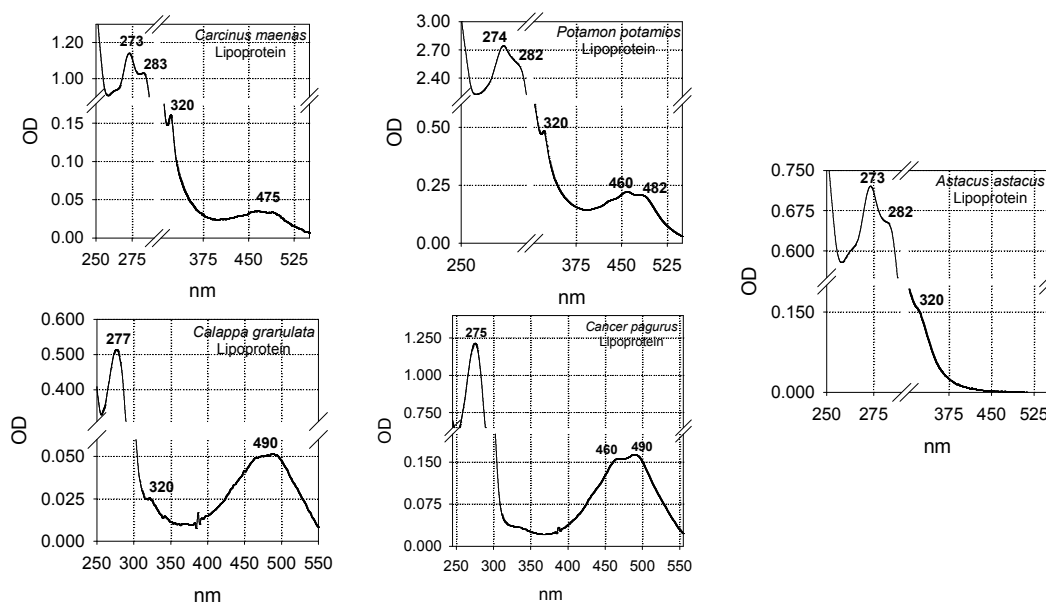
Die isolierten Lipoproteine können als HDLs (High Density Lipoproteins) charakterisiert werden. Ihre Dichte liegt zwischen  $1.12 \text{ g*ml}^{-1}$  und  $1.19 \text{ g*ml}^{-1}$ . Nur die Hämolymphe von *P. potamios* und *E. californicum* (Abb. 3.7-1) weist ein zusätzliches (VHDL) Lipoprotein mit einer Dichte von  $1.24 \text{ g*ml}^{-1}$  bzw.  $1.27 \text{ g*ml}^{-1}$  auf. Bei den Crustaceen enthält die blaue Bande im unteren Teil des Zentrifugenröhrchens das Hämocyanin mit einer Dichte von  $1.27 \text{ g*ml}^{-1}$ . Das Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* hat mit einem Wert von  $1.30 \text{ g*ml}^{-1}$  eine etwas höhere Dichte [STRATAKIS et al., 1993]. Das NRP kann mit dieser Methode nicht isoliert werden. Man findet es zusammen mit dem Hämocyanin in der untersten blauen Bande.



**Abb. 3.7-1: Hämolymphe verschiedener Arthropoden** nach einer 18 stündigen Ultrazentrifugation mit 50.000g in einem KBr-Dichtegradienten bei 4°C.

Bei *H. americanus* befindet sich unterhalb des Hämocyanins eine weitere helle Bande mit geronnener Matrix und ausgefallenen Hämolympheproteinen.

Die aus dem Dichtegradienten entnommenen Fraktionen wurden mit einem UV-VIS Absorptionsphotometer über einen Wellenlängenbereich von 550 nm bis 250 nm untersucht. Die Absorptionsspektren der isolierten Lipoproteine ergeben keine großen Unterschiede zwischen den Species. Alle Lipoproteine zeigen eine gelb-orange Pigmentierung mit einem Absorptionsmaximum um die 474 nm. Eine Ausnahme ist das Lipoprotein von *A. astacus*, welches bei 474 nm keinen Absorptionspeak besitzt. Der Proteinanteil im Spektrum ist unterhalb von 300 nm sichtbar. Die sogenannten Apoproteine der Lipoproteine zeigen ein für Proteine typisches Absorptionsspektrum mit einem Peak um die 274 nm für das Tyrosin und einer Schulter bei 282/283 nm für Tryptophan. Die Lipoproteine von *P. potamios*, *A. astacus*, *C. maenas* und *C. granulata* besitzen noch einen weiteren Absorptionspeak bei 320 nm. Die folgende Abbildung zeigt die UV/VIS-Spektren isolierter Lipoproteine aus der Hämolymphe verschiedener Crustaceen.

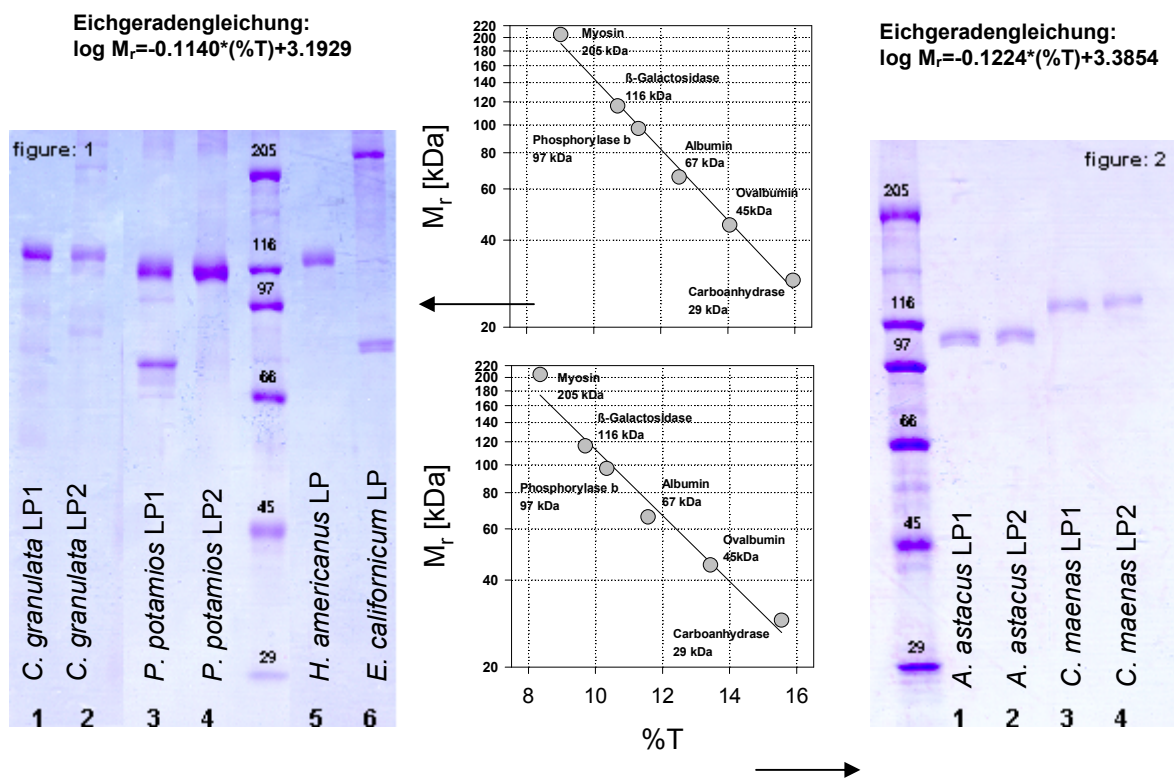


**Abb. 3.7-3: UV-VIS-Spektren einiger Crustaceen-Lipoproteine.** Isoliert aus der Hämolymphe mit Hilfe der Ultrazentrifugation (50.000g) in einem KBr Dichtegradienten.

Die isolierten Lipoproteinfraktionen wurden mit einer SDS-PAGE näher charakterisiert. In der SDS-PAGE zerfallen die Lipoproteine in ihre Lipid- und Proteinbestandteile, wobei letztere als Apoproteinbanden zu sehen sind. Die vielen kleinen Nebenbanden sind Verunreinigungen bedingt durch die Probenentnahme aus dem Dichtegradienten. Die entnommenen Fraktionen wurden nicht weiter aufgereinigt. Die ermittelten Molekulargewichte der Hauptbanden zeigt folgende Tabelle:

Tier	LP1 [kDa]	LP2 [kDa]
<i>C. granulata</i>	132	132
<i>P. potamios</i>	122 85	122
<i>H. americanus</i>	125	
<i>E. californicum</i>	210 90.5	
<i>A. astacus</i>	113 110	113 110
<i>C. maenas</i>	128 125	128 125

**Tab. 3.7-1: Molekulargewichte der einzelnen Apoproteine** aus den untersuchten Lipoproteinen. Bestimmt aus den jeweiligen Eichgeraden (s. Abb. 3.7-4, Mitte).



**Abb. 3.7-4: SDS-PAGE von Lipoproteinen aus der Hämolymphe verschiedener Arthropoden.** Für jedes Gel wurde mittels der Eichproteine eine Eichgerade ermittelt (Mitte). pH 8.80<sub>(20°C)</sub> Gradienten-Gel 7.5-17.5%. Eine Mischung aus 6 Proteinen mit einem Molekulargewicht von 29 kDa bis 205 kDa dienen als Markerproteine.

Von einigen der isolierten Lipoproteine ist die Lipidzusammensetzung bestimmt worden. Die nachfolgende Tabelle gibt den Cholesterin- und Triglyceridgehalt an. Die Triglyceride wurden nicht bei allen in der Tabelle aufgeführten Tiere bestimmt.

Tierart	Lipidgehalt			
	Lipoprotein 1		Lipoprotein 2	
	Cholesterin [mg*ml <sup>-1</sup> ]	TG [mg*ml <sup>-1</sup> ]	Cholesterin [mg*ml <sup>-1</sup> ]	TG [mg*ml <sup>-1</sup> ]
<i>C. granulata</i>	0.299	30.72	0.268	n.d.
<i>A. astacus</i>	0.020	n.d.	0.026	n.d.
<i>C. pagurus</i>	0.145	35.10	0.290	n.d.
<i>P. potamios</i>	1.169	18.00	0.017	n.d.
<i>C. maenas</i>	0.060	n.d.	0.040	n.d.

**Tab. 3.7-2: Bestimmung des Cholesterin- und Triglyceridgehaltes** mit Hilfe einer enzymatischen Umsetzung (Cholesterinoxidase; Katalase) verbunden mit einer Farbreaktion (Lutidinfarbstoff). Die untersuchten Lipoproteinfraktionen stammten aus gepoolter Hämolymphe aus den jeweiligen Tieren und wurden mittels der Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Die Bezeichnung Lipoprotein 1 u. 2 (LP1 u. LP2) bezieht sich auf die Reihenfolge der isolierten Lipoproteinbanden im KBr-Dichtegradienten. Allgemein ist zu erkennen, dass das im Dichtegradienten weiter oben zu findende LP1 einen höheren Cholesterin und Triglyceridgehalt aufweist, als das etwas dichtere und damit im Dichtegradienten weiter unter liegende LP2. Eine Ausnahme ist das LP2 von *C. pagurus* mit einem fast doppelt so hohen Cholesteringehalt wie gegenüber dem LP1. Auffällig ist, dass nur bei dem LP1 mit hohen Cholesterinwerten Triglyceride nachzuweisen sind. Trotz der Unterscheidung der hier beschriebenen Lipoproteine in LP1 und LP2 werden beide aufgrund ihrer Dichte als HDLs definiert.

### 3.8 O<sub>2</sub>-Bindung der Hämocyanine

Um den synergistischen Effekt von Temperatur und pH auf das O<sub>2</sub>-Bindungsverhalten gereinigter Hämocyanine zu untersuchen; wurden zwei verschiedene Versuchsprotokolle durchgeführt:

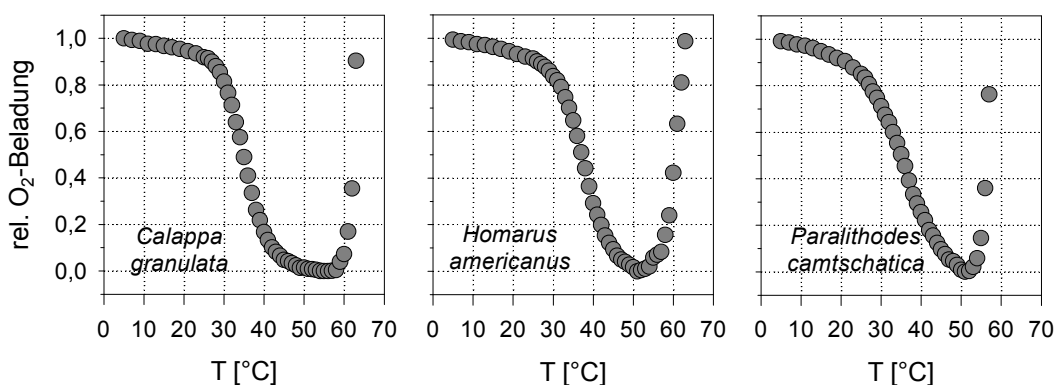
- pH=pH(T): der pH-Wert variiert in Abhängigkeit von der Temperatur
- pH=const: der pH-Wert wird unabhängig von der Temperatur konstant gehalten

#### 3.8.1 Relativer O<sub>2</sub>-Beladungsgrad einiger Hämocyanine in Abhängigkeit von der Temperatur und pH

Bevor die Bindungskurven der jeweiligen Versuchsansätze aufgenommen wurden, wurde überprüft inwieweit die O<sub>2</sub>-Beladung von der Temperatur abhängt. Der Grad der Sauerstoffbeladung eines Hämocyaninmoleküls lässt sich photometrisch gut mit einer Wellenlänge von 338 nm detektieren. Je mehr O<sub>2</sub>-Bindungsstellen (Cu-Reaktionszentren) mit O<sub>2</sub> besetzt sind, um so höher ist der OD<sub>338</sub>-Wert. Der O<sub>2</sub>-Beladungsgrad und OD<sub>338</sub>-Wert stehen dabei in einer linearen Beziehung zueinander [LOEWE, 1978].

#### 3.8.2 Die Sauerstoffbeladung für pH=pH(T)

Die Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffbeladung wurde im Bereich von 5°C bis 75°C bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration untersucht. Der pH-Wert des 0.1M TRIS-HCl-Puffers (pH 7.50; 20°C) wurde bei den gewählten Temperaturen nicht nachkorrigiert.



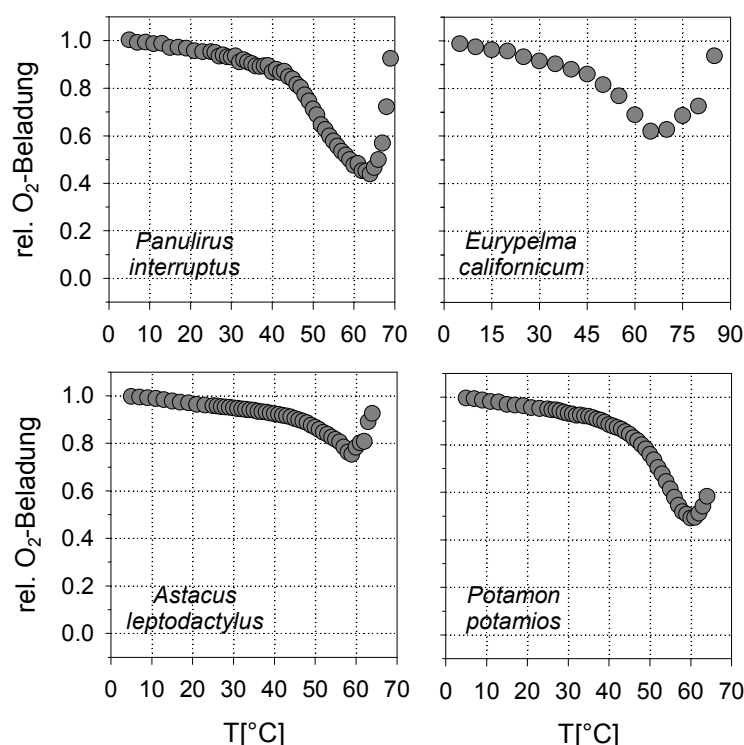
**Abb. 3.8-1: Einfluss der Temperatur auf den OD<sub>338</sub>-Wert.** Die Hämocyaninkonzentration betrug 1.20 mg\*ml<sup>-1</sup>. Die Hc-Lösung befand sich in einer Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 10 mm. Die Probenlösung wurde bei jeder gewählten Temperatur für 5 Minuten äquilibriert. Bis 25°C wurde die Temperatur in 2°C-Schritten, über 25°C in 1°C Schritten erhöht.

Um die verschiedenen Hämocyanine leichter vergleichen zu können, werden die ermittelten OD<sub>338</sub>-Startwerte auf „1.0“ und die Endwerte auf „0.0“ gesetzt. Die so normierten Werte werden als relative O<sub>2</sub>-Beladung bezeichnet.

### 3 ERGEBNISSE

Die Hämocyanine (12-mere) von *C. granulata*, *H. americanus* und *P. camtschatica* besitzen in Bezug auf die relative O<sub>2</sub>-Beladung in Abhängigkeit von der Temperatur und pH ähnliche Eigenschaften. Bei einer Temperatur von 35°C (pH 7.05) und 38°C (pH 6.96; für *H. americanus*) sind die Hämocyanine nur noch zu 50% beladen. Das Hämocyanin von *P. camtschatica* verliert etwa 30% seiner O<sub>2</sub>-Moleküle in einem Temperaturbereich von 5°C bis 30°C (pH 7.95 bis 7.20). Die Hämocyanine von *C. granulata* und *H. americanus* verlieren im gleichen Temperatur- und pH-Bereich nur 20% ihrer Sauerstoffmoleküle. Bei einer Temperatur von 40°C (pH=6.90) hat das Hämocyanin von *P. camtschatica* etwa 80% seiner O<sub>2</sub>-Moleküle verloren, die beiden anderen Hämocyaninmoleküle dagegen schon 90%. Oberhalb von 52°C (pH=6.84) für *P. camtschatica* und 54°C (pH=6.78) für *H. americanus*, kommt es zur Denaturierung der Hämocyanine. Das Hämocyanin von *C. granulata* denaturiert bei einer Temperatur von 59°C (pH 6.63). Die Denaturierung wird als weißer, flockiger Niederschlag in der Küvette sichtbar. Der Umschlag erfolgt innerhalb von 1.00°C. Der Niederschlag verursacht eine erhöhte Streuung des Lichtstrahls, die Absorption (OD<sub>338</sub>) nimmt scheinbar zu. Das Hämocyanin ist ab diesem Punkt irreversibel geschädigt.

Eine vollständige Entladung vor dem Beginn der Denaturierung (Verlust der Absorption bei 338 nm) wird bei anderen hier untersuchten Hämocyaninen nicht erreicht. Auch hier kommt es zu einer Ausflockung in einem engen Temperaturbereich ( $\pm 1.00^\circ\text{C}$ ). Die Hämocyanine dieser Arthropodenarten sind auch bei hohen Temperaturen und einem niedrigen pH-Wert noch mit Sauerstoff beladen. Am Denaturierungspunkt, um die 60°C mit einem pH von 6.30, sind die Hämocyanine von *P. interruptus*, *A. leptodactylus* und *P. potamios* zu 40%, 75% bzw. 50% mit Sauerstoff beladen. Das stabilste der hier untersuchten Hämocyanine stammt aus der Vogelspinne *E. californicum* und ist mit Einsetzen der Denaturierung noch zu 60% mit O<sub>2</sub> beladen.

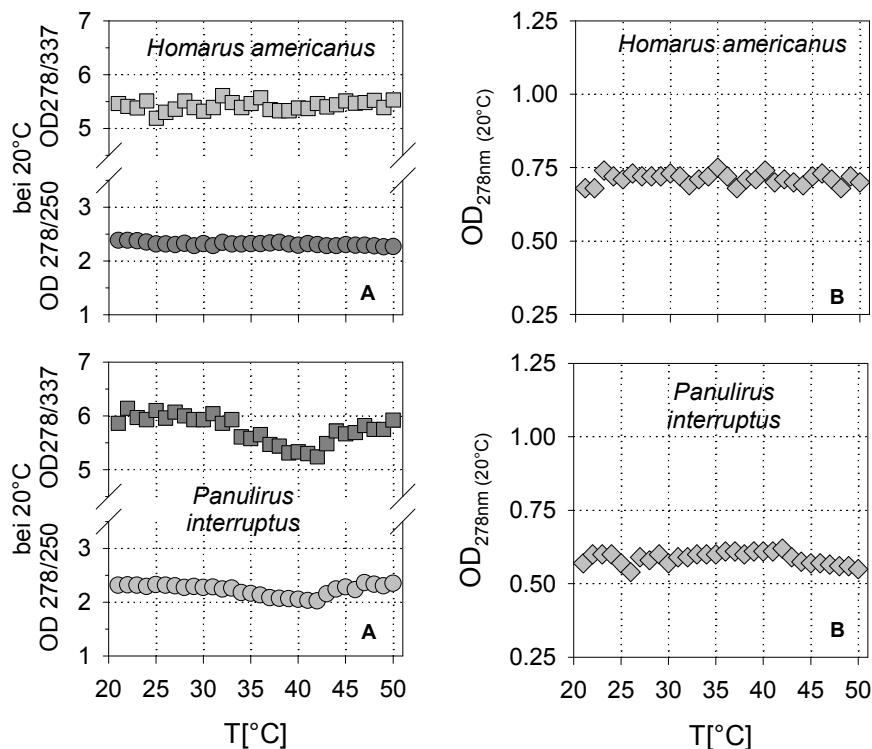


**Abb. 3.8-2:** Änderung des OD<sub>338</sub>-Wertes über einen Temperaturbereich von 5°C bis 60°C. Die Hämocyaninkonzentration betrug 1.20 mg\*ml<sup>-1</sup>. Gemessen wurde in einer Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 10 mm. Die Probenlösung wurde bei jeder gewählten Temperatur für 5 Minuten äquilibriert. Bis 25°C wurde die Temperatur in 2°C-Schritten, über 25°C in 1°C-Schritten erhöht.

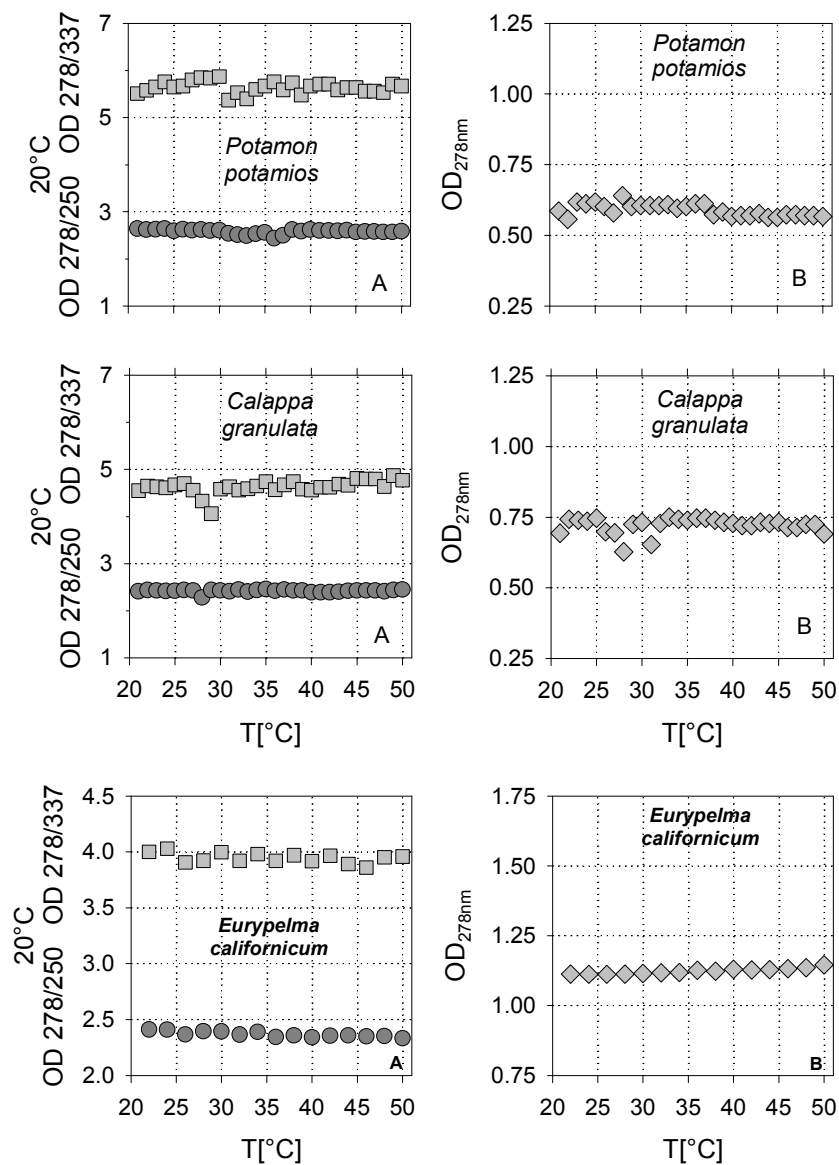


### 3 ERGEBNISSE

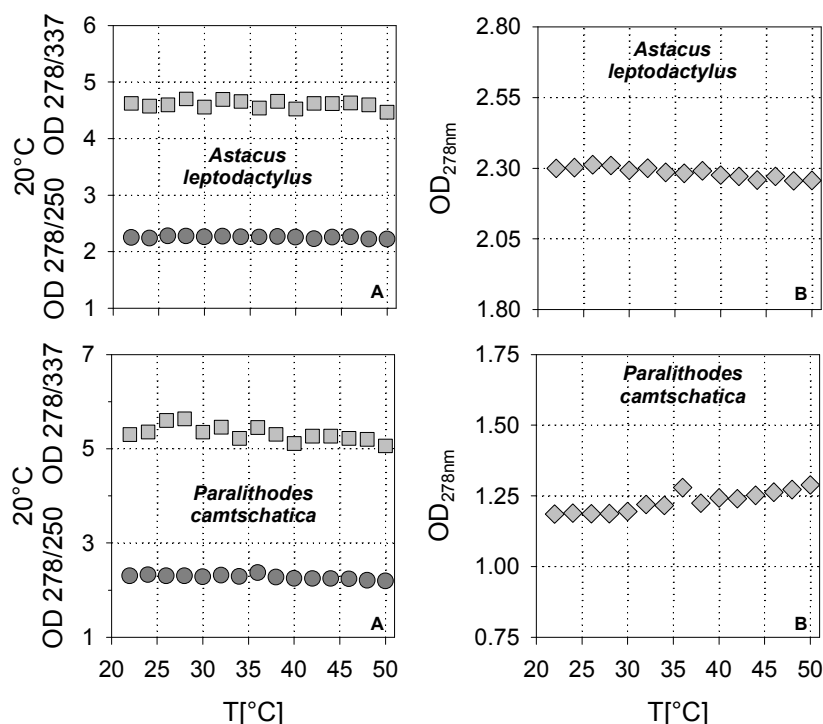
Um zu überprüfen, bis zu welcher Temperatur die Änderung in der Beladung jeweils reversibel ist, werden die Hämocyaninproben in einem Wasserbad sukzessive von 21°C auf 50°C erwärmt. Nach jedem Temperaturschritt wird die Probe wieder auf Raumtemperatur gebracht und mit einem UV-VIS Absorptionsphotometer ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Das Verhältnis der OD 278nm / 337nm und der OD 278nm / 250nm zeigt, ob eine Veränderung der O<sub>2</sub>-Beladung (Änderung der 337nm Absorptionsbande) bzw. der Molekülstruktur (Änderung der 250nm Absorptionsbande) erfolgt. Bleiben diese Parameter konstant kann davon ausgegangen werden, dass das Hämocyanin durch die Erwärmung keine strukturelle Modifikation erfahren hat. Die folgenden Abbildungen stellen die zuvor genannten Parameter für die Hämocyanine der untersuchten Tiere graphisch dar.



**Abb. 3.8-3: Überprüfung der Reversibilität der O<sub>2</sub>-Entladung verschiedener Hämocyanine mit zunehmender Temperatur.** Die Proben wurden auf die auf der X-Achse angegebenen Werte erwärmt, für 5 Minuten äquilibriert, dann auf 20°C abgekühlt und photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentration betrug etwa 0.75 mg\*ml<sup>-1</sup> in 0.1M TRIS-HCl-Puffer bei pH 7.50 (20°C).



**Abb. 3.8-4.:** Überprüfung der Reversibilität der O<sub>2</sub> Entladung verschiedener Hämocyane mit zunehmender Temperatur. Die Proben wurden auf die an der X-Achse angegebenen Werte erwärmt, für 5 Minuten äquilibriert, dann auf 20°C abgekühlt und photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentration betrug etwa 0.5-1.1 mg\*ml<sup>-1</sup> in 0.1M TRIS-HCl-Puffer bei pH 7.50 (20°C).



**Abb. 3.8-5: Überprüfung der Reversibilität der O<sub>2</sub> Entladung verschiedener Hämocyane mit zunehmender Temperatur.** Die Proben wurden auf die an der X-Achse angegebenen Werte erwärmt, für 5 Minuten äquilibriert, dann auf 20°C abgekühlt und photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentration betrug etwa 1.2-2.2 mg\*ml<sup>-1</sup> in 0.1M TRIS-HCl-Puffer bei pH 7.50<sub>(20°C)</sub>.

Die Abbildungen 3.8-3, 3.8-4 und 3.8-5 zeigen, nach einer schrittweisen Erwärmung auf 50°C mit jeweiliger Abkühlung zurück auf 20°C, für die verwendeten Hämocyane keine signifikante Änderung in ihrem Absorptionsspektrum; die Werte in den Graphen A bzw. B bleiben konstant.

Die zu erkennenden Schwankungen (vor allen bei den OD<sub>278</sub> Werte) sind auf eine leichte Änderungen der OD-Werte um ±0.05 OD durch den Transfer der Küvette zwischen den verschiedenen Küvettenhalter zurückzuführen und nicht auf eine O<sub>2</sub>-Beladungszunahme. Der Gesamtfehler der Messwerte liegt bei ±7%. Der konstante OD<sub>278nm</sub>-Wert zeigt, dass es während der schrittweisen Erwärmung auf 50°C zu keiner Denaturierung der Hämocyaninmoleküle kommt. Dies wird durch die Quotienten von OD 278/250 und 278/337 bestätigt, einer Auftragung mit sehr hoher Sensitivität. Denaturierte Hämocyane würden den Streulichtanteil in der Lösung deutlich erhöhen, weniger Licht erreicht den Detektor und es kommt zu einer scheinbaren Absorptionzunahme, wodurch erhöhte OD-Werte gemessen werden.

Diese Zunahme des Streulichtanteils wird bei Betrachtung der Rayleigh-Gleichung deutlich:

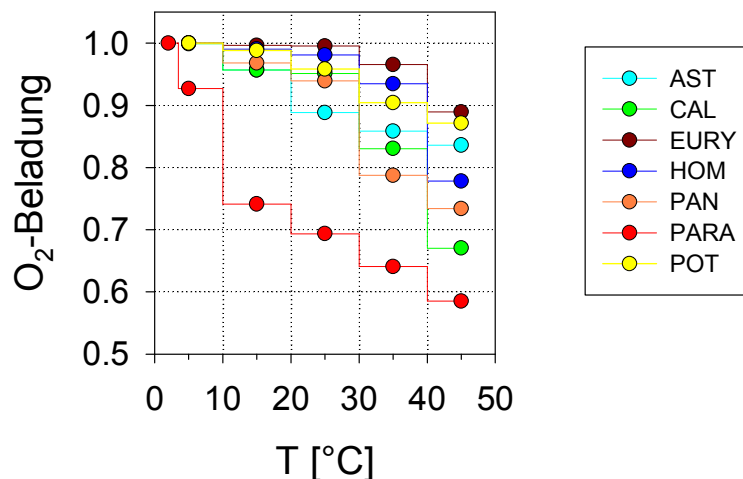
$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{\alpha^2 \pi^2 \sin^2 \varphi_z}{\varepsilon_0^2 r^2 \lambda^4}$$

d.h. die Streuintensität nimmt mit der vierten Potenz der Wellenlänge  $\lambda$  ab. Es bedeuten:

- $I_s$  : gestreute Lichtintensität
- $I_0$  : einfallende primäre Lichtintensität
- $\alpha$  : Elektronenpolarisierbarkeit des Moleküls
- $\varphi_z$  : Winkel mit der Z-Achse (senkrecht zur primär Achse)
- $\varepsilon_0$  : elektrische Feldkonstante
- $r$  : Abstand vom Streuzentrum
- $\lambda$  : Wellenlänge des Lichts im Vakuum

### 3.8.3 Die Sauerstoffbeladung für pH=const bei variabler Temperatur

Um den Temperatureffekt auf die O<sub>2</sub>-Bindung am Cu-Zentrum abschätzen zu können, wird in einen weiteren Versuchsansatz der pH-Wert bei der Crustaceen und Cheliceraten Hämocyaninlösung auf 7.50 bzw. 7.80 eingestellt und über den Temperaturmessbereich konstant gehalten. Die Erhöhung der Temperatur auf 45°C bei konstantem pH zeigt bei den einzelnen Hämocyaninen einen unterschiedlichen Einfluss auf den Beladungsgrad. Ein Vergleich der beiden Versuchsansätze ist in Tabelle 3.8-1 zusammengefasst.



**Abb. 3.8-6:** Änderung der O<sub>2</sub>-Beladung verschiedener Hämocyanine mit zunehmender Temperatur bei einem konstanten pH-Wert (pH 7.50 für die Crustaceen-Hämocyanin und pH 7.80 für das Spinnen-Hämocyanin).

Tier-Art	Aggregationshöhe [x-mer]	Temperatur [°C]	O <sub>2</sub> -Beladung [%]	
			pH=const	pH=pH(T)
<i>A. leptodactylus</i>	12	45	84	82
<i>E. californicum</i>	24	45	89	77
<i>P. interruptus</i>	6	45	73	84
<i>C. granulata</i>	12	45	67	5
<i>H. americanus</i>	12	45	78	9
<i>P. camtschatica</i>	12	45	58	10
<i>P. potamios</i>	12	45	87	60

**Tab. 3.8-1: Temperatur- und pH-Einfluss auf den O<sub>2</sub>-Beladungsgrad von Hämocyaninen aus sieben verschiedenen Arthropoden Species.** Bei pH=const wurde der pH-Wert in dem untersuchten Temperaturbereich konstant gehalten (pH 7.50 für das Crustaceen-Hc und pH 7.80 für das Spinnen-Hc). Bei pH=pH(T) variiert der bei 20°C eingestellte pH-Wert mit der Temperatur.

Das Hämocyanin von *A. leptodactylus*, *E. californicum* und *P. interruptus* variierte kaum in seinem O<sub>2</sub>-Beladungsgrad. Für diese Hämocyanine spielt es keine Rolle, ob sich der pH mit der Temperatur ändert oder ob er konstant gehalten wird. Die restlichen vier Hämocyanine reagieren empfindlich auf einen sich mit steigender Temperatur ändernden pH-Wert. Das Hämocyanin von *C. granulata* hat bei einem fixierten pH-Wert 62% mehr O<sub>2</sub> gebunden. Für das Hämocyanin von *H. americanus* ergibt sich ein Wert von 69% mehr gebundenem O<sub>2</sub> im Molekül, das Hämocyanin von *P. camtschatica* und *P. potamios* bindet 48% bzw. 19% mehr Sauerstoffmoleküle. Die Denaturierungstemperatur für die Hämocyanine ist für beide Versuchsbedingungen gleich.

### 3.9 Die Sauerstoffbindungseigenschaften verschiedener Hämocyanine

Es wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Beim ersten Ansatz wurde der pH-Wert konstant gehalten (pH=const), im zweiten Versuchsansatz war der pH abhängig von der Temperatur (pH=pH(T)).

Die Sauerstoffbindungskurven wurden mit Hilfe der fluorometrisch-polarographischen Methode nach LOEWE (1978) aufgenommen.

Die Bindungskonstanten ( $k_1 = \frac{k_R + Lk_T}{1 + L}$  und  $k_N = \frac{k_R^n + Lk_T^n}{1 + L}$ ), der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) und

der Halbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ) wurden mit Hilfe des Hill- bzw. des modifizierten Scatchard-Plots bestimmt. Zur Beschreibung der Sauerstoffbindung durch das Hämocyaninmolekül wurde für das 12- und 24-mer das Nesting-Modell und für das 6-mer Hämocyanin das einfache MWC-Modell angewandt.

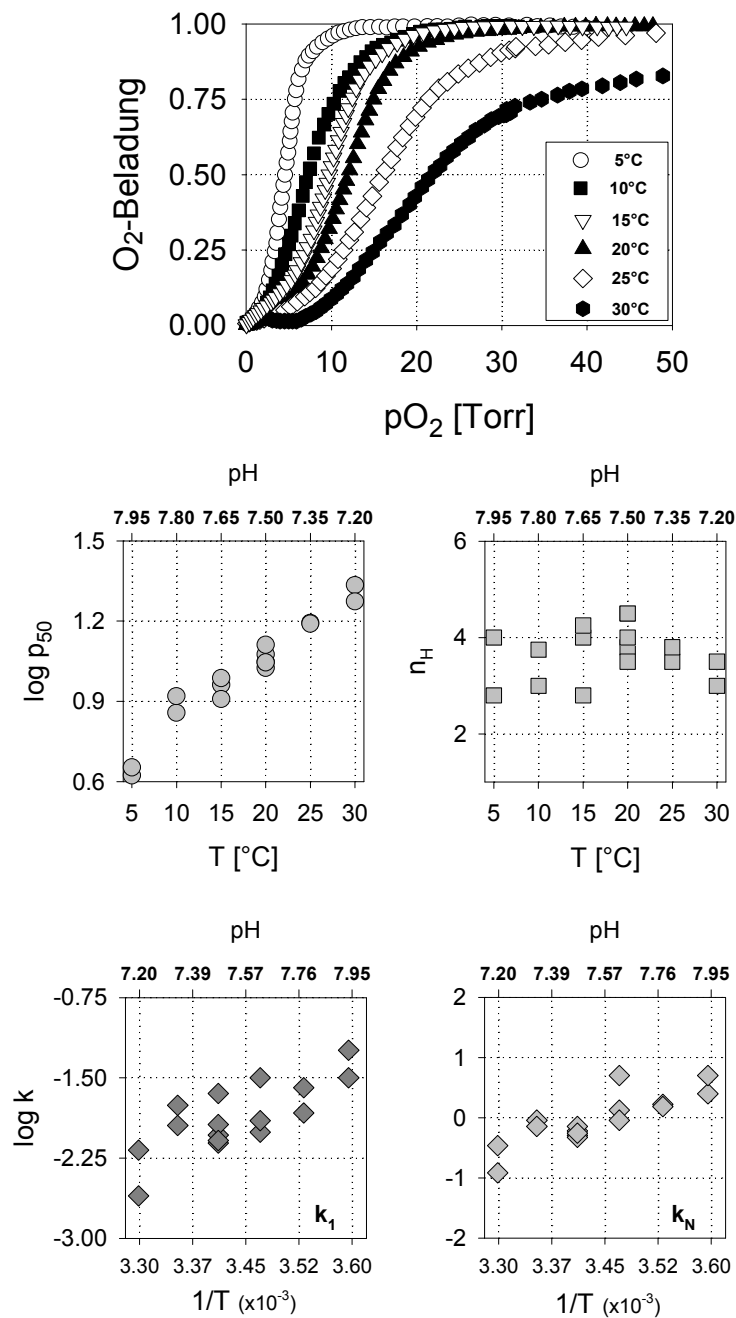
#### 3.9.1 I (pH=pH(T)) *Astacus astacus* Hämocyanin

♦ *der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)*

Die Abb. 3.9-1 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variierte in Abhängigkeit von der Temperatur.

- i) der  $p_{50}$  nimmt signifikant mit steigender Temperatur und sinkendem pH zu
- ii) die Kooperativität ( $n_H$ ) besitzt ein Optimum zwischen 15°C und 20°C

Der Wert für den  $p_{50}$ , d.h. der pO<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck, nimmt von 5 Torr bei 5°C auf 22.5 Torr bei 30°C zu. Der pH-Wert in diesem Temperaturbereich fällt von 7.95 auf 7.20, was einem  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von 0.03 pH-Einheiten entspricht. Der Bohr-Koeffizient  $\Delta\log p_{50}/\Delta\text{pH}(T)$  ist innerhalb des pH-Bereichs von 7.20 bis 7.95 mit einem Wert von -0.82 nahezu konstant. Der  $n_H$  als Maß für die Kooperativität der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyaninmolekül erreicht zwischen 5°C (pH 7.95) und 30°C (pH 7.20) einen Wert von  $3.75 \pm 0.60$ . Die Kooperativität durchläuft zwischen 15°C und 20°C ein Optimum. Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  werden mit zunehmender Erwärmung bzw. sinkenden pH kleiner (Abb. 3.9-1, unten). Die Bindungskonstante  $k_1$  fällt von  $0.057 \text{ Torr}^{-1}$  bei 5°C (pH 7.95) auf  $0.009 \text{ Torr}^{-1}$  bei 30°C (pH 7.20).  $k_N$  erreicht bei 5°C einen maximalen Wert von  $2.50 \text{ Torr}^{-1}$ , mit fortschreitender Erwärmung bis 30°C fällt dieser auf  $0.20 \text{ Torr}^{-1}$ .



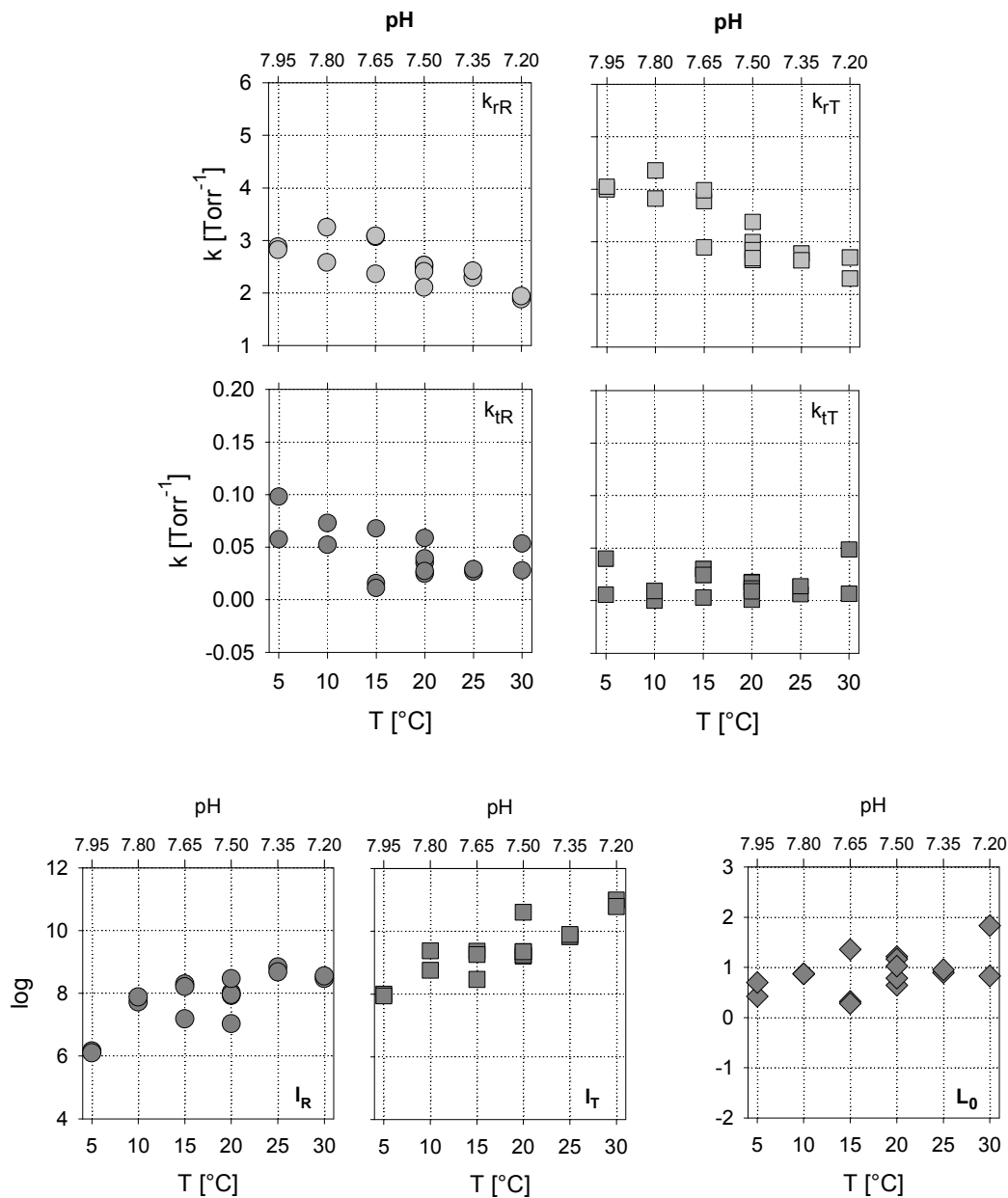
**Abb. 3.9-1:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Bindungsparameter ( $p_{50}$ ,  $n_{50}$ ,  $k_N$ ,  $k_1$ ) von *A. astacus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der Temperatur induzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- *Analyse nach dem NESTING-Modell für  $pH=pH(T)$* 
  - i)  $k_{rR}$ ,  $k_{tR}$  und  $k_{rT}$  sind abhängig von der Temperatur oder pH, wobei  $k_{rT}$  am empfindlichsten reagiert.
  - ii)  $k_{tT}$  ist gegenüber der Temperatur und pH unabhängig.

Neben der graphischen Bestimmung der Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  wurden die Bindungskurven mit Hilfe des Nesting-Modells analysiert. Mit einer auf diesem Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die vier Bindungskonstanten  $k_{rR}$ ,  $k_{tR}$ ,  $k_{rT}$  und  $k_{tT}$ , sowie die drei allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $I_R$ ,  $I_T$  und  $L_0$  bestimmen. Wie die Abb. 3.9-2 zeigt, fällt die Bindungskonstante  $k_{rR}$  von  $2.90 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $1.90 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Der  $k_{rT}$  verringert sich in diesem Temperaturbereich von  $4.00 \text{ Torr}^{-1}$  auf  $2.50 \text{ Torr}^{-1}$ .  $k_{tR}$  nimmt leicht von  $0.075 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $0.04 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$  ab. Dagegen kann  $k_{tT}$  als konstant betrachtet werden.

Beobachtet man den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Halbmoleküle mit steigender Temperatur, so nehmen die Werte für  $\log I_R$  und  $\log I_T$  von 6.20 auf 8.60 bzw. von 8.00 auf 11.00 zu. Die Gleichgewichtskonstante  $L_0$  für das gesamte Hämocyaninmolekül steigt im untersuchten Temperaturbereich von 0.50 auf 1.50. Die Werte für  $\log L_0$  sind im Vergleich zu  $\log I_R$  und  $\log I_T$  sehr klein (Abb. 3.9-2).

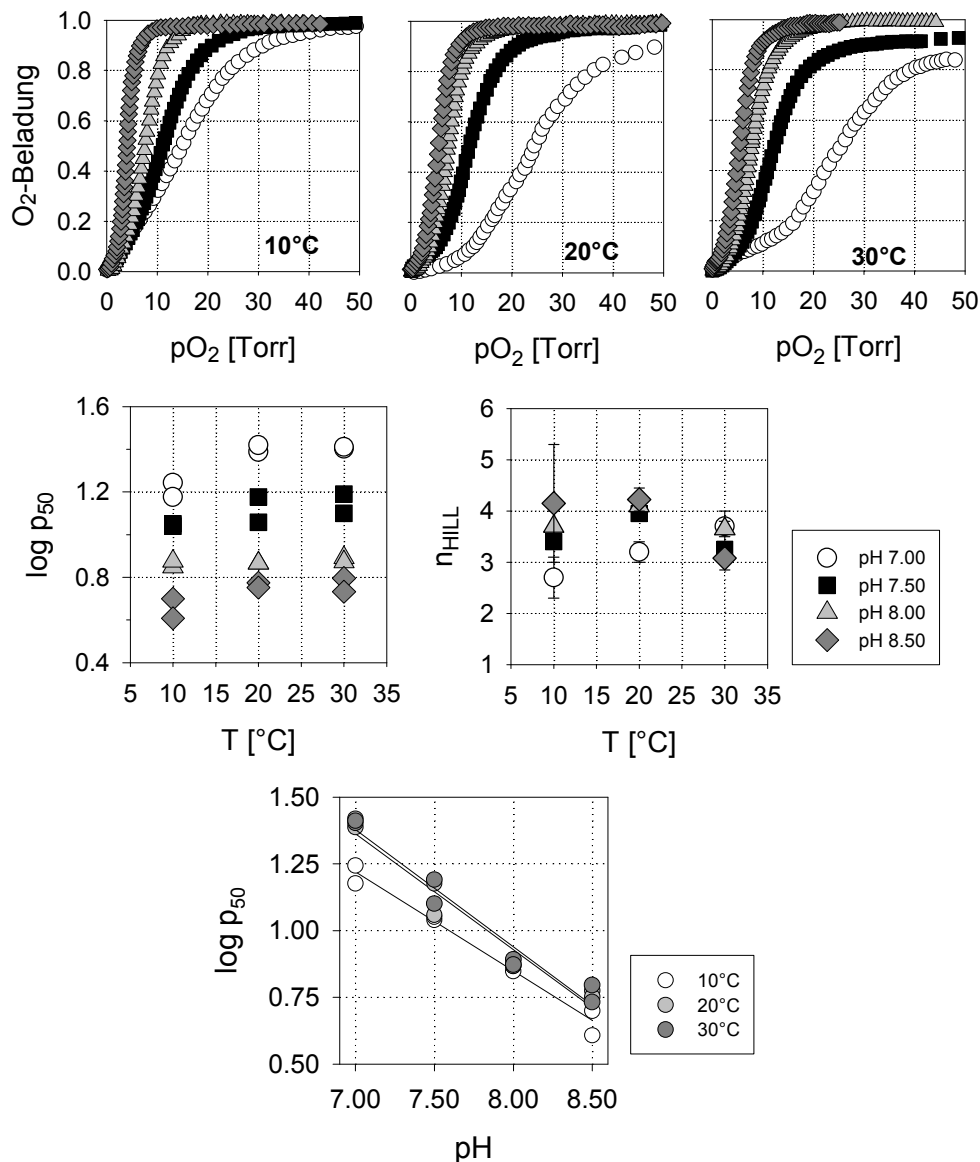




**Abb. 3.9-2: O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *A. astacus* Hämocyanin.** Die Datenanalyse erfolgte nach dem Nesting-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 3.9.2 II (pH=const) *Astacus astacus* Hämocyanin

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-3 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Bindungsparameter des *A. astacus* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-3:** O<sub>2</sub>-Bindungskurve, -parameter und Bohreffekt ( $p_{50}$ ,  $n_{Hill}$  und  $\Delta \log p_{50} / \Delta pH$ ) von *A. astacus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

◆ der pH ist unabhängig von der Temperatur  $pH=const.$

- i) der  $p_{50}$  nimmt mit steigender Temperatur zu. Bei pH 7.00 ist die Änderung des  $p_{50}$  am größten.
- ii) der  $p_{50}$  zeigt bei jeder Temperatur eine starke pH Abhängigkeit (Bohr-Effekt). Vor allen bei den niedrigen pH-Werten.

Bei einem pH von 7.00 ist der Einfluss der Temperatur auf den  $p_{50}$  des Hämocyanins besonders stark ausgeprägt. Von 10°C auf 20°C nimmt der O<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck von 15 Torr auf 25 Torr zu. Eine Erhöhung der Temperatur auf 30°C zeigt dagegen keinen Einfluss mehr auf den  $p_{50}$ -Wert. Bei den höheren pH-Werten ist dieser Temperatureffekt auf den  $p_{50}$  gar nicht oder nur schwach ausgeprägt. Bei pH 7.50 steigt der  $p_{50}$  nur leicht von 11 Torr bei 10°C auf 13 Torr bei 30°C an. Wird der pH auf 8.00 eingestellt, bleibt der  $p_{50}$  mit 7 Torr bis 30°C nahezu konstant. Für pH 8.50 wird bei 10°C ein  $p_{50}$  von 4 Torr gemessen, bei 20°C und 30°C erhöht sich dieser auf 6 Torr. Die pH-Empfindlichkeit (Bohreffekt) des  $p_{50}$  lässt diesen bei 10°C und pH 8.50 von 4 Torr auf 15 Torr bei pH 7.00 ansteigen. Bei 20°C und 30°C nimmt der  $p_{50}$  von 6 Torr (pH 8.50) auf 26 Torr (pH 7.00) zu.

Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta pH$
10°C	-0.37
20°C	-0.43
30°C	-0.44

**Tab. 3.9-1: Die Bohrkoeffizienten des *Astacus astacus* Hämocyanins.** Ermittelt aus den Regressionsgeraden (Abb. 3.9-3, unten). Der  $\Delta pH$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Der Einfluss des pH's auf den Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) ist bei niedrigen Temperaturen am größten. Die Temperaturempfindlichkeit der Kooperativität ist nur gering ausgeprägt. Bei 20°C und einem pH von 7.50, 8.00 und 8.50 erreicht der Hill-Koeffizient ein Maximum von 4.2. Bei einem pH von 7.00 erreicht  $n_H$  bei 20°C nur einen Wert von 3.2 und liegt auch bei 10°C deutlich niedriger als bei den höheren pH-Werten bei gleicher Temperatur. Wird das *A. astacus* Hämocyanin auf 30°C erwärmt, verringert sich die Auswirkung des pH's auf die Kooperativität signifikant. Die Werte für  $n_H$  liegen für die untersuchten pH-Werte dicht beisammen ( $n_H \sim 3.5$ ).

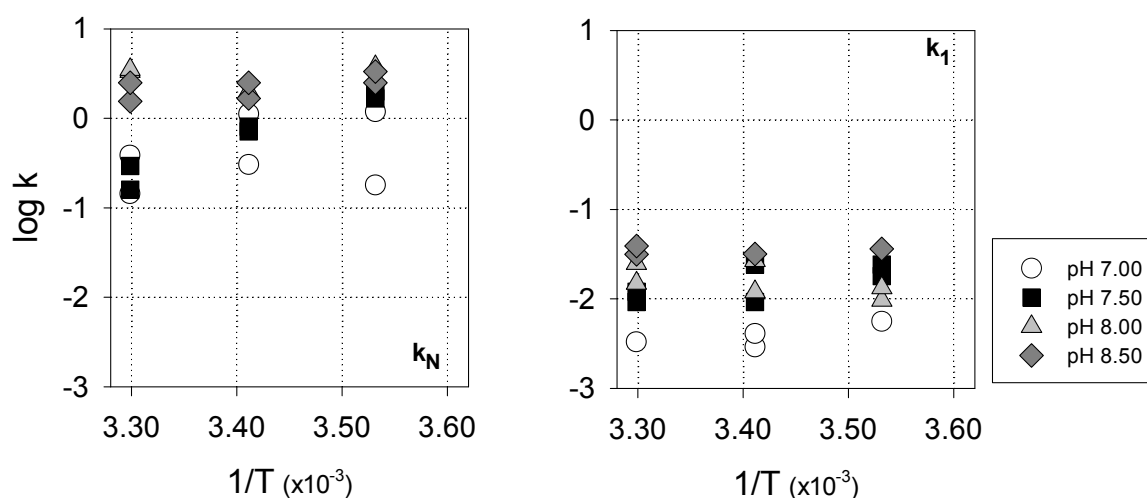
• Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:

- i)  $k_N$  ist Temperatur und pH empfindlich:  $k_N \downarrow$  wenn die Temperatur steigt;  $k_N \uparrow$  wenn der pH steigt
- ii) die Temperaturempfindlichkeit von  $k_N$  ist pH abhängig
- iii)  $k_1$  zeigt keine signifikante Temperatur- aber eine geringe pH-Empfindlichkeit

Die Abb. 3.9-4 zeigt den Verlauf der aus dem Hill-Plot bestimmten Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  in Abhängigkeit von Temperatur und pH. Die Temperatur hat nur bei pH 7.50 und pH 7.00 einen signifikanten Einfluss auf  $k_N$ . Wird die Hämocyaninlösung auf 8.00 oder 8.50 eingestellt, zeigt sich kein eindeutiger Temperatureffekt und  $k_N$  kann in dem untersuchten Temperaturbereich als konstant betrachtet werden. Der pH hat im Basischen einen deutlich ausgeprägten Effekt auf den letzten Bindungsschritt.  $k_1$  zeigt keine Temperaturabhängigkeit, weist aber eine gering ausgeprägte pH-Empfindlichkeit auf. Für  $k_N$  und  $k_1$  wurden folgende Werte ermittelt:

Temperatur	pH			
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.68±0.50	1.83±0.17	4.97±1.67	2.92±0.42
20°C	0.71±0.40	0.76±0.05	6.00±4.00	2.08±0.42
30°C	0.26±0.12	0.23±0.07	3.33±0.00	2.02±0.48
Temperatur	pH			
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.020±0.015	0.021±0.003	0.012±0.011	0.026±0.011
20°C	0.003±0.001	0.0017±0.008	0.019±0.008	0.025±0.007
30°C	0.008±0.005	0.011±0.001	0.011±0.001	0.035±0.004

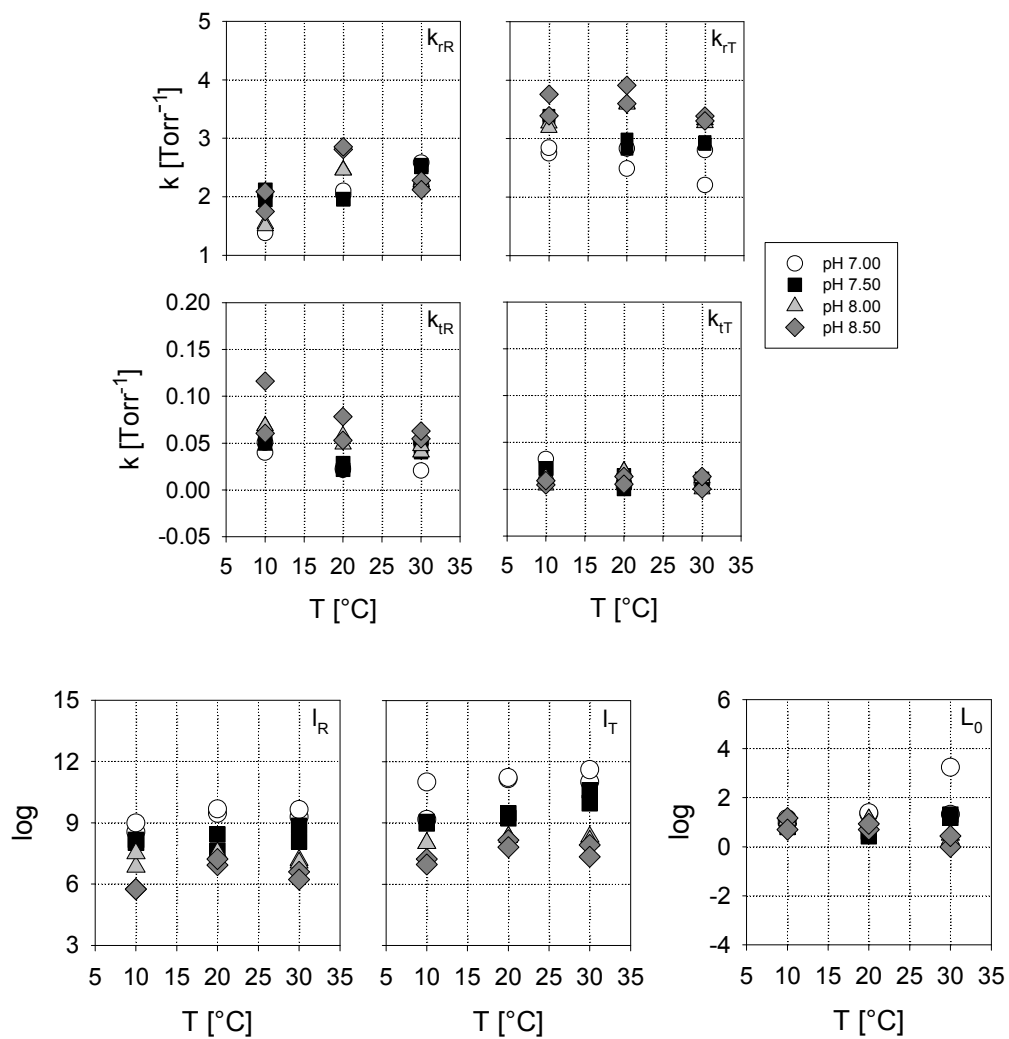
**Tab. 3.9-2:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für die erste und letzte Bindungsstelle ( $k_1$  und  $k_N$ ) des *A. astacus* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.



**Abb. 3.9-4:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für *A. astacus* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- Analyse nach dem Nesting-Modell für pH=const.
  - i)  $k_{rR}$  nimmt zu wenn die Temperatur steigt; pH unabhängig
  - ii)  $k_{rT}$  nimmt bei pH 7.00 u. 7.50 ab wenn die Temperatur steigt; pH abhängig
  - iii)  $k_{iR}$  ist Temperatur unabhängig und leicht pH abhängig
  - iv)  $k_{iT}$  ist Temperatur und pH unabhängig

Die vier im Nesting-Modell angenommenen Konformationen ( $rR$ ,  $tR$ ,  $rT$ ,  $tT$ ) mit den dazugehörigen Bindungskonstanten, sind in der Abb. 3.9-5 für den jeweiligen pH-Wert gegenüber der Temperatur aufgetragen. Die Werte der jeweiligen Bindungskonstanten sind tabellarisch aufgeführt.



**Abb. 3.9-5:**  $\text{O}_2$ -Bindungs- und die Allosterischen Gleichgewichtskonstanten für das *A. astacus* Hämocyanin. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem  $0.1 \text{ M}$  TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von  $20 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ . Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  und  $30^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Eine temperaturabhängige pH-Drift wurde dadurch verhindert.

Temperatur	pH			
$k_{rR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	1.71±0.32	2.03±0.09	1.52±0.03	1.92±0.17
20°C	2.07±0.03	1.96±0.01	2.46±0.01	2.83±0.02
30°C	2.38±0.00	2.53±0.02	2.23±0.02	2.20±0.08
Temperatur	pH			
$K_{rR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.045±0.005	0.052±0.003	0.068±0.001	0.088±0.028
20°C	0.022±0.001	0.025±0.004	0.053±0.005	0.066±0.013
30°C	0.036±0.015	0.043±0.003	0.044±0.003	0.059±0.004

**Tab. 3.9-3:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rR}$  und  $K_{rR}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der R-Konformation des *A. astacus* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Der Werte für wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Temperatur	pH			
$K_{tT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.021±0.012	0.022±0.001	0.008±0.004	0.007±0.002
20°C	0.004±0.002	0.008±0.007	0.019±0.001	0.010±0.004
30°C	0.008±0.002	0.008±0.003	0.006±0.006	0.007±0.007
Temperatur	pH			
$k_{tT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	2.80±0.05	3.38±0.03	3.23±0.04	3.57±0.18
20°C	2.66±0.17	2.91±0.09	3.59±0.01	3.76±0.16
30°C	2.50±0.30	2.93±0.03	3.29±0.03	3.34±0.04

**Tab. 3.9-4:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{tT}$  und  $K_{tT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *A. astacus* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Der Werte für wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Hämocyaninhalbmoleküle (6-mere)  $I_T$  und  $I_R$  sind für einen temperaturunabhängigen pH als konstant zu betrachten. Wird die Temperatur konstant gehalten, nehmen  $I_T$  und  $I_R$  des *Astacus* Hämocyanins mit steigendem pH ab. Die Werte für  $I_R$  fallen um jeweils eine Größenordnung, wenn der pH um 0.5 Einheiten erhöht wird ( $\log I_R$ : 9.30±0.40, 8.20±0.35, 7.25±0.25 bzw. 6.40±0.55 Ein ähnliches Verhalten liegt für  $I_T$  vor ( $\log I_T$ : 10.85±0.80, 9.55±0.55, 8.20±0.15 bzw. 7.55±0.40 bei pH 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50).

Die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_0$  für das Gesamtmolekül (2x6-mer) zeigt dagegen keine signifikante Abhängigkeit von pH und Temperatur, abgesehen von einem Ausreißer bei 30°C und pH 7.00. Die Zahlenwerte für  $L_0$  sind gegenüber den Werten von  $I_T$  und  $I_R$  um mindestens sechs Größenordnungen kleiner und bewegen sich zwischen 5 und 15 bei 10°C, 5 und 25 bei 20°C und 2 und 20 bei 30°C.

### 3.9.3 I (pH=pH(T)) *Paralithodes camtschatica* Hämocyanin

◆ *der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)*

- i) der  $p_{50}$  nimmt signifikant mit steigender Temperatur und sinkendem pH zu
- ii) die Kooperativität ( $n_H$ ) nimmt signifikant mit steigender Temperatur und sinkendem pH ab
- iii)  $k_1$  und  $k_N$  sind unabhängig von der Temperatur und pH

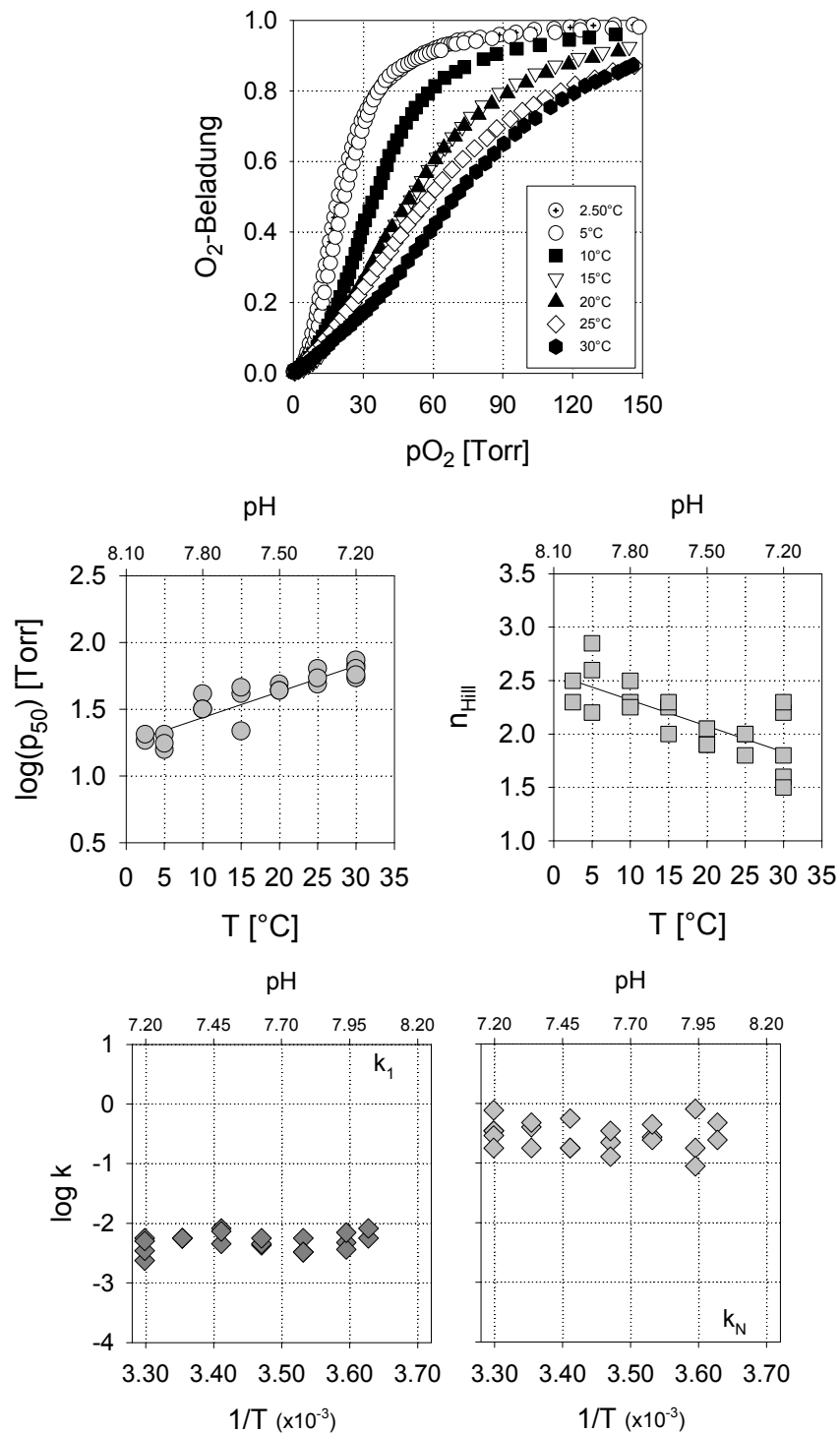
Die Abb. 3.9-6 auf der nächsten Seite zeigt die Sauerstoffbindungskurven in einem Temperaturbereich von 2.50°C bis 30°C. Der pH-Wert des verwendeten TRIS-Puffers wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variierte mit der Temperatur. Der  $p_{50}$  steigt von  $19.45 \pm 1.05$  Torr ( $n=2$ ) bei 2.50°C auf  $63.25 \pm 7.00$  Torr ( $n=2$ ) bei 30°C. Der pH-Wert in diesem Temperaturbereich fällt von 7.95 auf 7.20, dies entspricht einem  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von 0.03 pH-Einheiten. Wird der  $\log p_{50}$  in Abhängigkeit zur Temperatur mit dem jeweiligen pH-Wert graphisch aufgetragen, lässt sich für das native *P. camtschaticae* Hämocyanin ein Bohrkoeffizient ( $\Delta\log p_{50}/\Delta\text{pH}(T)$ ) von -0.65 ermitteln. Die Kooperativität, ausgedrückt durch den Hill-Koeffizient ( $n_H$ ), nimmt in dem gleichen Temperatur- und pH-Intervall von 2.50 auf 1.50 ab (Abb. 3.9-6, Mitte). Durch die Übertragung der Bindungskurven in einen Hill-Plot lassen sich neben der Kooperativität auch die beiden Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  für die postulierte hochaffine und die niedrigaffine Konformation des Hämocyaninmoleküls graphisch bestimmen. In dem untersuchten Temperaturbereich bleiben die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  mit Werten von  $0.0052 \pm 0.0015$  Torr<sup>-1</sup> bzw. von  $0.35 \pm 0.20$  Torr<sup>-1</sup> konstant (Abb. 3.9-6, unten).

• *Analyse nach dem NESTING-Modell für pH=pH(T):*

- i)  $k_{rR}$  und  $k_{tR}$  zeigen oberhalb von 10°C eine geringe Temperatur oder pH-Abhängigkeit. Bis 10°C nehmen die Bindungskonstanten mit steigender Temperatur und sinkendem pH signifikant ab.
- ii)  $k_{rT}$  besitzt bis 10°C eine deutliche Temperatur- oder pH-Empfindlichkeit. Oberhalb von 10°C bleibt  $k_{rT}$  konstant.
- iii)  $k_{tT}$  ist gegenüber der Temperatur und dem pH unempfindlich

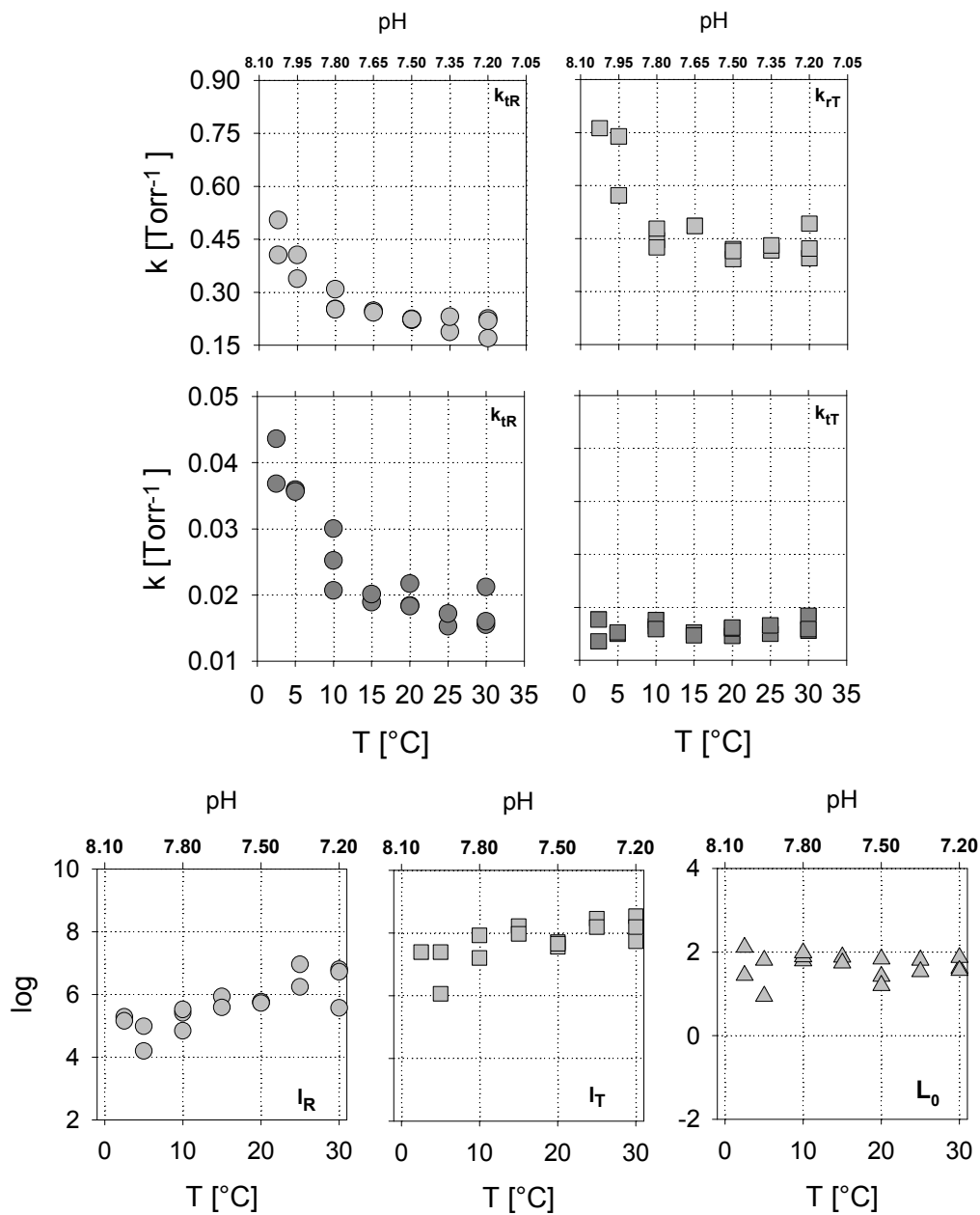
$k_{rR}$  und  $k_{tR}$  fällt von  $0.45 \pm 0.05$  Torr<sup>-1</sup> bzw.  $0.040 \pm 0.0025$  Torr<sup>-1</sup> bei 2.50°C auf  $0.20 \pm 0.025$  Torr<sup>-1</sup> bzw.  $0.020 \pm 0.003$  Torr<sup>-1</sup> bei 30°C. Die Bindungskonstante für die rT-Konformation nimmt ebenfalls von  $0.75$  Torr<sup>-1</sup> bei 2.50°C auf  $0.40 \pm 0.05$  Torr<sup>-1</sup> bei 30°C ab. Die  $k_{tT}$  Bindungskonstante bleibt dagegen in dem beobachteten Temperaturbereich konstant. Die Bindungsaffinität für die tT-Konformation beträgt  $0.0059 \pm 0.0012$  Torr<sup>-1</sup> (Abb. 3.9-7).

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $\log I_R$  und  $\log I_T$  steigen von 5.2 bzw. 7.4 bei 2.50°C auf 6.8 bzw. 8.2 bei 30°C an. Die allosterische Gleichgewichtskonstante  $\log L_0$  für das Gesamtmolekül ist mit  $1.7 \pm 0.4$  um 3 bis 4 Größenordnungen kleiner und unabhängig von Temperatur und pH.



**Abb. 3.9-6:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und -parameter (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>N</sub>) von *P. camtschatica* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.





**Abb. 3.9-7:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und Allosterische Gleichgewichtskonstanten für *P. camtschatica* Hämocyanin ermittelt mit Hilfe des Nesting-Modells. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>.

### 3.9.4 II (pH=const.) *Paralithodes camtschatica* Hämocyanin

♦ der pH ist unabhängig von der Temperatur pH=const.

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden bei 10°C, 20°C und 30° eingestellt. Die Abb. 3.9-8 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven des *P. camtschatica* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.

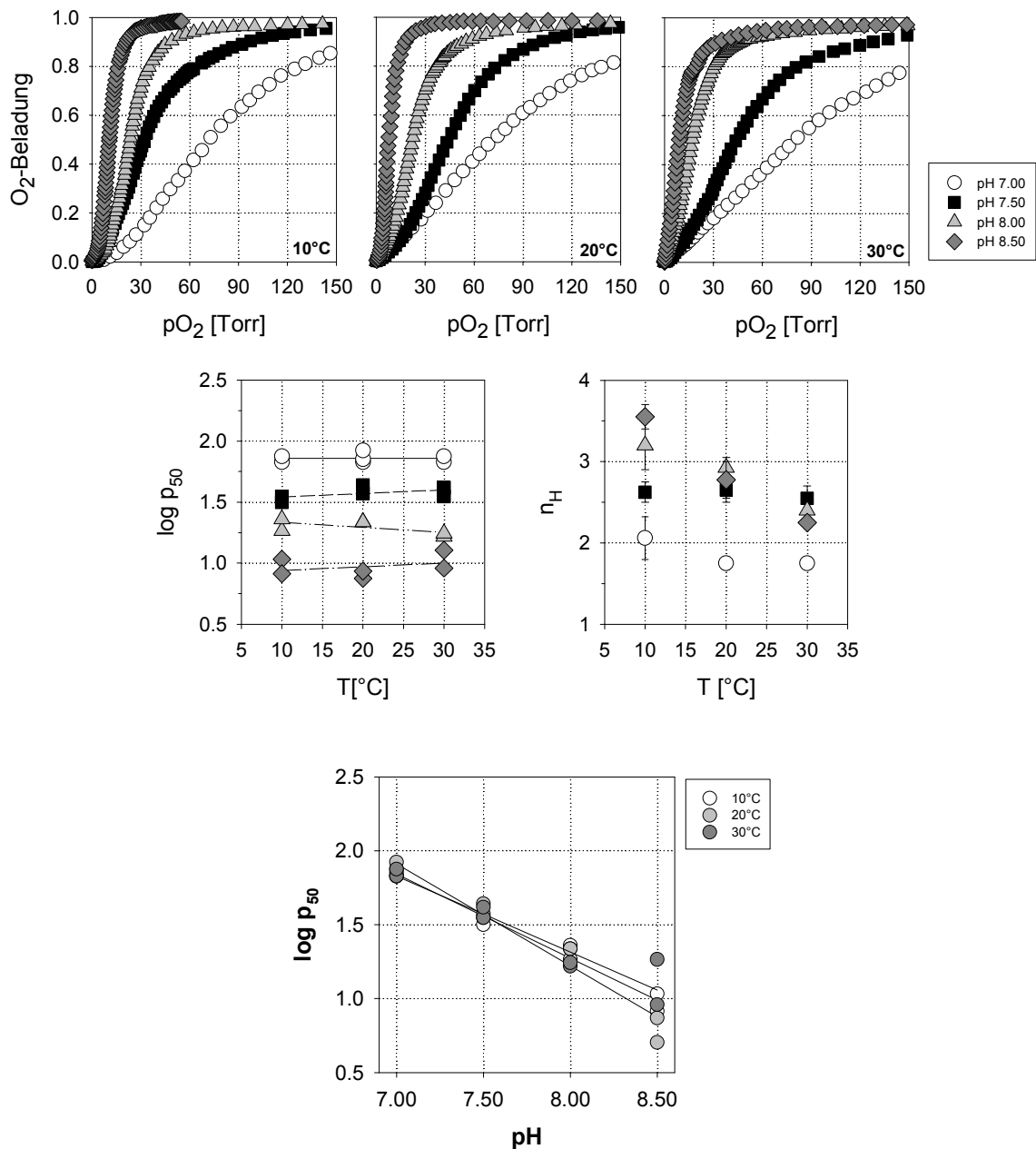
- i) der p<sub>50</sub> ist Temperatur unempfindlich
- ii) n<sub>Hill</sub> fällt mit steigender Temperatur; bei 10°C besitzt der pH den größten Einfluss (Faktor 2) auf die Kooperativität (n<sub>Hill</sub>)

Wird der pH-Wert bei sich ändernder Temperatur fixiert, so bleibt der p<sub>50</sub> mit steigender Temperatur nahezu konstant (Abb. 3.9-8, Mitte links). Bei einem pH von 7.00 und einer Temperatur von 10°C, 20°C und 30°C liegt der p<sub>50</sub> für das native Hämocyanin bei 72.15 ± 6.35 Torr. Für die gleichen Temperaturwerte und einem pH von 7.50 wurde ein p<sub>50</sub> von 37.20 ± 4.20 Torr gemessen. Wird der pH weiter auf 8.00 bzw. 8.50 erhöht, nimmt die Affinität des Hämocyaninmoleküls weiter zu und der p<sub>50</sub> sinkt auf 19.65 ± 2.85 Torr bzw. auf 8.50 ± 3.30 Torr. Der Bohrkoeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) beträgt zwischen pH 7.00 und 8.50 bei 10°C, 20°C und 30°C:

Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$
10°C	-0.57
20°C	-0.69
30°C	-0.57

**Tab. 3.9-5: Die Bohrkoeffizienten von *Paralithodes camtschatica* Hämocyanin.** Ermittelt aus den Regressionsgeraden (Abb. 3.9-8, unten). Der  $\Delta \text{pH}$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Für die Kooperativität (n<sub>H</sub>) zeigt sich eine Temperaturabhängigkeit bei konstant gehaltenem pH-Wert (Abb. 3.9-8, Mitte rechts). Generell ist eine Abnahme der Kooperativität mit steigender Temperatur festzustellen. Die höchste Kooperativität mit einem n<sub>H</sub> von 3.30 bzw. 3.50 wird bei 10°C und pH 8.00 bzw. 8.50 erreicht. Bei 30°C ist n<sub>H</sub> auf ein Wert von 2.30 bei pH 7.50, 8.00 und 8.50 zurück gegangen. Auffällig ist die niedrige Kooperativität (n<sub>H</sub>=2.30) bei 10°C und pH 7.50. Dies scheint eine Ausnahme zu sein und passt nicht zu dem Kooperativitätsverlauf der restlichen pH 7.50 Werte. Bei pH 7.00 werden die niedrigsten n<sub>H</sub>-Werte gemessen: n<sub>H</sub>=2.25 bei 10°C, n<sub>H</sub>=1.70 bei 20°C und n<sub>H</sub>=1.60 bei 30°C.



**Abb. 3.9-8:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven, -parameter und Bohreffekt ( $p_{50}$ ,  $n_H$  und  $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von *P. camtschatica* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

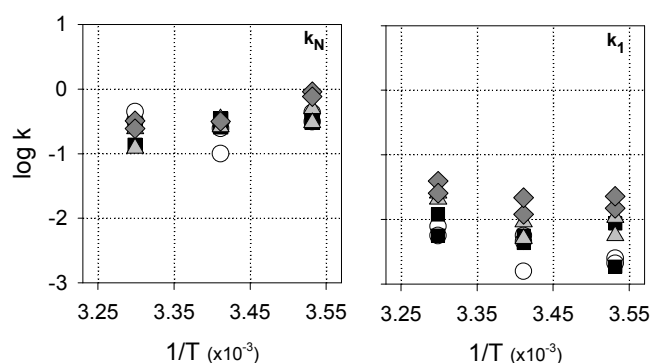
- Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:
  - $k_N$  und  $k_1$  sind invers temperaturempfindlich:  $k_1 \downarrow$  und  $k_1 \uparrow$  wenn die Temperatur steigt
  - die Temperaturempfindlichkeit von  $k_N$  und  $k_1$  ist pH abhängig

Der Verlauf, der mit Hilfe des Hill-Plots bestimmten Bindungskonstanten,  $k_1$  und  $k_N$  für die postulierte hochaffine R- und die niedrigaffine T-Konformation des Hämocyaninmoleküls ist in der Abb. 3.9-9 dargestellt. In dem untersuchten Temperaturbereich zeigen die beiden Bindungskonstanten eine gegenläufige Tendenz. Die Bindungskonstante  $k_N$  wird mit steigender Temperatur kleiner, wobei diese Verringerung der Bindungsaffinität in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Bei pH 7.00 ist  $k_N$  Temperatur unempfindlich.

Temperatur	pH			
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.37±0.06	0.31±0.01	0.40±0.10	0.84±0.07
20°C	0.17±0.07	0.30±0.04	0.30±0.04	0.32
30°C	0.38±0.06	0.21±0.07	0.18±0.06	0.28±0.04
Temperatur	pH			
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.002±0.001	0.005±0.003	0.008±0.002	0.019±0.004
20°C	0.004±0.002	0.005±0.001	0.007±0.002	0.017±0.005
30°C	0.007±0.001	0.009±0.003	0.023±0.002	0.032±0.007

**Tab. 3.9-6:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für die letzte ( $k_N$ ) und erste ( $k_1$ ) Bindungsstelle des *P. camtschatica* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_N$  und  $k_1$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

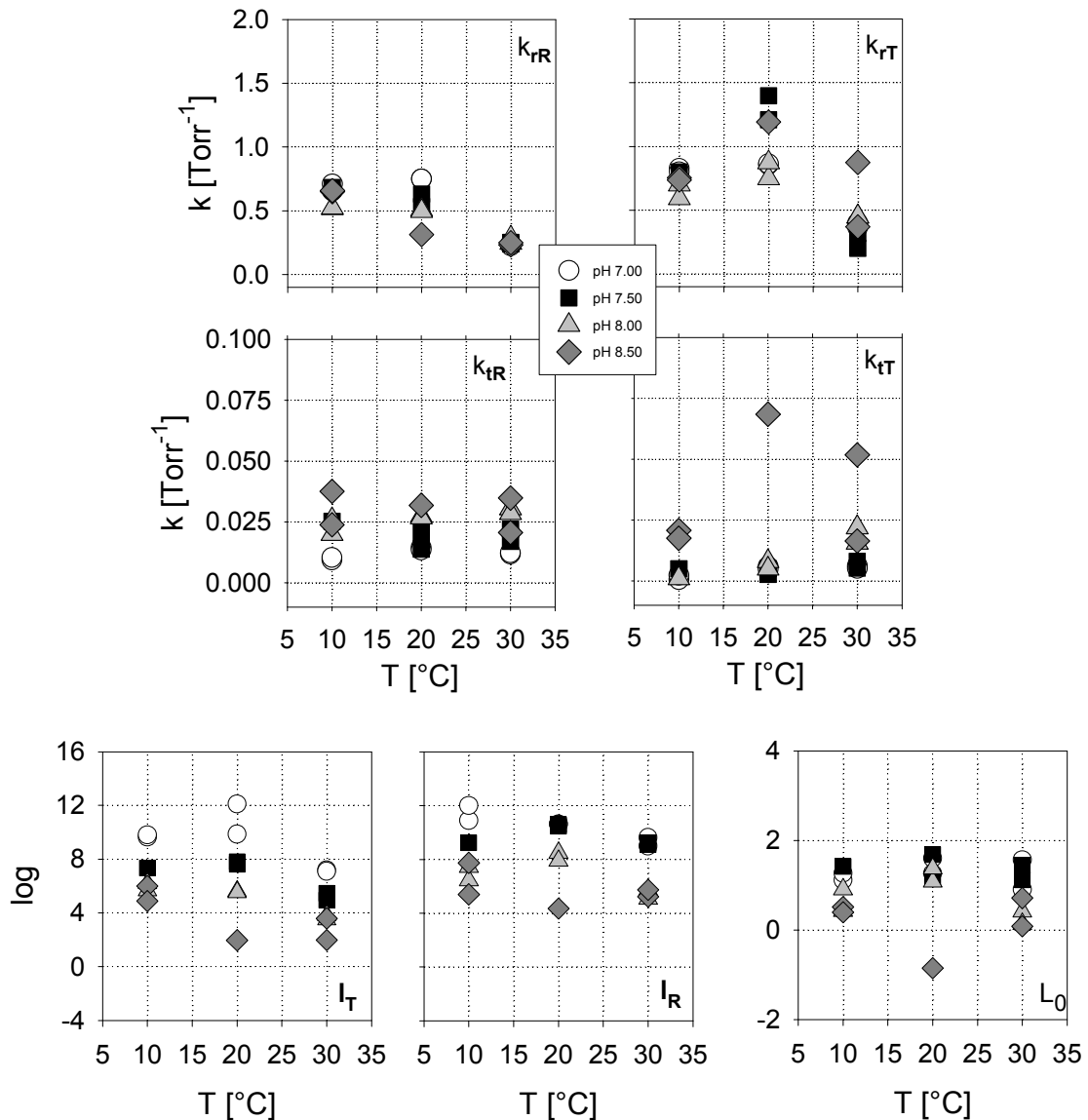
$k_1$  nimmt mit steigender Temperatur zu. Auch hier hatte der jeweils eingestellte pH-Wert der Hämocyaninlösung einen Einfluss auf den Grad der Affinitätszunahme. Bei pH 8.50 war diese am deutlichsten ausgeprägt. Dagegen sind die  $k_1$ -Werte in bei pH 7.50 und 7.00 Temperatur unempfindlich.



**Abb. 3.9-9:** O<sub>2</sub>- Bindungskonstanten ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für das *P. camtschatica* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- Analyse nach dem NESTING-Modell für  $\text{pH}=\text{const.}$ :
  - $k_{rR}$  und  $k_{rT}$  sind Temperatur sensitiv, wobei  $k_{rT}$  am empfindlichsten reagiert
  - $k_{iR}$  und  $k_{iT}$  sind Temperatur unempfindlich

Die Analyse der  $\text{O}_2$ -Bindungskurven des nativen *P. camtschatica* ergibt für die einzelnen Bindungs- und allosterischen Gleichgewichtskonstanten folgenden Verlauf (Abb. 3.9-10).



**Abb. 3.9-10:**  $\text{O}_2$ -Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *P. camtschaticae* Hämocyanin ermittelt mit Hilfe des Nesting-Modells. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Eine temperaturabhängige pH-Drift war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Die Bindungskonstanten  $k_{rR}$ ,  $k_{lR}$ ,  $k_{lT}$  und  $k_{rT}$  sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

Temperatur	pH			
$K_{rR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.68±0.03	0.68	0.52±0.01	0.65±0.01
20°C	0.75±0.01	0.58±0.05	0.50±0.01	0.31
30°C	0.23±0.01	0.25±0.01	0.27±0.02	0.24±0.01
Temperatur	pH			
$K_{lR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0098±0.0005	0.025	0.023±0.003	0.031±0.006
20°C	0.013±0.001	0.017±0.003	0.027±0.001	0.032
30°C	0.012±0.001	0.020±0.003	0.030±0.001	0.028±0.007

**Tab. 3.9-7:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rR}$  und  $k_{lR}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *P. camtschatica* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rT}$  und  $k_{lT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Temperatur	pH			
$K_{lT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0014±0.0009	0.0050	0.0010	0.019±0.002
20°C	0.0053±0.0006	0.0039±0.0012	0.0066±0.0016	0.069
30°C	0.0056±0.0005	0.0066±0.0014	0.019±0.003	0.034±0.02
Temperatur	pH			
$K_{rT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.81±0.01	0.80	0.65±0.05	0.75±0.01
20°C	0.86±0.01	1.30±0.09	0.81±0.06	1.19
30°C	0.38±0.02	0.17±0.15	0.45±0.00	0.62±0.25

**Tab. 3.9-8:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rT}$  und  $k_{lT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *P. camtschatica* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rT}$  und  $k_{lT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $l_T$  und  $l_R$  zeigen gegenüber dem pH eine größere Empfindlichkeit als gegenüber der Temperatur. Desto größer die H<sup>+</sup>-Konzentration (niedriger pH), um so größer die Werte für log  $l_T$  und log  $l_R$ . In dem untersuchten Temperaturbereich und einem pH von 7.00 haben log  $l_T$  und log  $l_R$  Werte von  $10.0 \pm 1.5$  bzw.  $10 \pm 2.0$ . Wird der pH auf 8.50 erhöht, so verringern sich log  $l_T$  und log  $l_R$  auf  $5.0 \pm 1.0$  bzw.  $3.75 \pm 1.60$ . Eine pH-Abhängigkeit und relative Temperaturunempfindlichkeit ergibt die Analyse auch bei der allosterischen Gleichgewichtskonstanten für das Gesamtmolekül  $L_0$ . Der Verlauf zeigt tendenziell für niedrige pH-Werte größere und für höhere pH-Werte kleinere  $L_0$ -Werte (Abb. 3.9-10; unten).

### 3.9.5 I (pH=pH(T)) *Eurytelma californicum* Hämocyanin

◆ *der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)*

Die Abb. 3.9-11 auf der nächsten Seite zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven und die dazugehörigen Bindungsparameter des Spinnenhämocyanins bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.80 eingestellt und variiert in Abhängigkeit von der Temperatur.

- i) der p<sub>50</sub> nimmt signifikant mit steigender Temperatur und sinkendem pH zu
- ii) die Kooperativität (n<sub>H</sub>) ist bis 15°C Temperatur und pH abhängig; oberhalb von 15°C bleibt n<sub>H</sub> konstant

Der Wert für den p<sub>50</sub>, d.h. der pO<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck, nimmt von 2.45±0.175 Torr bei 5°C auf 26.20±0.70 Torr bei 30°C zu. Der pH-Wert in diesem Temperaturbereich fällt von 8.25 auf 7.50, was einem ΔpH/°C von 0.03 pH-Einheiten entspricht. Der Bohr-Koeffizient (Δlogp50/ΔpH(T)) beträgt -1.32 .

Der n<sub>H</sub>, als Maß für die Kooperativität der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyaninmolekül, erreicht die höchsten Werte von 6.50 bei 20°C (pH 7.80) und bleibt mit weiter steigender Temperatur bis auf 30°C (pH 7.50) nahezu unverändert.

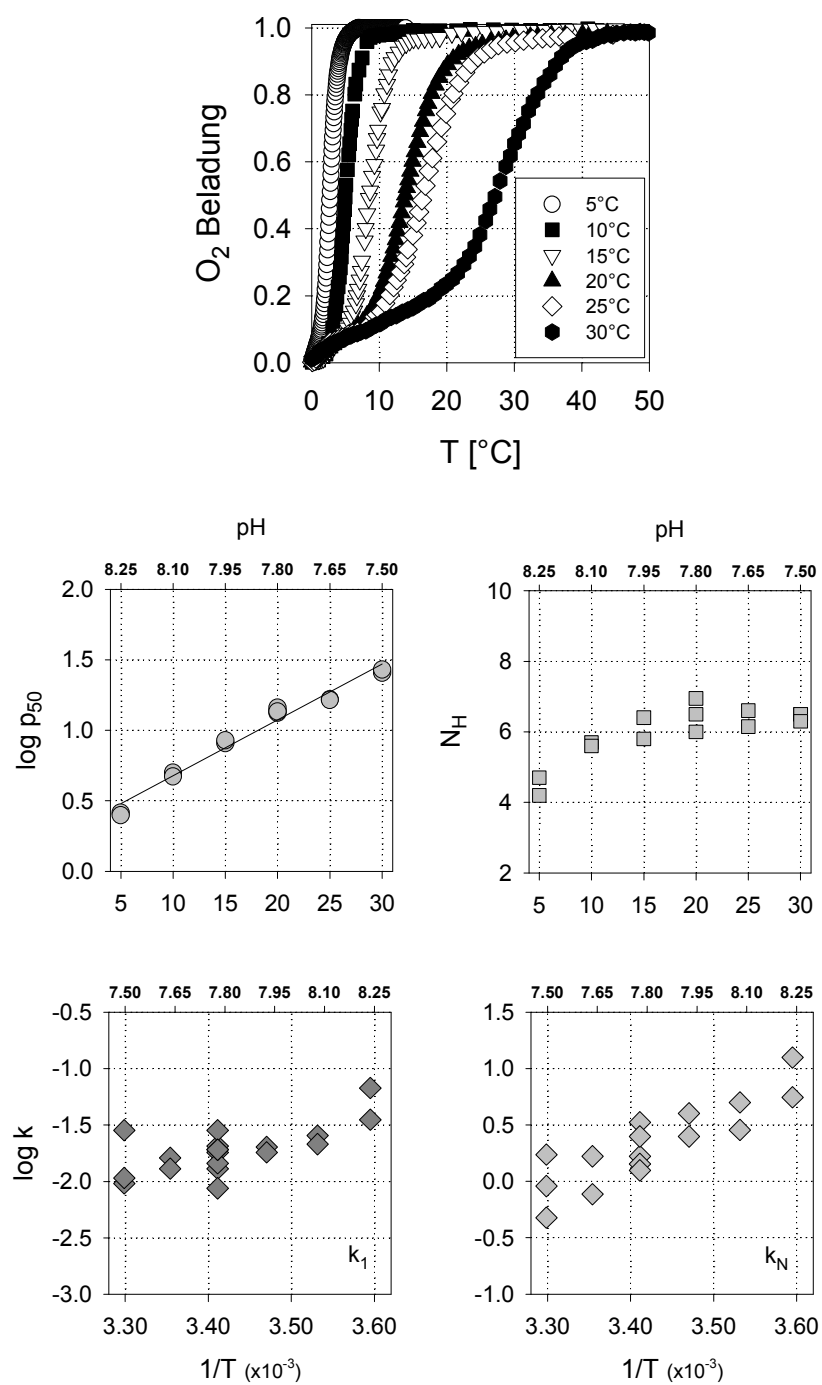
Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten Bindungskonstanten k<sub>1</sub> und k<sub>N</sub> werden mit zunehmender Erwärmung und abnehmendem pH-Wert kleiner (Abb. 3.9-11, unten). Die Bindungskonstante k<sub>N</sub> für die R-Konformation fällt von einem maximalen Wert von 9.10±3.48 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C (pH 8.25) auf 0.96±0.46 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C (pH 7.50). Die T-Konformation erreicht bei 5°C ein maximales k<sub>1</sub> von 0.047±0.016 Torr<sup>-1</sup>, mit fortschreitender Erwärmung bis 30°C fällt k<sub>1</sub> auf einen Wert von 0.015±0.01 Torr<sup>-1</sup>.

• *Analyse nach dem NESTING-Modell für pH=pH(T)*

- i) k<sub>fR</sub>, k<sub>fR</sub> und k<sub>fT</sub> sind unabhängig von der Temperatur und pH, wobei k<sub>fT</sub> bei 5°C einen Ausreißer aufweist.
- ii) k<sub>fT</sub> ist gegenüber der Temperatur oder dem pH abhängig.

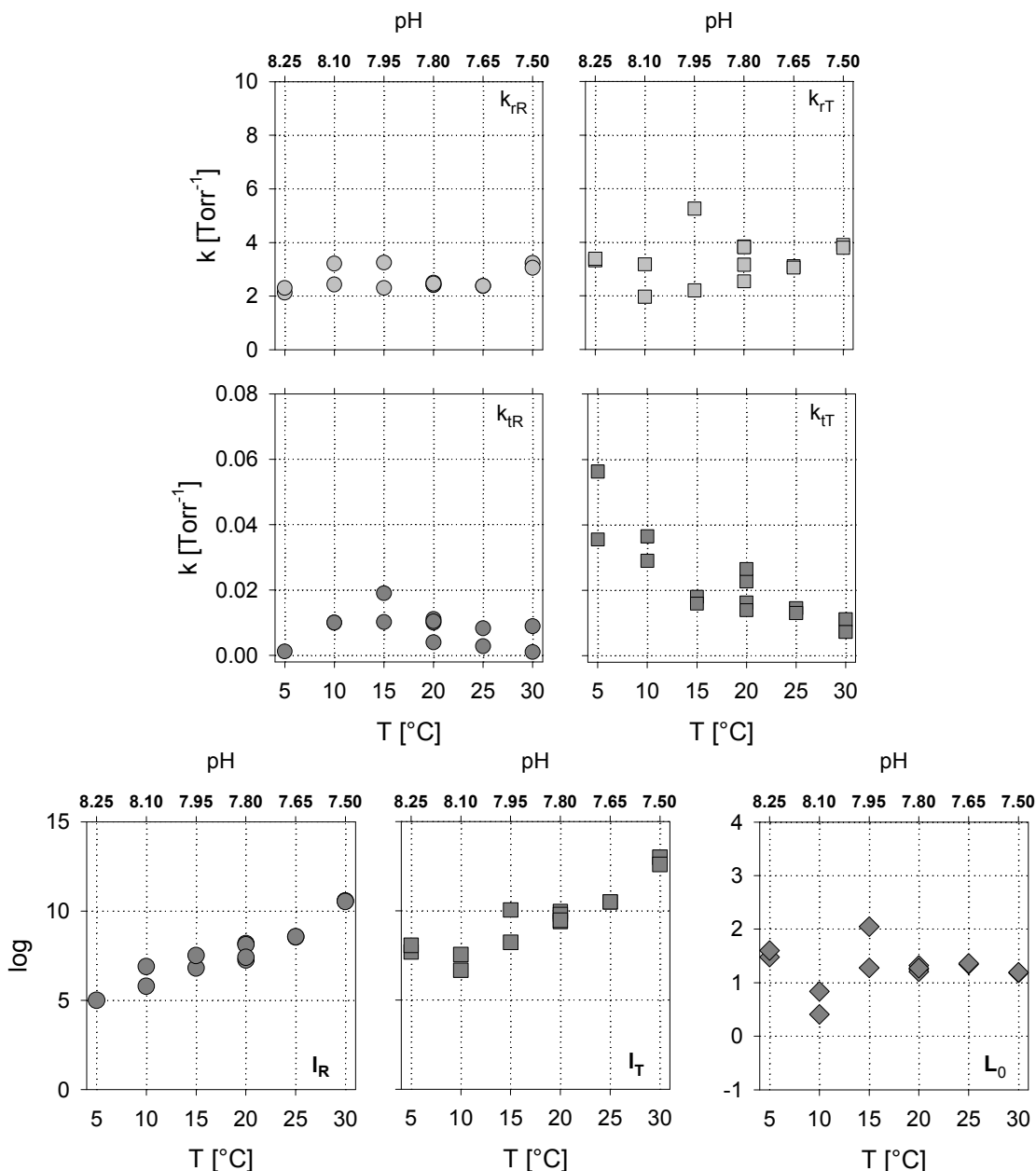
Neben der graphischen Bestimmung der Bindungskonstanten für die R- und T-Konformation wurden die Bindungskurven mit Hilfe des Nesting-Modells analysiert. Mit einer auf diesem Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die vier postulierten Bindungskonstanten k<sub>fR</sub>, k<sub>fR</sub>, k<sub>fT</sub> und k<sub>fT</sub>, sowie die drei allosterischen Gleichgewichtskonstanten l<sub>R</sub>, l<sub>T</sub> und L<sub>0</sub> bestimmen. Wie die Abb. 3.9-12 zeigt ist die Bindungskonstante k<sub>fR</sub> mit einem Wert von 2.62±0.41 Torr<sup>-1</sup> im untersuchten Temperaturintervall konstant. Der k<sub>fT</sub>-Wert mit 3.38±0.86 Torr<sup>-1</sup> kann in diesem Temperatur- bzw. pH-Bereich (außer bei 5°C) ebenfalls als konstant betrachtet werden. Zu einer deutlichen Abweichung kommt es bei 5°C, hier besitzt k<sub>fT</sub> mit 8.57±0.74 Torr<sup>-1</sup> einen erheblich größeren Wert. k<sub>fR</sub> mit 0.008±0.005 Torr<sup>-1</sup> zeigt keine Temperatur oder pH Abhängigkeit. Nur k<sub>fT</sub> reagiert signifikant empfindlich auf verschiedene Temperatur- und pH-Werte. k<sub>fT</sub> fällt von 0.046±0.010 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C und pH 8.25 auf 0.009±0.002 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C und pH 7.50 .

Beobachtet man in der Abb. 3.9-12 den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Halbmoleküle mit steigender Temperatur, so nehmen die Werte für log l<sub>R</sub> und log l<sub>T</sub> von 5.0 auf 10.5 bzw. von 7.70 auf 12.60 zu. Die Gleichgewichtskonstante log L<sub>0</sub> für das gesamte Hämocyaninmolekül kann in dem untersuchten Temperaturbereich mit 1.27±0.36 als konstant angesehen werden. Die Werte für log L<sub>0</sub> sind im Vergleich zu log l<sub>R</sub> und log l<sub>T</sub> um bis zu 10 Größenordnungen kleiner.



**Abb. 3.9-11:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und -parameter (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>N</sub>, k<sub>1</sub>) von *E. californicum* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.80 bei 20°C eingestellt. Der Temperatur induzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

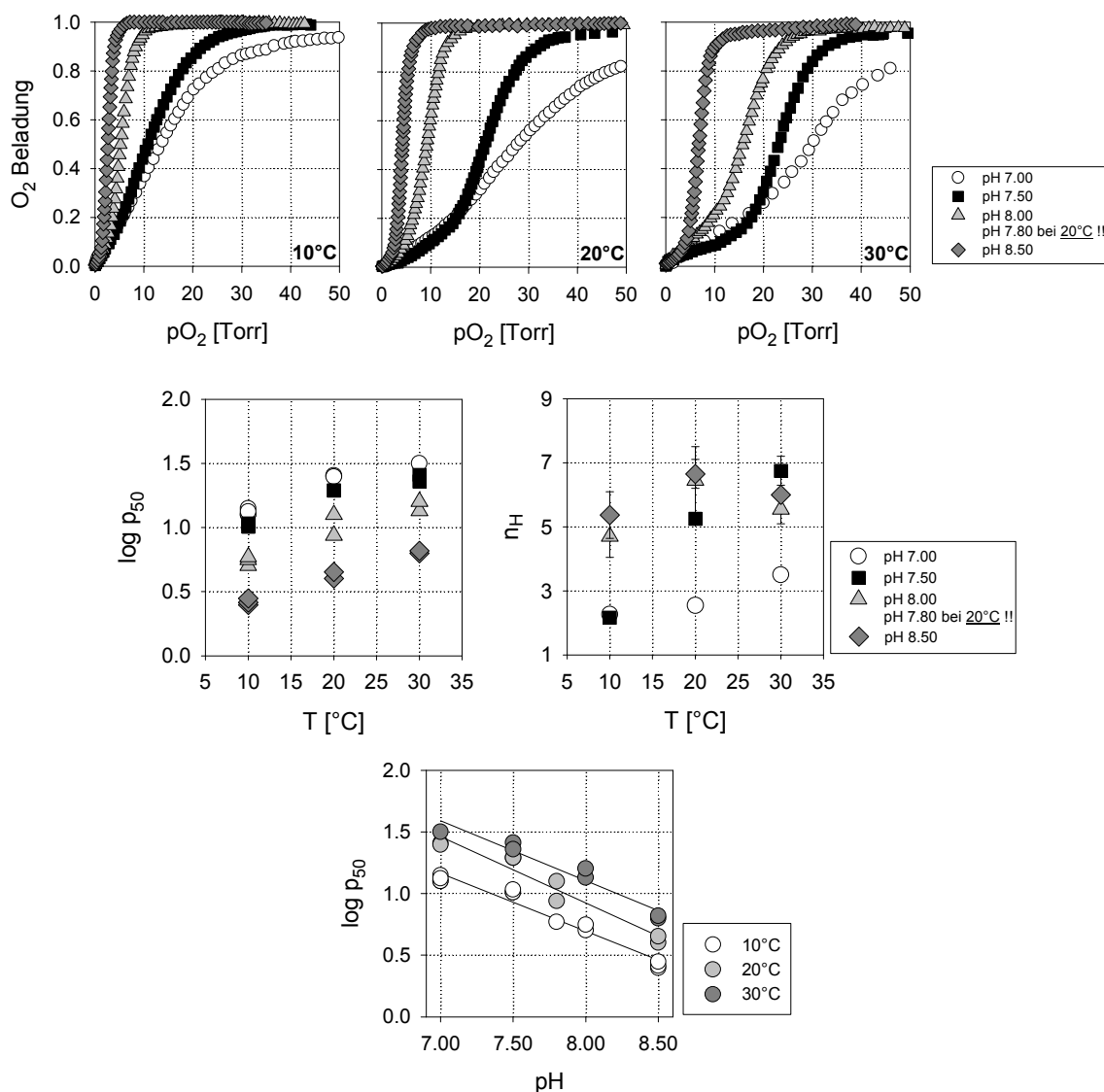




**Abb. 3.9-12:**  $\text{O}_2$ -Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *E. californicum* Hämocyanin. Die Datenanalyse erfolgte nach dem Nesting-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.80 bei  $20^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM  $\text{MgCl}_2$ .

3.9.6 II (pH=const.) *Eurypelma californicum* Hämocyanin

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 (pH 7.80 bei 20°C) und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-13 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven des *E. californicum* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-13:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven -parameter und Bohreffekt ( $p_{50}$ ,  $n_H$  und  $\Delta \log p_{50} / \Delta pH$ ) von *E. californicum* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 (7.80 bei 20°C) und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

- ◆ *der pH ist unabhängig von der Temperatur  $pH=const.$* 
  - i) der  $p_{50}$  nimmt mit steigender Temperatur zu
  - ii) der  $p_{50}$  nimmt mit zunehmenden pH ab
  - iii) die Kooperativität ( $n_H$ ) ist bei 20°C und basischem pH am größten

Betrachtet man den Verlauf des  $p_{50}$  (Abb. 3.9-13, Mitte, links), so wird deutlich, dass bei einem pH von 7.00 der Einfluss der Temperatur auf die Affinität des Hämocyans weniger stark ausgeprägt ist. Von 10°C auf 30°C nimmt der  $O_2$ -Halbsättigungsdruck von  $13.15 \pm 0.62$  Torr auf 31.60 Torr zu (2.4 x fach). Mit zunehmend basischeren pH-Werten wird dieser Temperatureffekt auf den  $p_{50}$  stärker. Bei pH 7.50 steigt der  $p_{50}$  von  $10.20 \pm 0.01$  Torr bei 10°C auf  $23.50 \pm 0.60$  Torr bei 30°C an (2.3 x fach). Wird der pH auf 8.00 eingestellt, verändert sich der  $p_{50}$  des *E. californicum* Hämocyans von  $5.33 \pm 0.28$  Torr bei 10°C auf  $14.56 \pm 1.95$  Torr bei 30°C (2.7 x fach). Für pH 8.50 wird bei 10°C ein  $p_{50}$  von  $2.55 \pm 0.05$  Torr gemessen, bei 30°C erhöht sich dieser auf  $8.50 \pm 0.01$  Torr (3.3 x fach). Die Berechnung des Bohrkoeffizienten ( $\Delta \log p_{50} / \Delta pH$ ) für die jeweilige Temperatur, zeigt keinen Temperatureinfluss auf die Bindungseigenschaften des *E. californicum* Hämocyans. Die Tabelle 3.9-9 listet die ermittelten Bohrkoeffizienten bei den untersuchten Temperaturen auf.

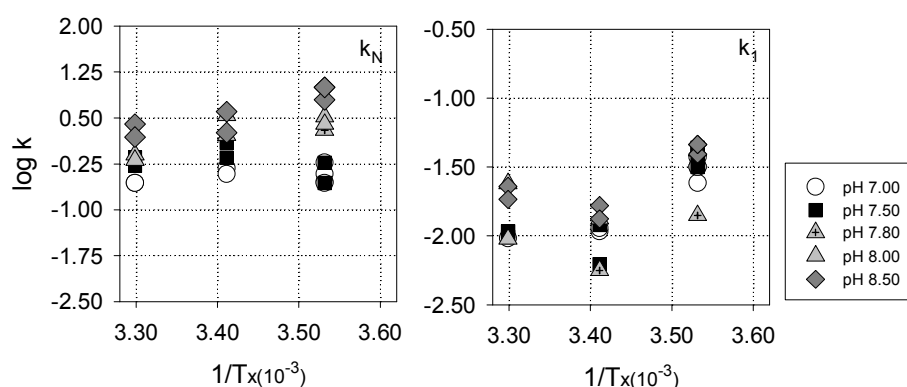
Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta pH$
10°C	-0.47
20°C	-0.54
30°C	-0.49

**Tab. 3.9-9: Der Bohreffekt von *E. californicum* Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.** Der  $\Delta pH$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 (7.80 bei 20°C) und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) (Abb. 3.9-13, Mitte, rechts) als das Maß für die Kooperativität der  $O_2$ -Bindung an das *E. californicum* Hämocyanin, hat bei 20°C und einem pH von 8.50 und 8.00 ein Optimum mit einem maximal Wert von 6.6. Wird der pH auf 7.50 eingestellt, steigt die Kooperativität linear von 2.1 bei 10°C auf 6.5 bei 30°C an. Die niedrigsten Kooperativitätswerte werden bei einem pH-Wert von 7.00 gemessen. Mit steigender Temperatur nimmt hier, wenn auch weit aus geringer als bei pH 7.50, der Hill-Koeffizient zu. Bei 10°C besitzt  $n_H$  einen Wert von 2.1, bei 20°C von 2.5 und bei 30°C werden 3.5 erreicht.

- Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:
  - i)  $k_N$  ist Temperatur und pH empfindlich:  $k_N \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt
  - ii) die Temperatur- und pH-Empfindlichkeit ist bei  $k_1$  etwas schwächer ausgeprägt:  $k_1 \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt

Die Abb. 3.9-14 zeigt den Verlauf der aus dem Hill-Plot bestimmten Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Wird die Hämocyaninlösung auf pH 7.00 und 7.50 eingestellt, zeigt sich für  $k_N$  kein eindeutiger Temperatureffekt und  $k_N$  kann mit  $0.37 \pm 0.13 \text{ Torr}^{-1}$  bzw.  $0.72 \pm 0.35 \text{ Torr}^{-1}$  bei pH 7.00 bzw. 7.50 in dem untersuchten Temperaturbereich als konstant betrachtet werden. Bei pH 8.00 fällt  $k_N$  von  $2.61 \pm 0.55 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $0.72 \pm 0.08 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Bei pH 8.50 ist der Einfluss der Temperatur auf die Bindungskonstante am stärksten:  $k_N$  verringert sich von  $8.67 \pm 1.71 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $2.02 \pm 0.48$  bei  $30^\circ\text{C}$ .



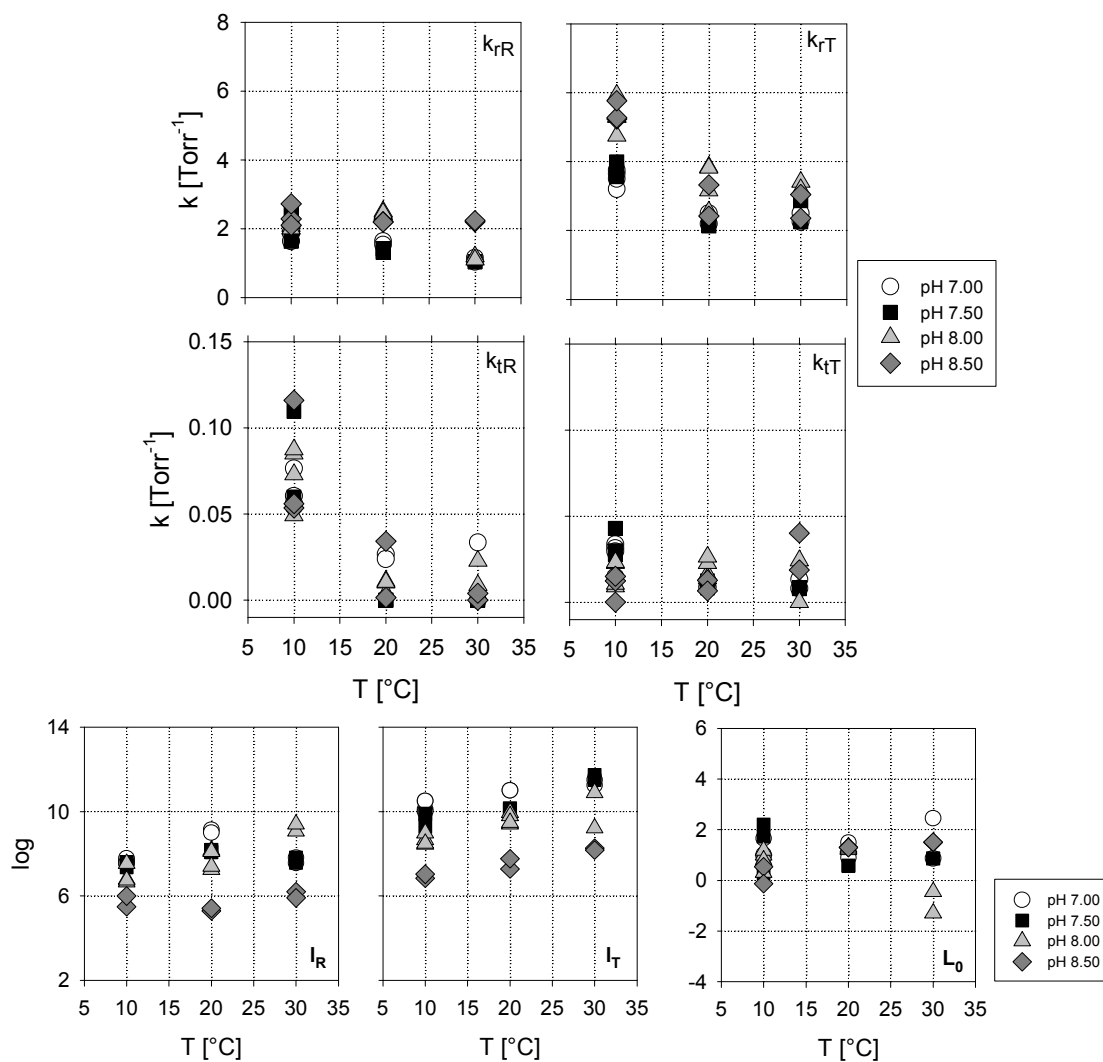
**Abb. 3.9-14:** O<sub>2</sub>-Bindungsparameter ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für *E. californicum* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 (7.80 bei  $20^\circ\text{C}$ ) und 8.50 bei jeweils  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Temperatur	pH			
$k_1 [\text{Torr}^{-1}]$	<b>7.00</b>	<b>7.50</b>	<b>8.00</b> (7.80 bei $20^\circ\text{C}$ )	<b>8.50</b>
<b><math>10^\circ\text{C}</math></b>	$0.031 \pm 0.005$	$0.037 \pm 0.004$	$0.032 \pm 0.013$	$0.044 \pm 0.003$
<b><math>20^\circ\text{C}</math></b>	$0.011 \pm 0.001$	$0.009 \pm 0.003$	$0.010 \pm 0.004$	$0.015 \pm 0.002$
<b><math>30^\circ\text{C}</math></b>	$0.009$	$0.010 \pm 0.001$	$0.017 \pm 0.007$	$0.021 \pm 0.002$
Temperatur	pH			
$k_N [\text{Torr}^{-1}]$	<b>7.00</b>	<b>7.50</b>	<b>8.00</b> (7.80 bei $20^\circ\text{C}$ )	<b>8.50</b>
<b><math>10^\circ\text{C}</math></b>	$0.38 \pm 0.13$	$0.43 \pm 0.16$	$2.61 \pm 0.55$	$8.67 \pm 1.71$
<b><math>20^\circ\text{C}</math></b>	$0.43 \pm 0.05$	$0.98 \pm 0.27$	$2.58 \pm 0.92$	$2.91 \pm 1.09$
<b><math>30^\circ\text{C}</math></b>	$0.27 \pm 0.00$	$0.62 \pm 0.10$	$0.72 \pm 0.08$	$2.02 \pm 0.48$

**Tab. 3.9-10:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *E. californicum* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Die Bindungskonstante  $k_1$  (Abb. 3.9-14, rechts) zeigt bei  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eine signifikante pH-Empfindlichkeit:  $k_1$  nimmt mit abnehmender  $\text{H}^+$ -Konzentration zu. Der Temperatureinfluss ist weniger deutlich ausgeprägt:  $k_1$  wird mit steigender Temperatur tendenziell kleiner.

- Analyse nach dem Nesting-Modell für  $\text{pH}=\text{const.}$ 
  - i)  $k_{rR}$  ist Temperatur empfindlich, zeigt aber keine signifikante pH-Empfindlichkeit
  - ii)  $k_{tT}$  ist Temperatur und pH unabhängig
  - iii)  $k_{rR}$  nimmt bis  $20^\circ\text{C}$  ab und bleibt dann konstant; keine signifikante pH-Abhängigkeit zu erkennen
  - iv)  $k_{rT}$  nimmt bis  $20^\circ\text{C}$  ab und bleibt dann konstant;  $k_{rT}$  ist pH abhängig



**Abb. 3.9-15:**  $\text{O}_2$ -Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *E. californicum* Hämocyanin. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 (7.80 bei  $20^\circ\text{C}$ ) und 8.50 bei jeweils  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eingestellt. Eine Temperatur abhängige pH-Drift war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in einem  $0.1 \text{ M}$  TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von  $5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  und  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ .

Temperatur	pH			
$k_{rR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	1.87±0.16	2.09±0.35	2.07±0.08	2.37±0.26
20°C	1.59±0.05	1.37±0.05	2.45±0.04	2.20±0.01
30°C	1.09±0.06	1.04±0.01	1.15±0.05	2.22±0.02
Temperatur	pH			
$k_{tR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.062±0.009	0.085±0.025	0.074±0.015	0.075±0.029
20°C	0.025±0.001	4×10 <sup>-5</sup> ±2×10 <sup>-5</sup>	0.009±0.003	0.018±0.016
30°C	0.017±0.017	0.001±0.001	0.016±0.007	0.002±0.002

**Tab. 3.9-11:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rR}$  und  $k_{tR}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der R-Konformation des *E. californicum* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rR}$  und  $k_{tR}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Temperatur	pH			
$K_{tT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.027±0.008	0.034±0.007	0.016±0.007	0.014±0.001
20°C	0.009±0.001	0.010±0.002	0.020±0.005	0.010±0.003
30°C	0.011±0.003	0.008±0.001	0.012±0.012	0.030±0.011
Temperatur	pH			
$k_{rT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	3.52±0.21	3.78±0.18	5.32±0.42	5.43±0.24
20°C	2.35±0.15	2.22±0.08	3.34±0.54	2.87±0.45
30°C	2.38±0.13	2.56±0.31	3.30±0.10	2.70±0.35

**Tab. 3.9-12:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rT}$  und  $k_{tT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *E. californicum* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rT}$  und  $k_{tT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Die allosterischen Bindungskonstanten  $l_T$  und  $l_R$  zeigen gegenüber dem pH eine größere Empfindlichkeit als gegenüber der Temperatur. Je höher die H<sup>+</sup>-Konzentration (niedriger pH), desto größer die Werte für log  $l_R$  und log  $l_T$ . Eine Ausnahme sind die Werte für log  $l_R$  bei 30°C und pH 7.00 und 7.50.

In dem untersuchten Temperaturbereich und einem pH von 7.00 hatten log  $l_R$  und log  $l_T$  Werte von 8.00 ± 0.70 bzw. 10.60 ± 0.40. Wird der pH auf 8.50 erhöht, so verringern sich die Werte für log  $l_R$  und log  $l_T$  auf 5.55 ± 0.35 bzw. 7.45 ± 0.60 (Abb. 3.9-15, unten). Die Analyse der allosterischen Bindungskonstanten für das Gesamtmolekül  $L_0$  zeigt eine Temperatur- und pH-Unempfindlichkeit. Für die untersuchten Bedingungen (pH und Temperatur) liegt der ermittelte Wert für log  $L_0$  bei 1.30 ± 0.50. (Abb. 3.9-15, unten).

### 3.9.7 I (pH=pH(T)) *Homarus americanus* Hämocyanin

◆ *der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)*

Die Abb. 3.9-16 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variiert in Abhängigkeit von der Temperatur.

- i) der p<sub>50</sub> nimmt signifikant mit steigender Temperatur bis 25°C und sinkendem pH zu und bleibt dann bis 30°C konstant
- ii) die Kooperativität (n<sub>H</sub>) ist bis 20°C Temperatur und pH unabhängig; bei einer Erhöhung der Temperatur auf 30°C nimmt n<sub>H</sub> ab

Der p<sub>50</sub>, d.h. der pO<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck, nimmt von 17.49±0.94 Torr bei 5°C auf 78.48±3.48 Torr bei 30°C zu. Der pH-Wert in diesem Temperaturbereich fällt von 7.95 auf 7.20, was einem ΔpH/°C von 0.03 pH-Einheiten entspricht. Der Bohrkoeffizient Δlogp<sub>50</sub>/ΔpH(T) beträgt -0.94 .

Die Kooperativität (n<sub>H</sub>) der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyaninmolekül bleibt zwischen 5°C und 20°C, mit n<sub>H</sub>=4.05±0.35 konstant. Steigt die Temperatur auf 30°C geht die Kooperativität auf 2.65±0.12 zurück.

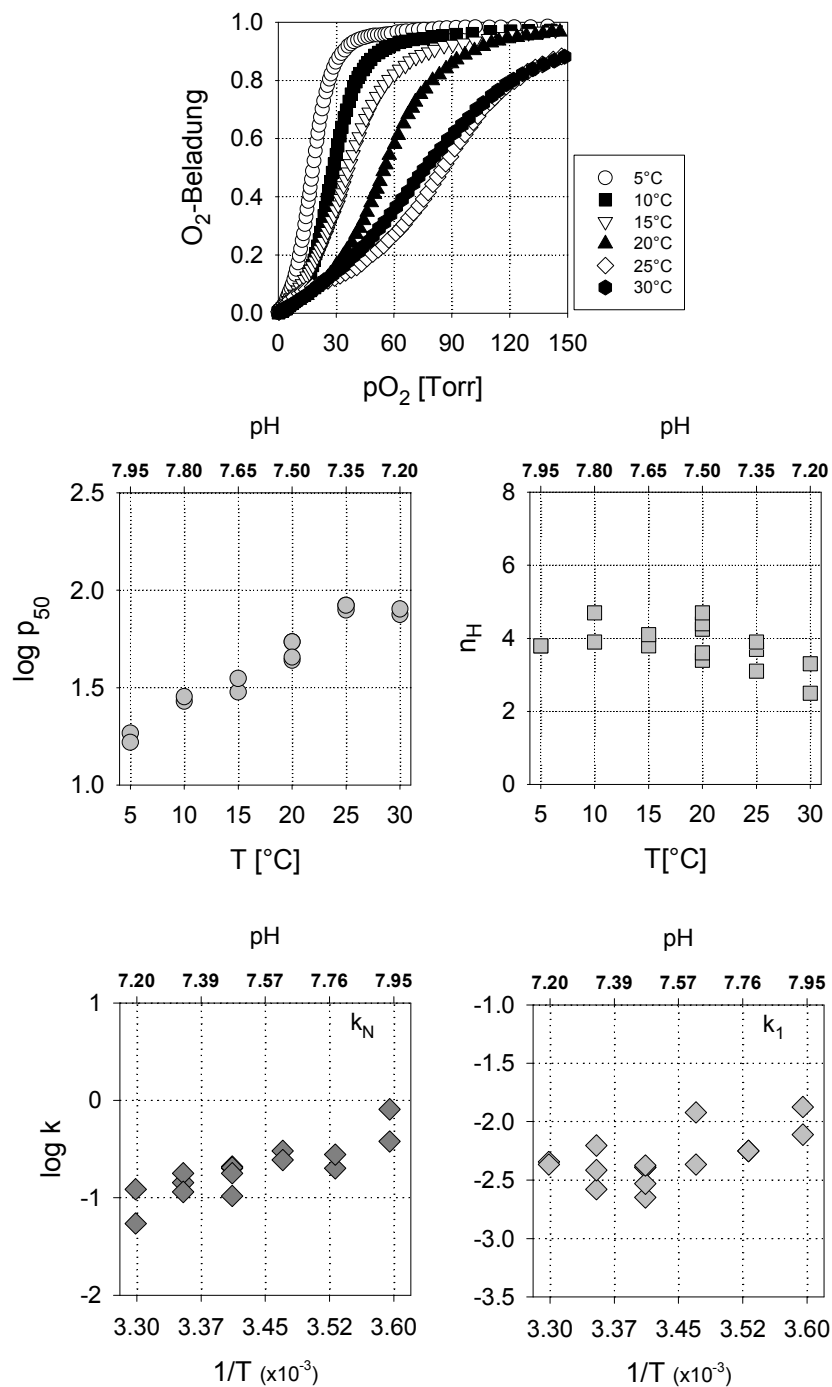
Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten Bindungskonstanten k<sub>1</sub> und k<sub>N</sub> werden mit zunehmender Erwärmung kleiner (Abb. 3.9-16, unten). Die Bindungskonstante für die R-Konformation fällt von einem maximalen Wert von 0.38 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C (pH 7.95) auf 0.088±0.034 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C (pH 7.20). Die T-Konformation erreicht bei 5°C eine maximale Bindungskonstante von 0.010±0.003 Torr<sup>-1</sup>, mit fortschreitender Erwärmung bis auf 30°C fällt diese auf einen Wert von 0.0044±0.0002 Torr<sup>-1</sup>.

• *Analyse nach dem NESTING-Modell für pH=pH(T)*

- i) k<sub>rR</sub> und k<sub>tR</sub> sind unabhängig von der Temperatur und pH.
- ii) k<sub>rT</sub> und k<sub>tT</sub> zeigen eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Temperatur und pH.

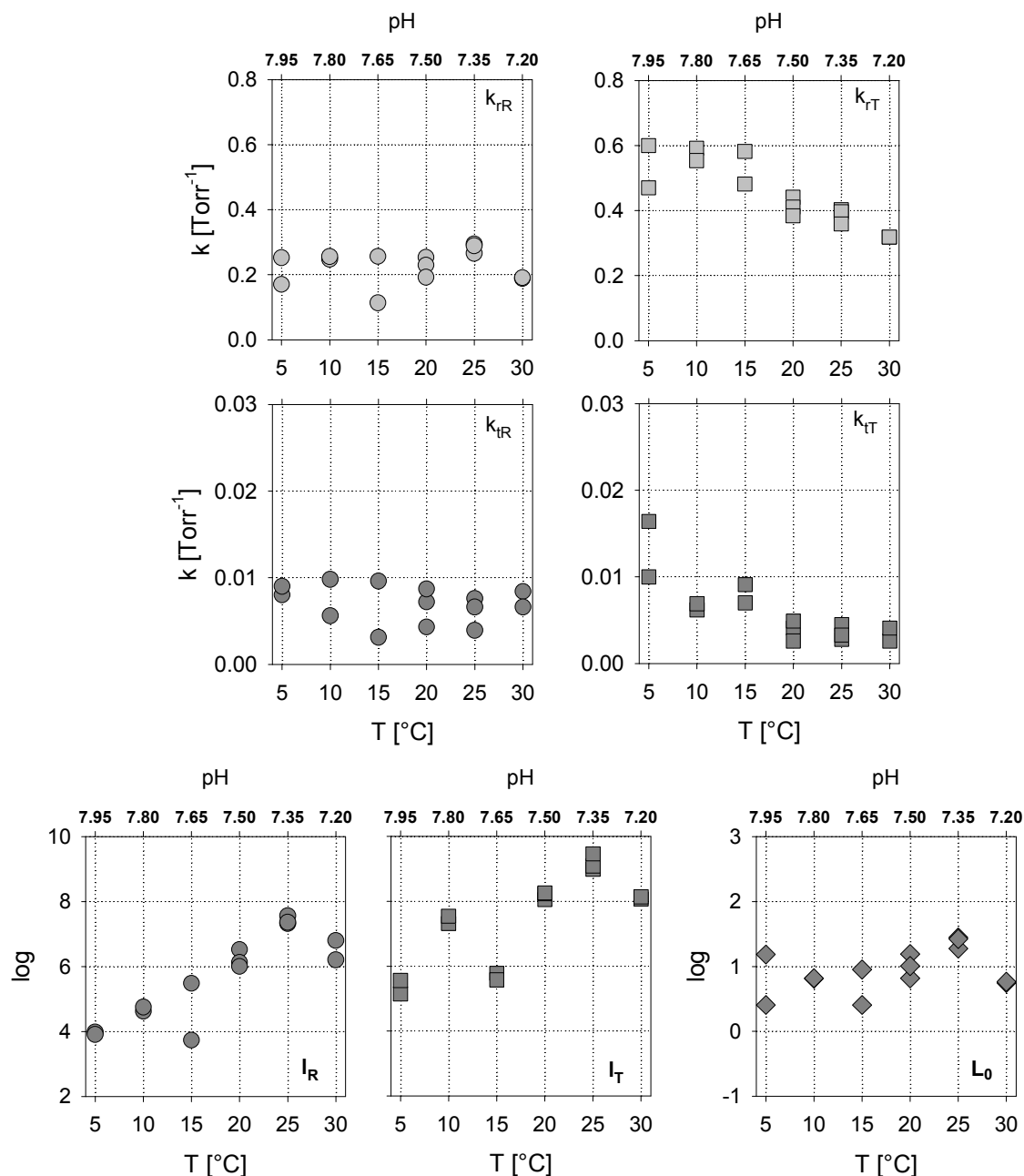
Neben der graphischen Bestimmung der Bindungskonstanten für die R- und T-Konformation wurden die Bindungskurven mit Hilfe des Nesting-Modells analysiert. Mit einer auf diesem Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die vier Bindungskonstanten k<sub>rR</sub>, k<sub>tR</sub>, k<sub>rT</sub> und k<sub>tT</sub>, sowie die drei allosterischen Gleichgewichtskonstanten l<sub>R</sub>, l<sub>T</sub> und L<sub>0</sub> bestimmen. Die Bindungskonstante k<sub>rR</sub> mit 0.24±0.05 Torr<sup>-1</sup> ist in dem untersuchten Temperaturintervall von 5°C bis 30°C konstant (Abb. 3.9-17). k<sub>tR</sub> ist mit 0.007±0.002 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C bis 30°C ebenfalls konstant. k<sub>rT</sub> verringert sich zwischen 5°C und 30°C von 0.54±0.07 Torr<sup>-1</sup> auf 0.32±0.00 Torr<sup>-1</sup>. Die Bindungskonstante k<sub>tT</sub> verringert sich 0.013±0.003 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C auf 0.003±0.001 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C.

Beobachtet man in der Abb. 3.9-17 den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Halbmoleküle mit steigender Temperatur bis 25°C und dem korrespondierenden pH-Wert, so nehmen die Werte für log l<sub>R</sub> und log l<sub>T</sub> von 4.31±0.18 auf 7.44±0.12 bzw. von 5.35±0.21 auf 9.27±0.18 zu. Wird die Temperatur auf 30°C erhöht, so verringern sich beide allosterischen Gleichgewichtskonstanten auf 6.50±0.30 bzw. 8.11±0.04. Die Gleichgewichtskonstante log L<sub>0</sub> für das gesamte Hämocyaninmolekül nimmt von 0.74±0.03 bei 5°C auf 1.44±0.01 bei 25°C zu. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 30°C führt zu einer Abnahme von log L<sub>0</sub> auf 0.75±0.00. Die Werte für log L<sub>0</sub> sind im Vergleich zu log l<sub>R</sub> und log l<sub>T</sub> bis zu zehn Größenordnungen kleiner.



**Abb. 3.9-16: O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Bindungsparameter ( $p_{50}$ ,  $n_H$ ,  $k_N$ ,  $k_1$ ) von *H. americanus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der Temperatur induzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.**



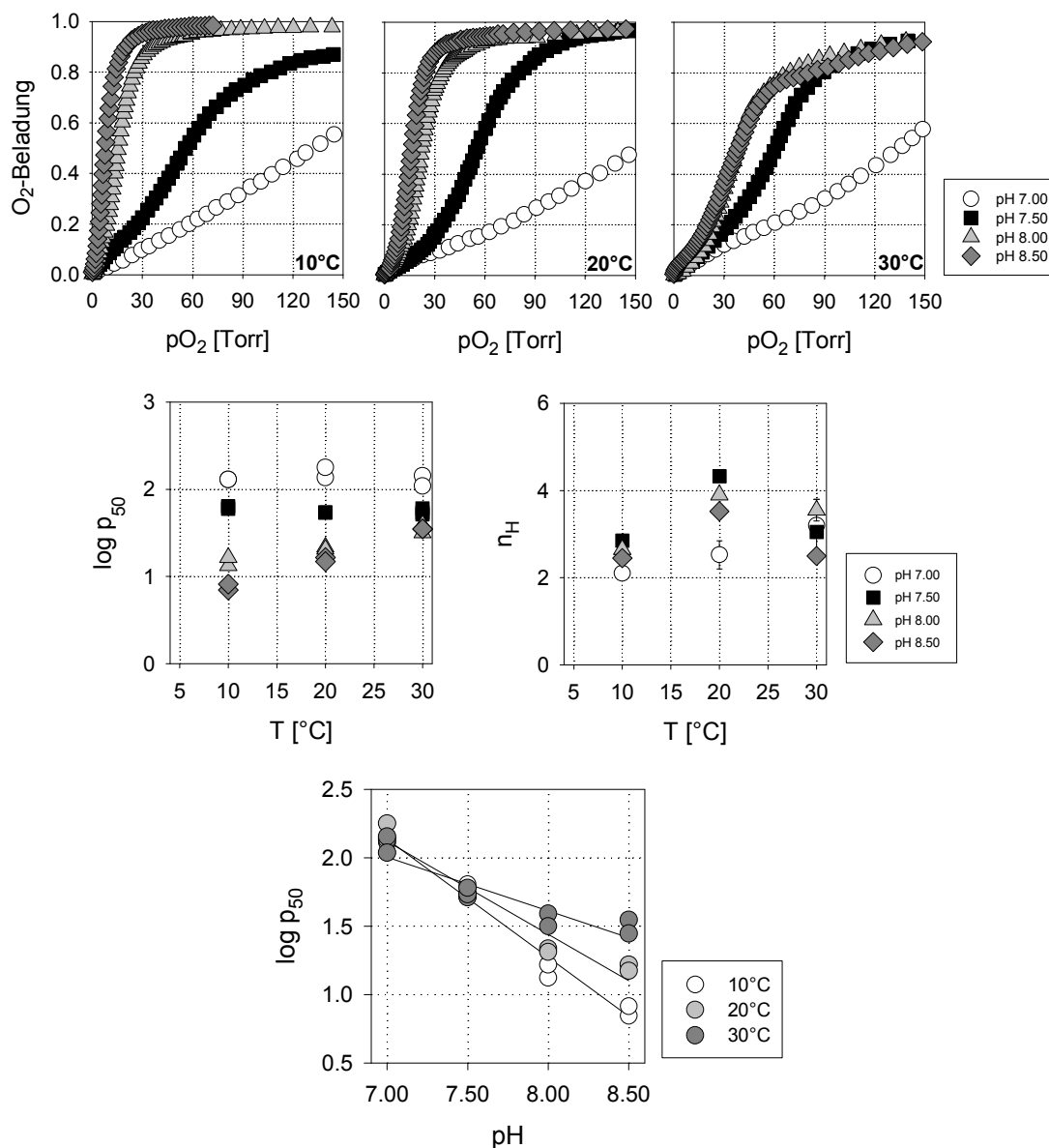


**Abb. 3.9-17: O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *H. americanus* Hämocyanin.** Die Datenanalyse erfolgte nach dem Nesting-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

3.9.8 II (pH=const.) *Homarus americanus* Hämocyanin

♦ der pH ist unabhängig von der Temperatur pH=const.

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-18 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven des *H. americanus* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-18:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven, -parameter und der Bohreffekt (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub> und  $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von *H. americanus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Der  $p_{50}$  (Abb. 3.9-18, Mitte links) ist bei pH 7.00 und 7.50 Temperatur unempfindlich. Im Temperaturbereich von 10°C bis 30°C liegt der  $O_2$ -Halbsättigungsdruck bei 139.00±22.55 Torr bei pH 7.00 und 56.35±4.30 Torr bei pH 7.50. Bei pH 8.00 und 8.50 zeigt sich beim  $p_{50}$  eine Temperatursensitivität des *H. americanus* Hämocyanins. Der  $p_{50}$  steigt von 14.95±1.65 Torr (pH 8.00) bzw. 7.60±0.60 Torr (pH 8.50) bei 10°C auf 35.25±2.60 Torr für pH 8.00 und pH 8.50 bei 30°C. Die Bohrkoeffizienten für die jeweilige Temperatur sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta pH$
10°C	-0.86
20°C	-0.68
30°C	-0.39

**Tab. 3.9-13: Der Bohreffekt von *H. americanus* Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.** Der  $\Delta pH$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) (Abb. 3.9-18, Mitte rechts) als ein Maß für die Kooperativität der  $O_2$ -Bindung an das *H. americanus* Hämocyanin, hat bei 20°C und einem pH von 7.50, 8.00 und 8.50 ein Optimum wobei ein maximaler Wert von 4.30±0.10 bei pH 7.50 erreicht wird. Bei 10°C und 30°C ist die Kooperativität verringert. Die niedrigsten Kooperativitätswerte werden bei einem pH-Wert von 7.00 gemessen. Mit steigender Temperatur nimmt pH 7.00 der Hill-Koeffizient zu. Bei 10°C besitzt  $n_H$  einen Wert von 2.10±0.10, bei 20°C werden 2.50±0.30 und bei 30°C erreicht  $n_H$  3.10±0.50.

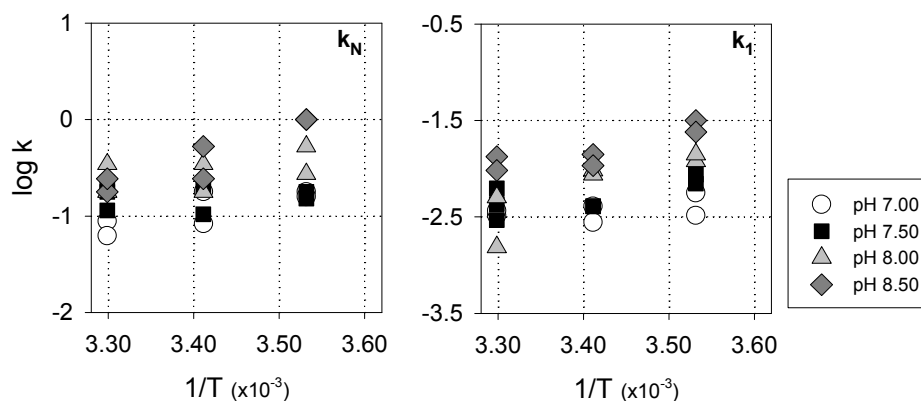
- Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:
  - i)  $k_N$  ist Temperatur und pH empfindlich:  $k_N \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt
  - ii) die Temperatur- und pH-Empfindlichkeit ist bei  $k_1$  schwächer ausgeprägt:  $k_1 \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt

Die Abb. 3.9-19 zeigt den Verlauf der aus dem Hill-Plot bestimmten Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Wird die Hämocyaninlösung auf pH 7.00 eingestellt verringert sich  $k_N$  von 0.17±0.01 Torr<sup>-1</sup> bei 10°C auf 0.076±0.013 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C. Bei pH 7.50 zeigt  $k_N$  mit 0.16±0.01 Torr<sup>-1</sup> keine Temperatursensitivität. Bei einem pH von 8.00 fällt  $k_N$  von 0.40±0.13 Torr<sup>-1</sup> bei 10°C auf 0.26±0.08 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C. Bei pH 8.50 ist der Einfluss der Temperatur auf die Bindungskonstante am stärksten:  $k_N$  verringert sich von 1.00±0.00 Torr<sup>-1</sup> bei 10°C auf 0.21±0.03 bei 30°C.

Die Bindungskonstante  $k_1$  zeigt bei pH 7.00 keine Temperaturempfindlichkeit. Zwischen 10°C und 30°C besitzt  $k_1$  einen Wert von 0.0038±0.0005 Torr<sup>-1</sup>. Wird der pH basischer, so entwickelt  $k_1$  eine zunehmende Empfindlichkeit gegenüber der Temperatur. Bei pH 8.50 verringert sich  $k_1$  von 0.028±0.004 Torr<sup>-1</sup> bei 10°C auf 0.011±0.002 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C.

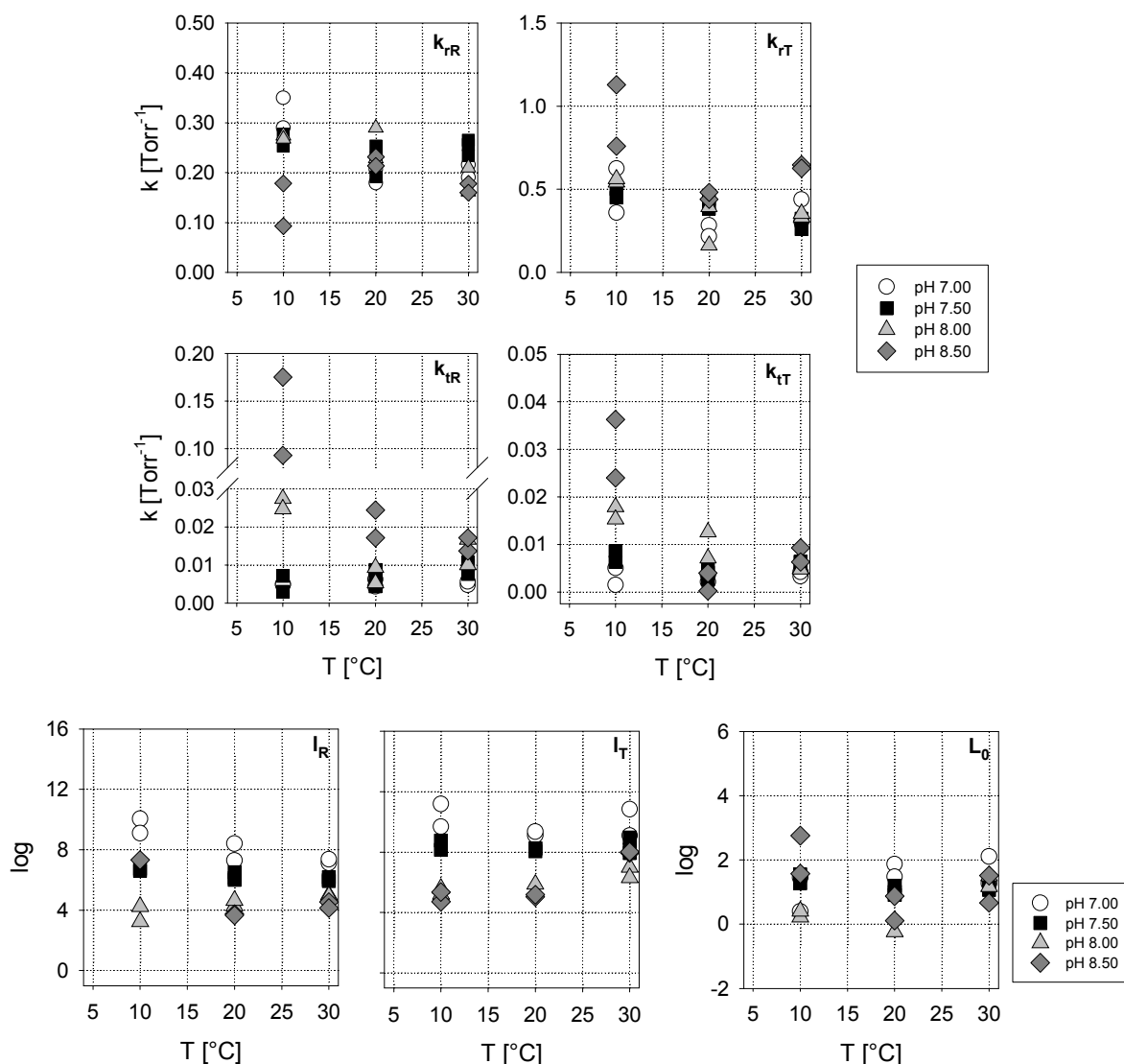
Temperatur	pH			
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0045±0.0011	0.0079±0.0008	0.013±0.001	0.028±0.004
20°C	0.0035±0.0007	0.0041±0.0000	0.0092±0.0005	0.012±0.002
30°C	0.0035±0.0002	0.0045±0.0014	0.0033±0.0018	0.011±0.002
Temperatur	pH			
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.17±0.01	0.16±0.01	0.40±0.13	1.00±0.00
20°C	0.13±0.05	0.15±0.05	0.26±0.08	0.39±0.14
30°C	0.076±0.013	0.17±0.04	0.26±0.08	0.21±0.03

**Tab. 3.9-14:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *H. americanus* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.



**Abb. 3.9-19:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für das *H. americanus* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- *Analyse nach dem Nesting-Modell für pH=const.*
  - i)  $k_{iR}$ ,  $k_{iT}$  und  $k_{iT}$  sind bei niedriger Temperatur (10°C) pH empfindlich: die Bindungskonstanten nehmen mit sinkender H<sup>+</sup>-Konzentration zu
  - ii)  $k_{iR}$  ist Temperatur und pH unempfindlich
  - iii)  $k_{iR}$ ,  $k_{iT}$ , und  $k_{iT}$  sind mit sinkender H<sup>+</sup>-Konzentration zunehmend Temperatur sensitiv: die Bindungskonstanten nehmen ab



**Abb. 3.9-20:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *H. americanus* Hämocyanin. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Eine temperaturabhängige pH-Drift wurde dadurch verhindert.

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $I_T$  und  $I_R$  zeigen gegenüber dem pH eine größere Empfindlichkeit als gegenüber der Temperatur. Je größer die H<sup>+</sup>-Konzentration (niedriger pH), desto höher die Werte für  $\log I_R$  und  $\log I_T$ . Eine Ausnahme ist der Wert für  $\log I_R$  bei 10°C und pH 8.50, dieser Wert kann als Ausreißer gewertet werden. In dem untersuchten Temperaturbereich und einem pH von 7.00 hat  $\log I_R$  und  $\log I_T$  Werte von  $8.22 \pm 1.10$  bzw.  $9.87 \pm 0.84$ . Wird der pH auf 8.50 erhöht, so verringern sich die Werte für  $\log I_R$  und  $\log I_T$  auf  $4.02 \pm 0.35$  bzw.  $6.05 \pm 1.40$  (Abb. 3.9-20, unten).

Die Analyse der allosterischen Gleichgewichtskonstanten für das Gesamtmolekül  $L_0$  zeigt eine Temperatur- und pH-Unempfindlichkeit.  $\log L_0$  ist mit  $1.08 \pm 0.56$  um bis zu neun Größenordnungen kleiner, als die allosterischen Gleichgewichtskonstanten für die Halbmoleküle (Abb. 3.9-20, unten).

Aus den folgenden Tabellen können die ermittelten Zahlenwerte der jeweiligen Bindungskonstanten, in Abhängigkeit von Temperatur und pH, entnommen werden.

Temperatur	pH			
$k_{rR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.35±0.08	0.27±0.01	0.27±0.01	0.14±0.04
20°C	0.19±0.01	0.23±0.03	0.26±0.03	0.22±0.01
30°C	0.20±0.01	0.25±0.01	0.19±0.02	0.17±0.01
Temperatur	pH			
$K_{tR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0049±0.0001	0.0051±0.0021	0.027±0.000	0.13±0.04
20°C	0.0053±0.0010	0.0068±0.0018	0.0073±0.0021	0.021±0.004
30°C	0.0052±0.0005	0.0094±0.0013	0.013±0.003	0.015±0.002

**Tab. 3.9-15:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rR}$  und  $K_{tR}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der R-Konformation des *H.americanus* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rR}$  und  $K_{tR}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

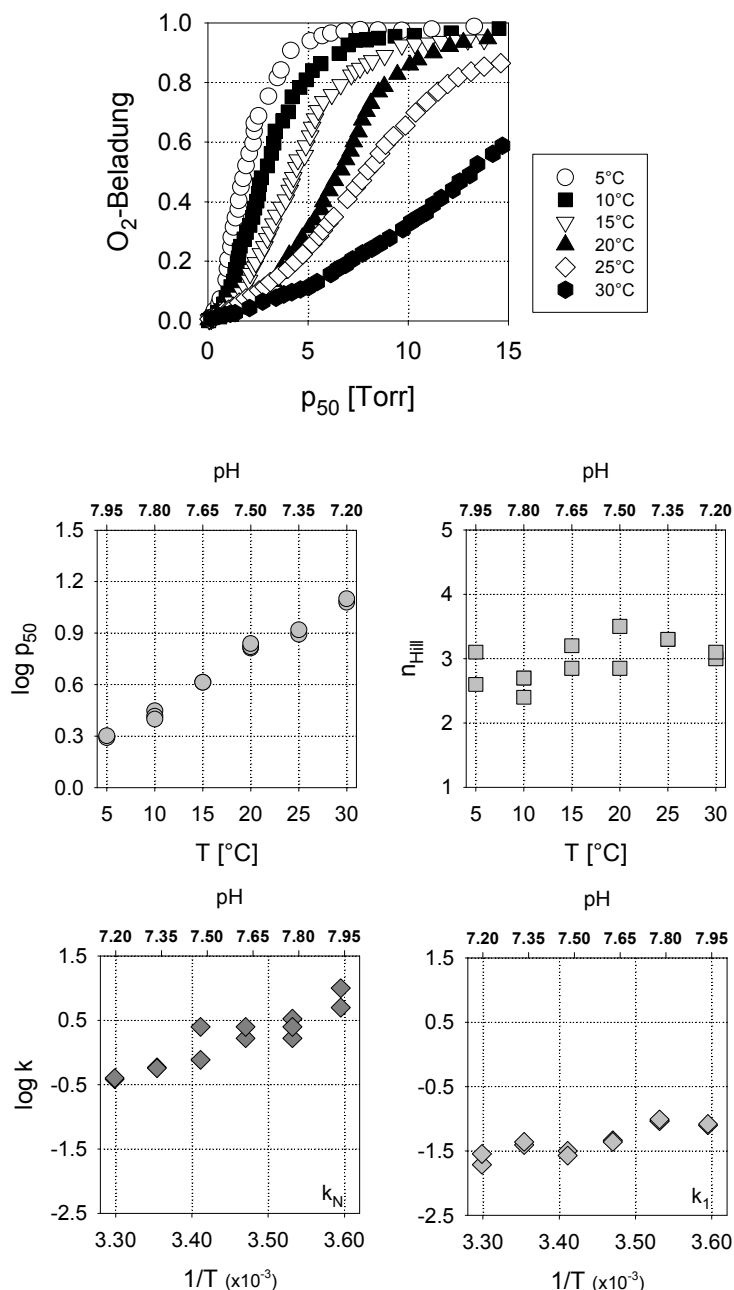
Temperatur	pH			
$K_{tT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0032±0.0018	0.0075±0.0012	0.017±0.001	0.030±0.006
20°C	0.0029±0.0008	0.0039±0.0010	0.0099±0.0028	0.0021±0.0019
30°C	0.0038±0.0005	0.0060±0.0005	0.0049±0.0001	0.0078±0.0015
Temperatur	pH			
$k_{rT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.49±0.13	0.48±0.03	0.55±0.01	0.94±0.18
20°C	0.25±0.03	0.41±0.02	0.28±0.12	0.46±0.02
30°C	0.37±0.07	0.30±0.03	0.34±0.01	0.64±0.01

**Tab. 3.9-16:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{rT}$  und  $K_{tT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *H.americanus* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{rT}$  und  $K_{tT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

3.9.9 I (pH=pH(T)) *Potamon potamios* Hämocyanin

♦ der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)

Die Abb. 3.9-21 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungsparameter bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variiert in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH ändert sich von 7.95 auf 7.20, was einem  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von 0.03 pH-Einheiten entspricht.



**Abb. 3.9-21:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Bindungsparameter (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>N</sub>, k<sub>1</sub>) von *P. potamios* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der temperaturinduzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die Abb. 3.9-21 gibt den Verlauf des  $p_{50}$  und  $n_H$  mit steigender Temperatur und zunehmender  $H^+$ -Konzentration wieder. Der  $p_{50}$ , d.h. der  $pO_2$ -Halbsättigungsdruck, nimmt von  $1.98 \pm 0.03$  Torr bei  $5^\circ C$  auf  $12.30 \pm 0.30$  Torr bei  $30^\circ C$  zu. Der Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta pH(T)$ ) ist innerhalb des pH-Bereichs von 7.95 (bei  $5^\circ C$ ) bis 7.20 (bei  $30^\circ C$ ) mit einem Wert von  $-1.09$  konstant.

Der  $n_H$  als Maß für die Kooperativität der  $O_2$ -Bindung an das Hämocyaninmolekül zeigt eine geringe Temperaturempfindlichkeit. Im untersuchten pH- und Temperaturbereich besitzt  $n_H$  bei  $20^\circ C$  ein Optimum mit einem Wert von  $3.15 \pm 0.25$ .

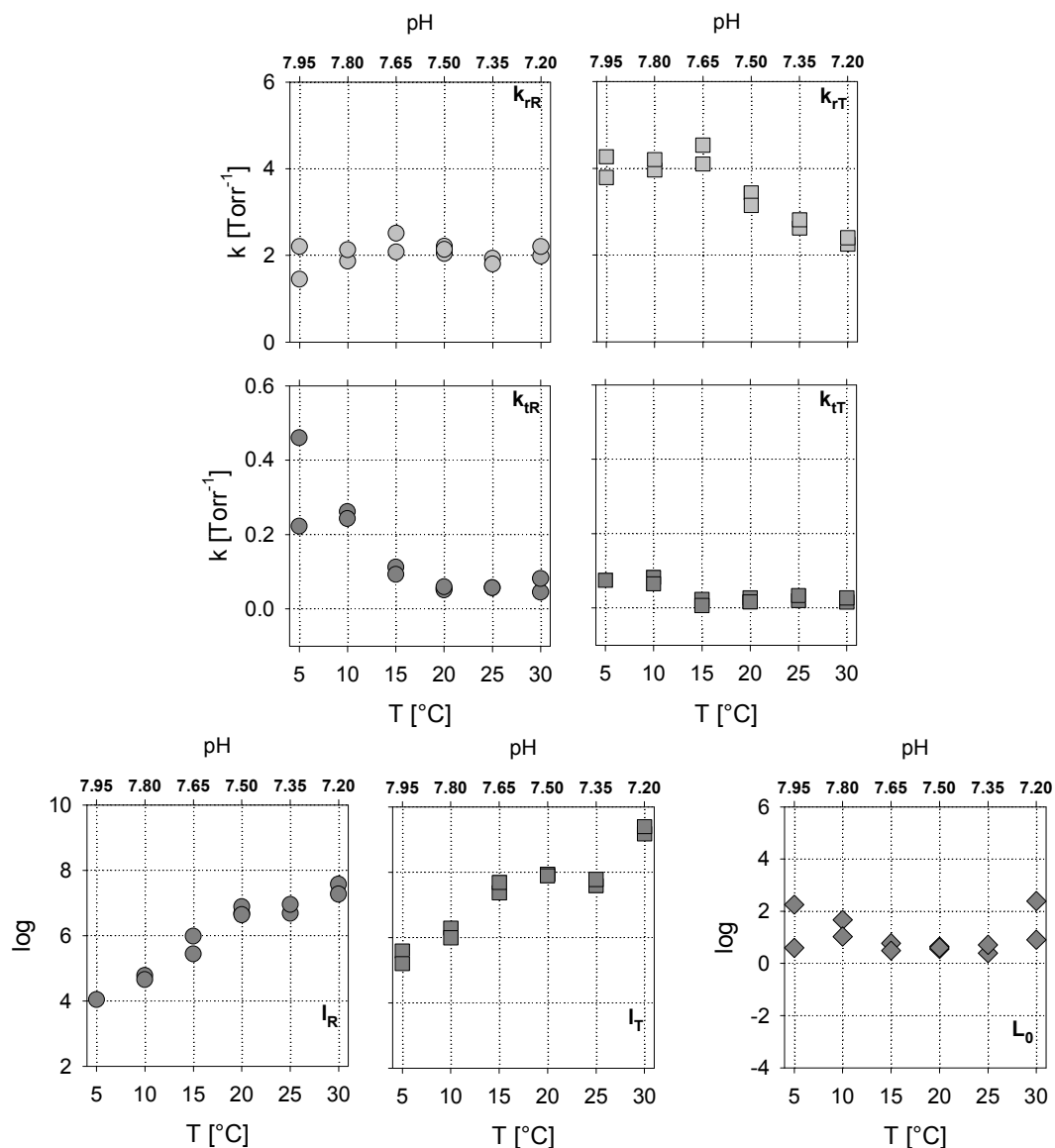
Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  werden mit steigender Temperatur kleiner (Abb. 3.9-21, unten). Die Bindungskonstante der R-Konformation  $k_N$  fällt von  $5.25$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ C$  (pH 7.95) auf  $0.39 \pm 0.01$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ C$  (pH 7.20). Die Bindungskonstante der T-Konformation  $k_1$  fällt von  $0.080 \pm 0.003$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ C$  auf  $0.02 \pm 0.00$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ C$ .

- *Analyse nach dem NESTING-Modell für  $pH=pH(T)$* 
  - i)  $k_{rR}$  und  $k_{tT}$  sind unabhängig von der Temperatur und pH
  - ii)  $k_{tR}$  ist bis  $20^\circ C$  Temperatur und pH abhängig ( $k_{tR} \downarrow$ ); oberhalb von  $20^\circ C$  keine Temperatur- und pH-sensitivität mehr
  - iii)  $k_{rT}$  ist bis  $15^\circ C$  Temperatur unabhängig; ab  $15^\circ C$  zeigt sich eine Temperatur- und pH-Abhängigkeit ( $k_{rT} \downarrow$ )

Neben der graphischen Bestimmung der Bindungskonstanten für die R- und T-Konformation wurden die Bindungskurven mit Hilfe des Nesting-Modells analysiert (Abb. 3.9-22). Die Bindungskonstante  $k_{rR}$  bleibt mit einem Wert von  $2.04 \pm 0.26$  Torr $^{-1}$  in dem untersuchten Temperaturintervall ( $5^\circ C$  bis  $30^\circ C$ ) konstant. Der  $k_{rT}$ -Wert mit  $4.15 \pm 0.25$  Torr $^{-1}$  zeigt bis  $15^\circ C$  keine Änderung und verringert sich ab  $15^\circ C$  auf  $2.36 \pm 0.08$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ C$ . Die Bindungskonstante  $k_{tR}$  fällt von  $0.34 \pm 0.12$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ C$  und pH 7.95 auf  $0.058 \pm 0.011$  Torr $^{-1}$  bei  $20^\circ C$  und pH 7.50. Eine Erhöhung der Temperatur auf  $30^\circ C$  (pH 7.20) hat keinen weiteren Einfluss auf  $k_{tR}$ . Bei  $5^\circ$  bis  $10^\circ C$  und pH 7.95 bis pH 7.80 besitzt  $k_{tT}$  einen Wert von  $0.074 \pm 0.007$  Torr $^{-1}$ . Eine Zunahme der Temperatur auf  $15^\circ C$  bewirkt eine Verringerung von  $k_{tT}$  auf  $0.021 \pm 0.008$  Torr $^{-1}$ . Dieser Wert bleibt bis  $30^\circ C$  (pH 7.20) konstant.

Beobachtet man in der Abb. 3.9-22 den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Halbmoleküle zwischen  $5^\circ C$  und  $30^\circ C$ , so nehmen die Werte für  $\log I_R$  und  $\log I_T$  von  $4.00 \pm 0.00$  auf  $7.42 \pm 0.15$  bzw. von  $5.40 \pm 0.20$  auf  $9.29 \pm 0.11$  zu. Die Gleichgewichtskonstante  $\log L_0$  für das Gesamtmolekül besitzt im untersuchten Temperaturbereich einen konstanten Wert von  $1.00 \pm 0.67$ . Die Werte für  $\log L_0$  sind im Vergleich zu  $\log I_R$  und  $\log I_T$  um bis zu neun Größenordnungen kleiner.



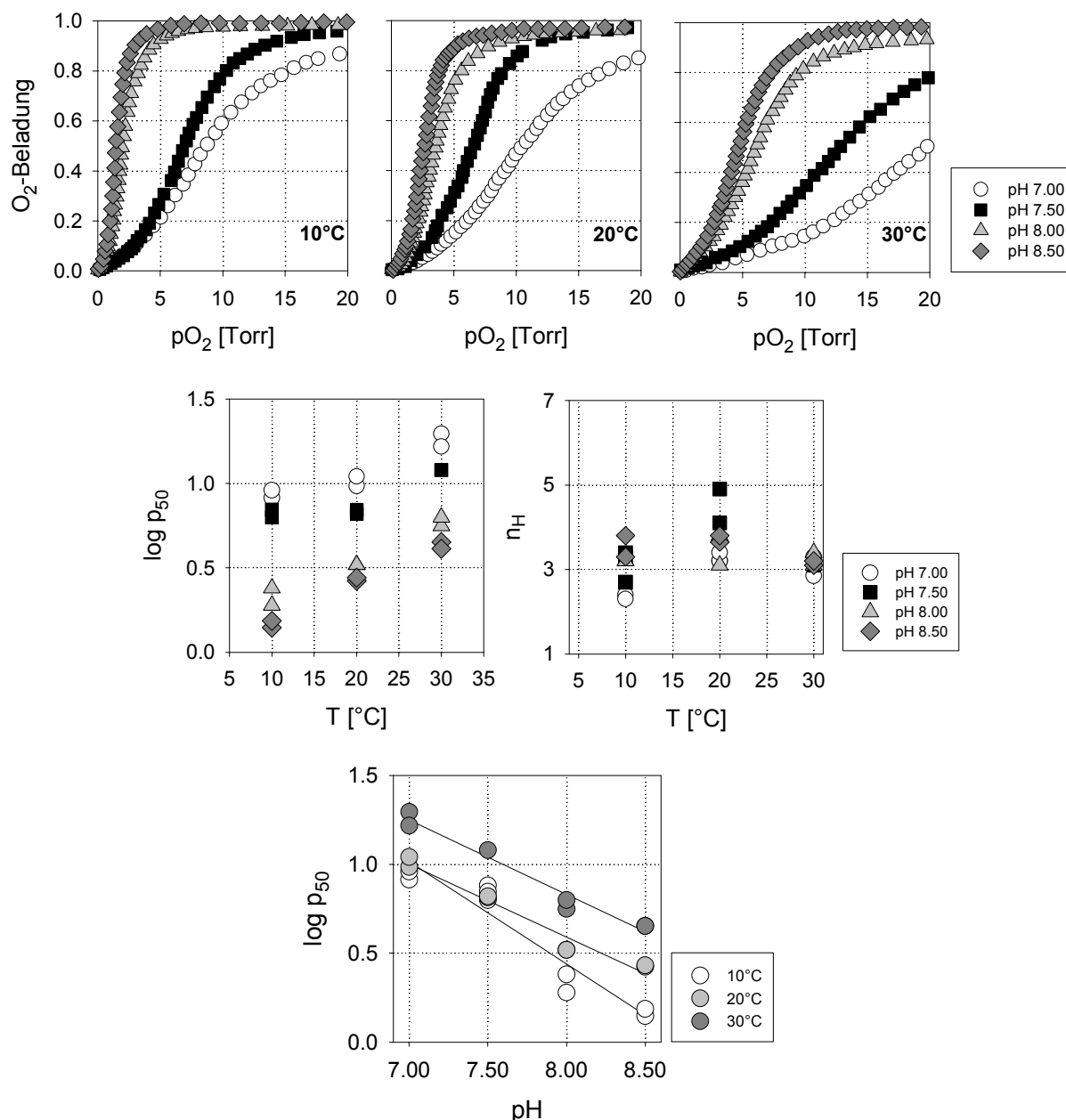


**Abb. 3.9-22:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *P. potamios* Hämocyanin. Die Datenanalyse erfolgte nach dem Nesting-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

3.9.10 II (pH=const.) *Potamon potamios* Hämocyanin

♦ der pH ist unabhängig von der Temperatur pH=const.

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-23 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Parameter des *P. potamios* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-23:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven, -parameter und Bohreffekt ( $p_{50}$ ,  $n_H$  und  $\Delta \log p_{50}/\Delta \text{pH}$ ) von *P. potamios* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Der  $p_{50}$  (Abb. 3.9-23, Mitte links) nimmt von  $8.65 \pm 0.45$  Torr bei pH 7.00 bzw. von  $6.90 \pm 0.45$  Torr bei pH 7.50 auf  $17.45 \pm 0.95$  Torr (pH 7.00) bzw. auf 12.00 Torr (pH 7.50) zu. Wird der pH auf 8.00 bzw. 8.50 eingestellt verändert sich der  $p_{50}$  des *P. potamios* Hämocyanins von  $2.25 \pm 0.15$  Torr bzw.  $1.40 \pm 0.00$  Torr bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $5.95 \pm 0.35$  Torr bei pH 8.00 und auf  $4.50 \pm 0.00$  Torr pH 8.50 bei  $30^\circ\text{C}$ . Die größte pH-Sensitivität (Bohreffekt) besitzt der  $p_{50}$  bei  $10^\circ\text{C}$ . Die Bohrkoeffizienten für die jeweilige Temperatur sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

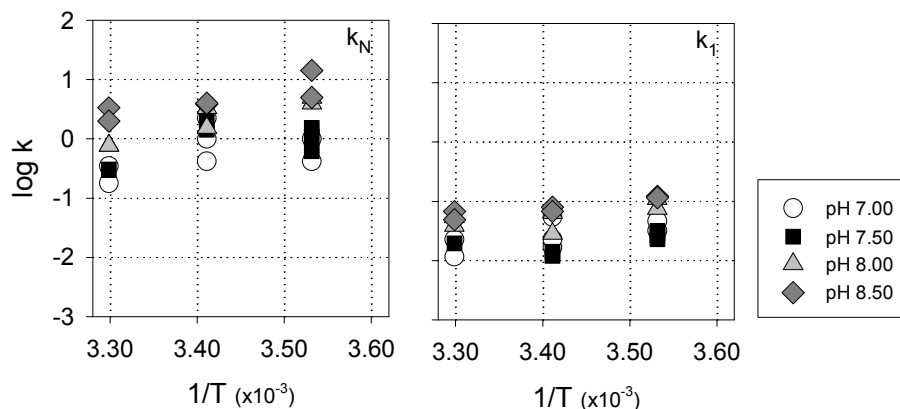
Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$
$10^\circ\text{C}$	-0.58
$20^\circ\text{C}$	-0.41
$30^\circ\text{C}$	-0.42

**Tab. 3.9-17: Der Bohreffekt von *P. potamios* Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.** Der  $\Delta \text{pH}$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) (Abb. 3.9-23, Mitte rechts) als Maß für die Kooperativität der  $\text{O}_2$ -Bindung an das *P. potamios* Hämocyanin, hat bei  $20^\circ\text{C}$  und pH 7.50 ein Maximum von  $4.50 \pm 0.40$ . Die niedrigsten Kooperativitätswerte werden bei einem pH-Wert von 7.00 gemessen. Bei  $10^\circ\text{C}$  und pH 7.00 besitzt  $n_H$  einen Wert von  $2.35 \pm 0.05$ , bei  $20^\circ\text{C}$  von  $3.20 \pm 0.00$  und bei  $30^\circ\text{C}$  wird ein Hill-Koeffizient von  $3.10 \pm 0.25$  erreicht.

- Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:
  - i)  $k_N$  ist temperatur- und pH-empfindlich:  $k_N \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt
  - ii) die Temperatur- und pH-Empfindlichkeit ist bei  $k_1$  etwas schwächer ausgeprägt:  $k_1 \uparrow$  wenn die Temperatur sinkt oder der pH steigt

Die folgende Abb. 3.9-24 zeigt den Verlauf der aus dem Hill-Plot bestimmten Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Wird die Hämocyaninlösung auf pH 7.00 und 7.50 eingestellt, fällt  $k_N$  von  $0.71 \pm 0.29 \text{ Torr}^{-1}$  bzw. von  $1.09 \pm 0.37 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $0.26 \pm 0.08 \text{ Torr}^{-1}$  bzw. auf  $0.30 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Bei einem pH-Wert von 8.00 und 8.50 ist die Temperatursensitivität von  $k_N$  stärker ausgeprägt:  $k_N$  fällt von  $4.50 \pm 0.50 \text{ Torr}^{-1}$  bzw. von  $9.93 \pm 4.93 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $0.77 \pm 0.00 \text{ Torr}^{-1}$  bzw. auf  $2.67 \pm 0.67$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Auch die Bindungskonstante  $k_1$  verringert sich mit steigender Temperatur. Diese Abnahme von  $k_1$  fällt um so stärker aus, je basischer die Hämocyaninlösung ist. Bei pH 7.00 geht  $k_1$  von  $0.039 \pm 0.007 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $0.017 \pm 0.006 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$  zurück. Bei pH 8.50 verringert sich  $k_1$  von  $0.12 \pm 0.01 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $0.058 \pm 0.009 \text{ Torr}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ .



**Abb. 3.9-24:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für *P. potamios* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die folgende Tabelle enthält die zur Abb. 3.9-24 zugehörigen Zahlenwerte der Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$ .

Temperatur	pH			
	7.00	7.50	8.00	8.50
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ]				
10°C	0.039±0.007	0.027±0.004	0.093±0.017	0.12±0.01
20°C	0.020±0.003	0.027±0.020	0.046±0.018	0.073±0.006
30°C	0.017±0.006	0.020	0.047±0.008	0.058±0.009
Temperatur	pH			
	7.00	7.50	8.00	8.50
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ]				
10°C	0.71±0.29	1.09±0.37	4.50±0.50	9.93±4.93
20°C	0.71±0.29	1.88±0.33	2.43±0.90	3.92±0.08
30°C	0.26±0.08	0.30	0.77±0.00	2.67±0.67

**Tab. 3.9-18:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *P. potamios* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Der  $k_1$  und  $k_N$  wurde aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

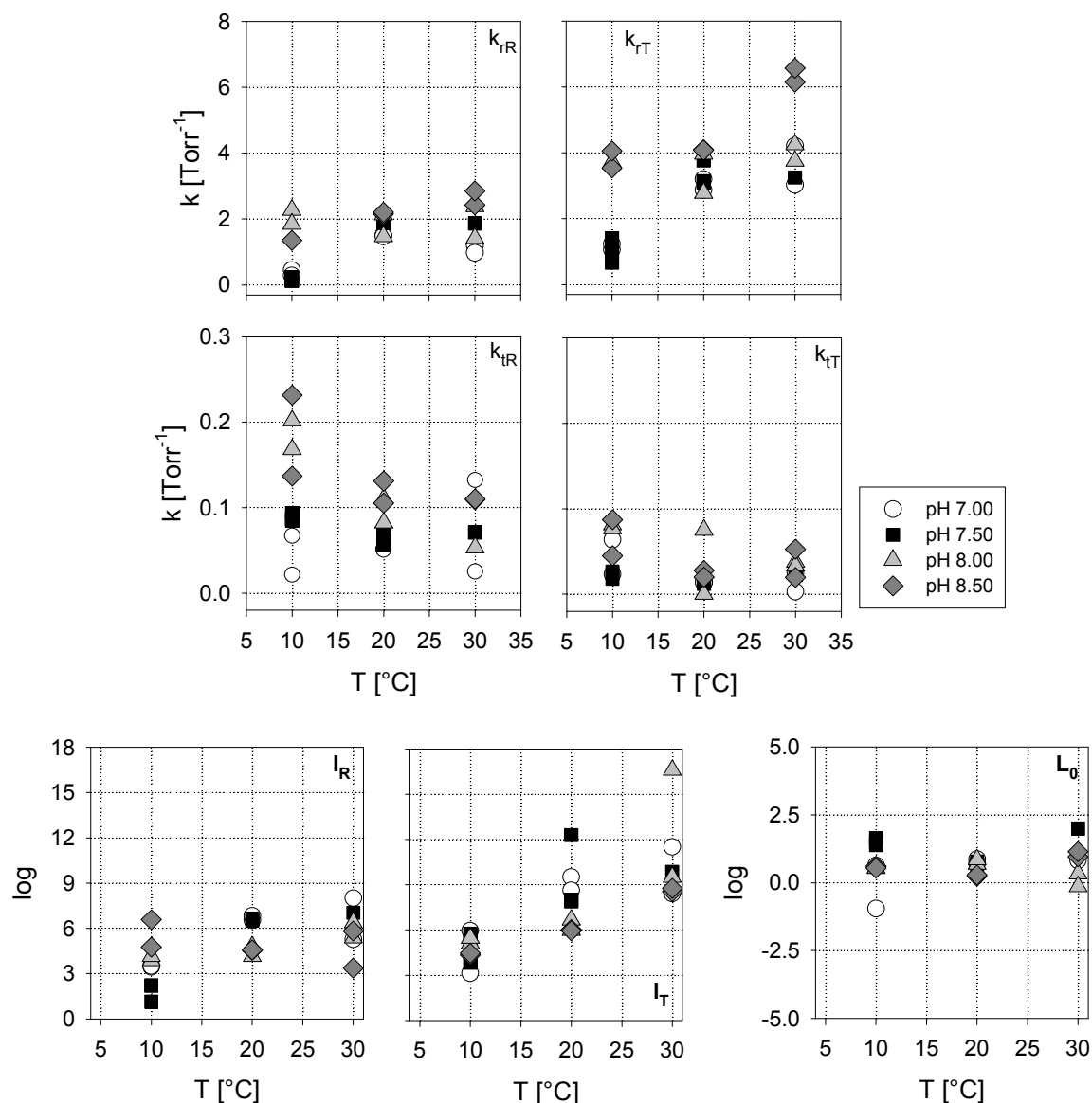
- Analyse nach dem Nesting-Modell für  $pH=const$ :
  - i)  $k_{iT}$  ist temperatur- und pH-unempfindlich
  - ii)  $k_{iR}$  ist temperaturempfindlich aber indifferent gegenüber pH: mit steigender Temperatur nimmt  $k_{iR}$  zu
  - iii)  $k_{iT}$  ist temperatur- und pH-empfindlich: mit steigender Temperatur oder basischerem pH nimmt  $k_{iT}$  zu
  - iv)  $k_{iR}$  ist pH-empfindlich;  $k_{iR}$  zeigt keine Temperaturabhängigkeit

Temperatur	pH			
$k_{iR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.37±0.09	0.16±0.05	2.06±0.21	1.35
20°C	1.49±0.02	2.05±0.12	1.80±0.33	2.18±0.03
30°C	1.09±0.11	1.87	1.90±0.48	2.64±0.21
Temperatur	pH			
$K_{iR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.044±0.023	0.089±0.004	0.18±0.02	0.18±0.05
20°C	0.051±0.001	0.064±0.007	0.097±0.014	0.12±0.01
30°C	0.079±0.054	0.071	0.053	0.11±0.00

**Tab. 3.9-19:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{iR}$  und  $K_{iR}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der R-Konformation des *P. potamios* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{iR}$  und  $K_{iR}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Temperatur	pH			
$K_{iT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.044±0.020	0.023±0.004	0.079±0.002	0.067±0.021
20°C	0.014±0.000	0.015±0.002	0.075	0.024±0.004
30°C	0.014±0.011	0.023	0.035±0.002	0.036±0.017
Temperatur	pH			
$k_{iT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	1.14±0.09	1.04±0.30	3.69±0.04	3.80±0.26
20°C	3.03±0.17	3.33±0.31	3.37±0.59	4.09±0.01
30°C	3.61±0.59	3.25	4.00±0.25	6.36±0.21

**Tab. 3.9-20:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{iT}$  und  $K_{iT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halbmoleküle der T-Konformation des *P. potamios* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{iT}$  und  $K_{iT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.



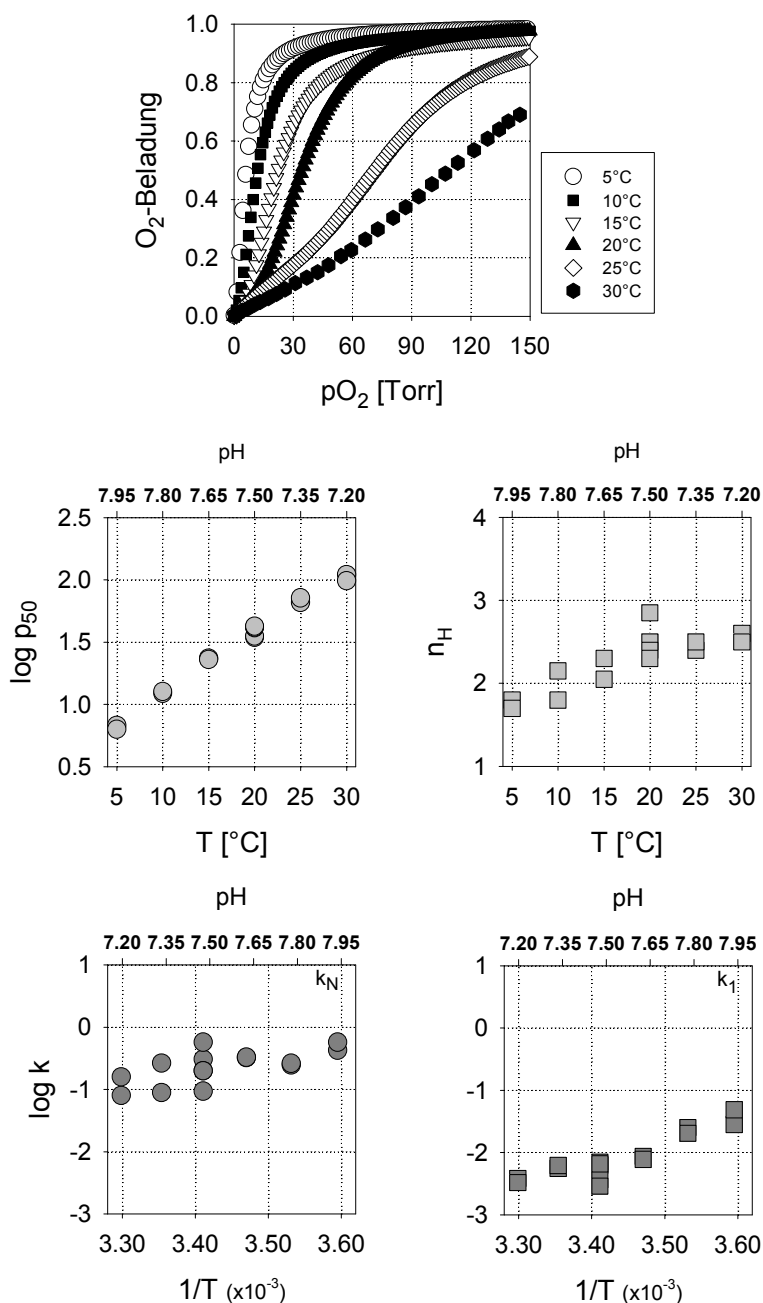
**Abb. 3.9-25:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für *P. potamios* Hämocyanin. Ermittelt mit Hilfe des Nesting-Modells. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Eine temperaturabhängige pH-Drift wird dadurch verhindert.

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $I_T$  und  $I_R$  zeigen keine pH-Abhängigkeit.  $\log I_R$  nimmt von  $3.84 \pm 1.41$  bei 10°C auf  $5.89 \pm 1.37$  bei 30°C zu. Die Gleichgewichtskonstante  $\log I_T$  steigt im gleichen Temperaturbereich von  $4.70 \pm 0.87$  auf  $10.13 \pm 2.66$  (Abb. 3.9-25, unten). Die Analyse der allosterischen Gleichgewichtskonstanten für das Gesamtmolekül  $\log L_0$  zeigt eine Temperatur- und pH-Unempfindlichkeit. Für die untersuchten Bedingungen (pH und Temperatur) liegt  $\log L_0$  bei  $0.72 \pm 0.60$ .  $L_0$  ist um bis zu vierzehn Größenordnungen kleiner als  $I_R$  und  $I_T$ .

3.9.11 I (pH=pH(T)) *Calappa granulata* Hämocyanin

♦ der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)

Die Abb. 3.9-26 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungsparameter bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variiert in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH ändert sich von 7.95 auf 7.20, was einem  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von 0.03 pH-Einheiten entspricht.



**Abb. 3.9-26:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und -parameter (logp<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>1</sub> und k<sub>N</sub>) von *C. granulata* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der Temperatur induzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Der  $p_{50}$ , d.h. der  $pO_2$ -Halbsättigungsdruck, nimmt von  $6.53 \pm 0.23$  Torr bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $103.90 \pm 5.80$  Torr bei  $30^\circ\text{C}$  zu. Der Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}(T)$ ) ist innerhalb des pH-Bereichs von 7.95 (bei  $5^\circ\text{C}$ ) bis 7.20 (bei  $30^\circ\text{C}$ ) mit einem Wert von  $-1.62$  konstant.

Die Kooperativität ( $n_H$ ) der  $O_2$ -Bindung an das Hämocyaninmolekül steigt von  $1.75 \pm 0.05$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $2.50 \pm 0.20$  bei  $20^\circ\text{C}$  und bleibt konstant bis  $30^\circ\text{C}$ .

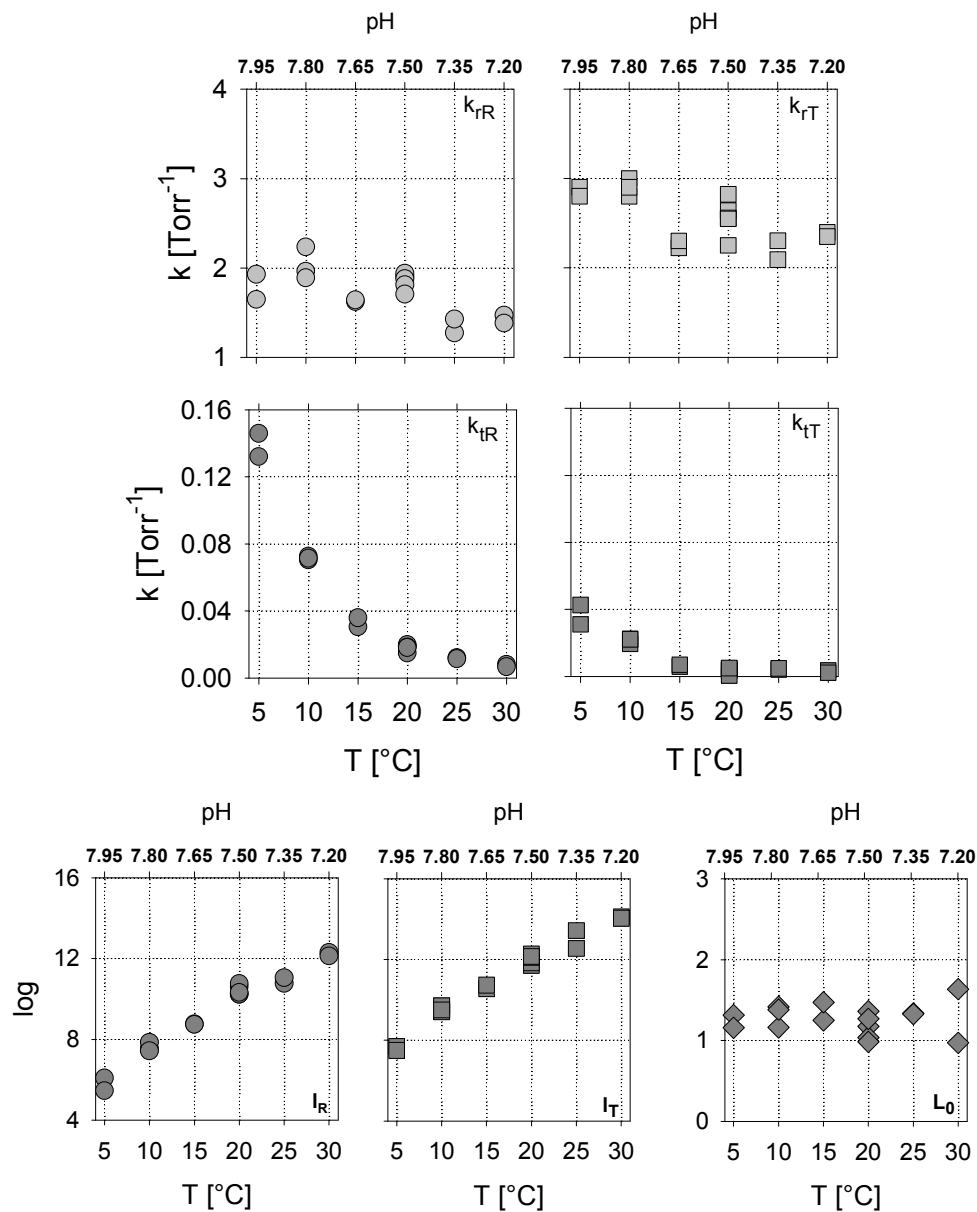
Die aus dem Hill-Plot ermittelten Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  werden mit zunehmender Erwärmung und gleichzeitig abnehmenden pH-Wert kleiner (Abb. 3.9-26, unten). Die Bindungskonstante der R-Konformation fällt von  $0.50 \pm 0.08$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  (pH 7.95) auf  $0.12 \pm 0.04$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$  (pH 7.20). Die T-Konformation erreicht bei  $5^\circ\text{C}$  eine maximale Bindungskonstante von  $0.039 \pm 0.010$  Torr $^{-1}$ , mit fortschreitender Erwärmung verringert sich diese auf  $0.0036 \pm 0.0003$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ .

- *Analyse nach dem Nesting-Modell für  $\text{pH}=\text{pH}(T)$* 
  - i)  $k_{rR}$  und  $k_{rT}$  weisen eine sehr geringe Empfindlichkeit gegenüber Temperatur und pH auf
  - ii)  $k_{iR}$  ist sehr Temperatur und pH sensitiv
  - iii)  $k_{iT}$  ist bis  $15^\circ\text{C}$  Temperatur und pH empfindlich

Mit einer auf Nesting-Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die vier Bindungskonstanten  $k_{rR}$ ,  $k_{iR}$ ,  $k_{rT}$  und  $k_{iT}$ , sowie die drei allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $I_R$ ,  $I_T$  und  $L_0$  bestimmen. Die Bindungskonstante  $k_{rR}$  verringert sich von  $1.79 \pm 0.14$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $1.43 \pm 0.05$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ .  $k_{iR}$  reagiert deutlich empfindlicher und fällt von  $0.14 \pm 0.01$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $0.0074 \pm 0.0008$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Die Bindungskonstante  $k_{rT}$  fällt geringfügig von  $2.85 \pm 0.05$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $2.37 \pm 0.03$  Torr $^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ .  $k_{iT}$  fällt von  $0.037 \pm 0.006$  Torr $^{-1}$  bei  $5^\circ\text{C}$  auf  $0.0064 \pm 0.0006$  Torr $^{-1}$  bei  $15^\circ\text{C}$ . Bei  $30^\circ\text{C}$  hat sich  $k_{iT}$  auf  $0.0030 \pm 0.0007$  Torr $^{-1}$  verringert (Abb. 3.9-27, oben).

Beobachtet man in der Abb. 3.9-27 (unten) den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstanten der Halbmoleküle mit steigender Temperatur bis  $30^\circ\text{C}$  und dem korrespondierenden pH-Wert, so nehmen die Werte für  $\log I_R$  und  $\log I_T$  von  $5.77 \pm 0.31$  auf  $12.22 \pm 0.09$  bzw. von  $7.60 \pm 0.10$  auf  $14.08 \pm 0.04$  zu. Die Gleichgewichtskonstante für das gesamte Hämocyaninmolekül  $\log L_0$  liegt im untersuchten Bereich bei konstant  $1.32 \pm 0.21$ .



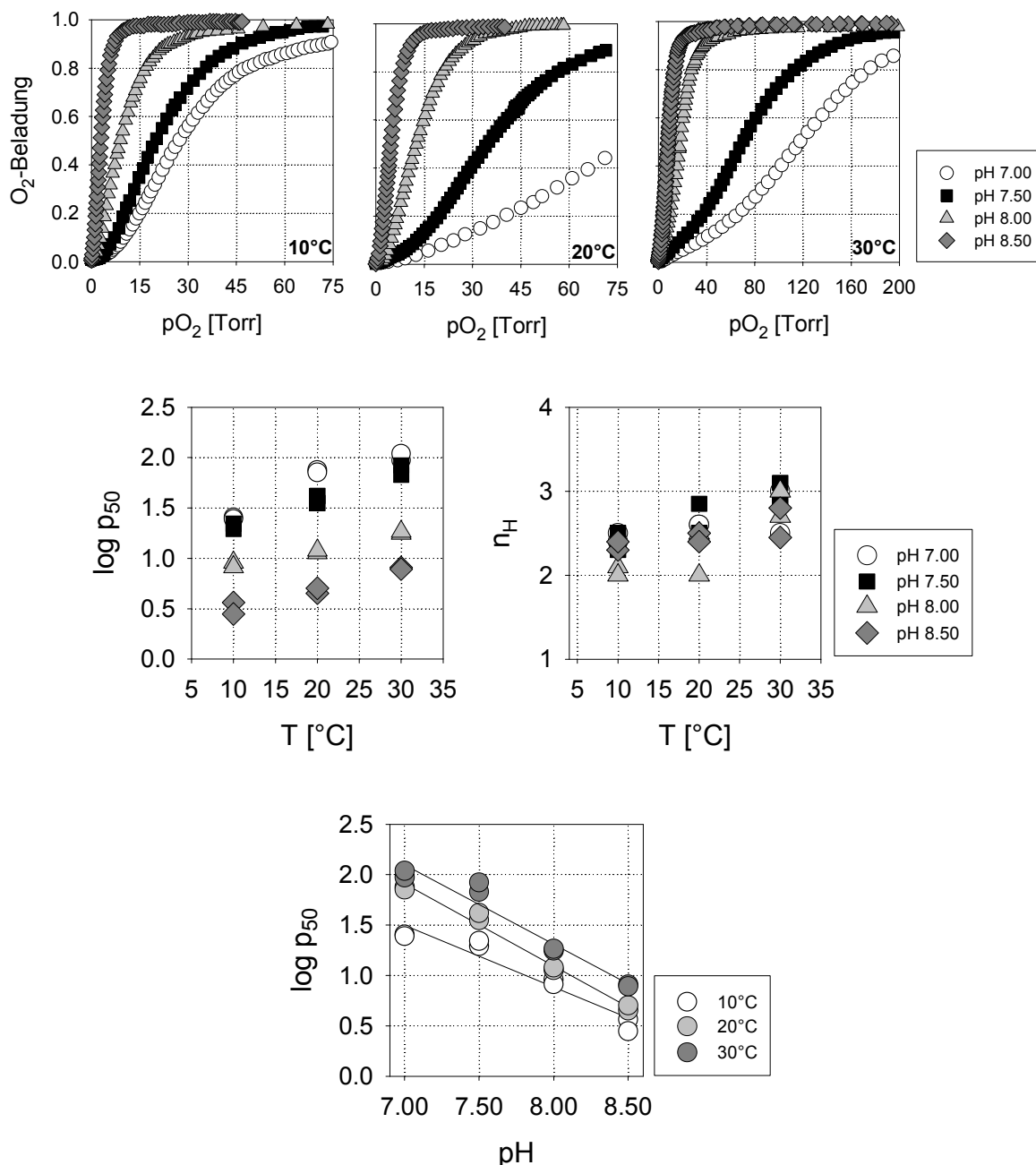


**Abb. 3.9-27:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für das *C. granulata* Hämocyanin. Die Datenanalyse erfolgte nach dem Nesting-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

3.9.12 II (pH=const.) *Calappa granulata* Hämocyanin

- der pH ist unabhängig von der Temperatur pH=const.

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-28 (oben) zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven des *C.granulata* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-28:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven, -parameter und Bohreffekt (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub> und  $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von *C. granulata* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- i) der  $p_{50}$  nimmt mit steigender Temperatur zu
- ii) der  $p_{50}$  nimmt mit steigendem pH ab.
- iii) die Kooperativität ( $n_H$ ) nimmt mit steigender Temperatur leicht zu und ist pH-unempfindlich

Der  $p_{50}$  (Abb. 3.9-28, Mitte links) steigt bei pH 7.00 von  $25.00 \pm 0.50$  Torr bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $101.38 \pm 7.62$  Torr bei  $30^\circ\text{C}$ . Bei pH 7.50 ändert sich der  $p_{50}$  im gleichen Temperaturintervall von  $20.75 \pm 1.25$  Torr auf  $75.40 \pm 8.10$  Torr. Bei pH 8.00 und 8.50 nimmt der  $p_{50}$  zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  von  $8.65 \pm 0.45$  Torr bzw.  $3.23 \pm 0.43$  Torr auf  $17.98 \pm 0.38$  Torr bzw.  $7.95 \pm 0.15$  Torr zu. Die Bohrkoeffizienten für die jeweilige Temperatur sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$
$10^\circ\text{C}$	-0.61
$20^\circ\text{C}$	-0.81
$30^\circ\text{C}$	-0.79

**Tab. 3.9-21: Der Bohreffekt von *C. granulata* Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.** Der  $\Delta \text{pH}$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ .

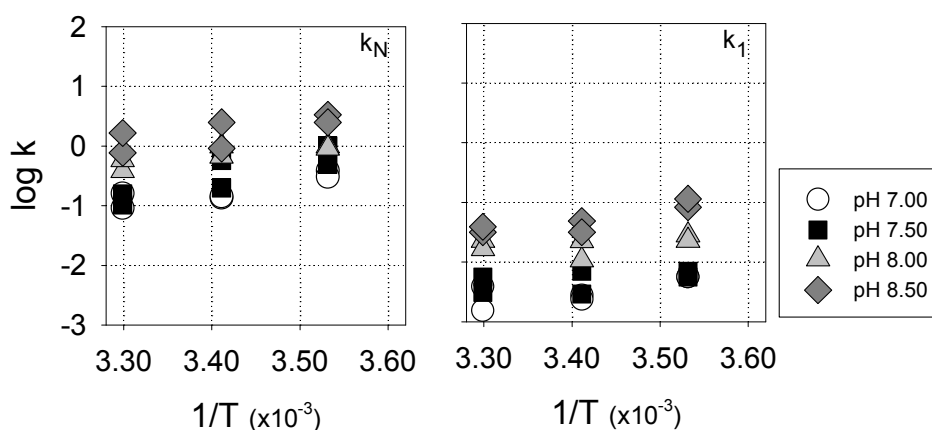
Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) (Abb. 3.9-28, Mitte rechts) als ein Maß für die Kooperativität der  $\text{O}_2$ -Bindung an das *C. granulata* Hämocyanin, steigt von  $2.31 \pm 0.17$  bei  $10^\circ\text{C}$  auf 2.80 bei  $30^\circ\text{C}$ . Der pH hat keinen signifikanten Einfluss auf die Kooperativität ( $n_H$ ).

- Die Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  aus dem Hill-Plot:
  - $k_N$  und  $k_1$  nehmen mit steigender Temperatur ab; die Temperaturempfindlichkeit ist schwach ausgeprägt
  - $k_N$  und  $k_1$  nehmen mit steigendem pH zu

Die Abb. 3.9-29 zeigt die aus dem Hill-Plot bestimmten Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$  in Abhängigkeit von Temperatur und pH. Die zugehörigen Zahlenwerte sind aus der Tabelle 3.9-22 zu entnehmen.

Temperatur	pH			
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0056±0.0000	0.0063±0.0007	0.026±0.003	0.099±0.015
20°C	0.0026±0.0002	0.0050±0.0021	0.017±0.006	0.040±0.009
30°C	0.0027±0.0012	0.0044±0.0013	0.019±0.002	0.035±0.004
Temperatur	pH			
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.34±0.04	0.75±0.25	0.96±0.05	2.92±0.42
20°C	0.14±0.00	0.39±0.19	0.83±0.17	1.71±0.80
30°C	0.13±0.04	0.13±0.03	0.49±0.10	1.22±0.45

**Tab. 3.9-22:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *P. potamios* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.



**Abb. 3.9-29:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten ( $k_N$ ,  $k_1$ ) für *C. granulata* Hämocyanin. Der pH-Wert der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg·ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

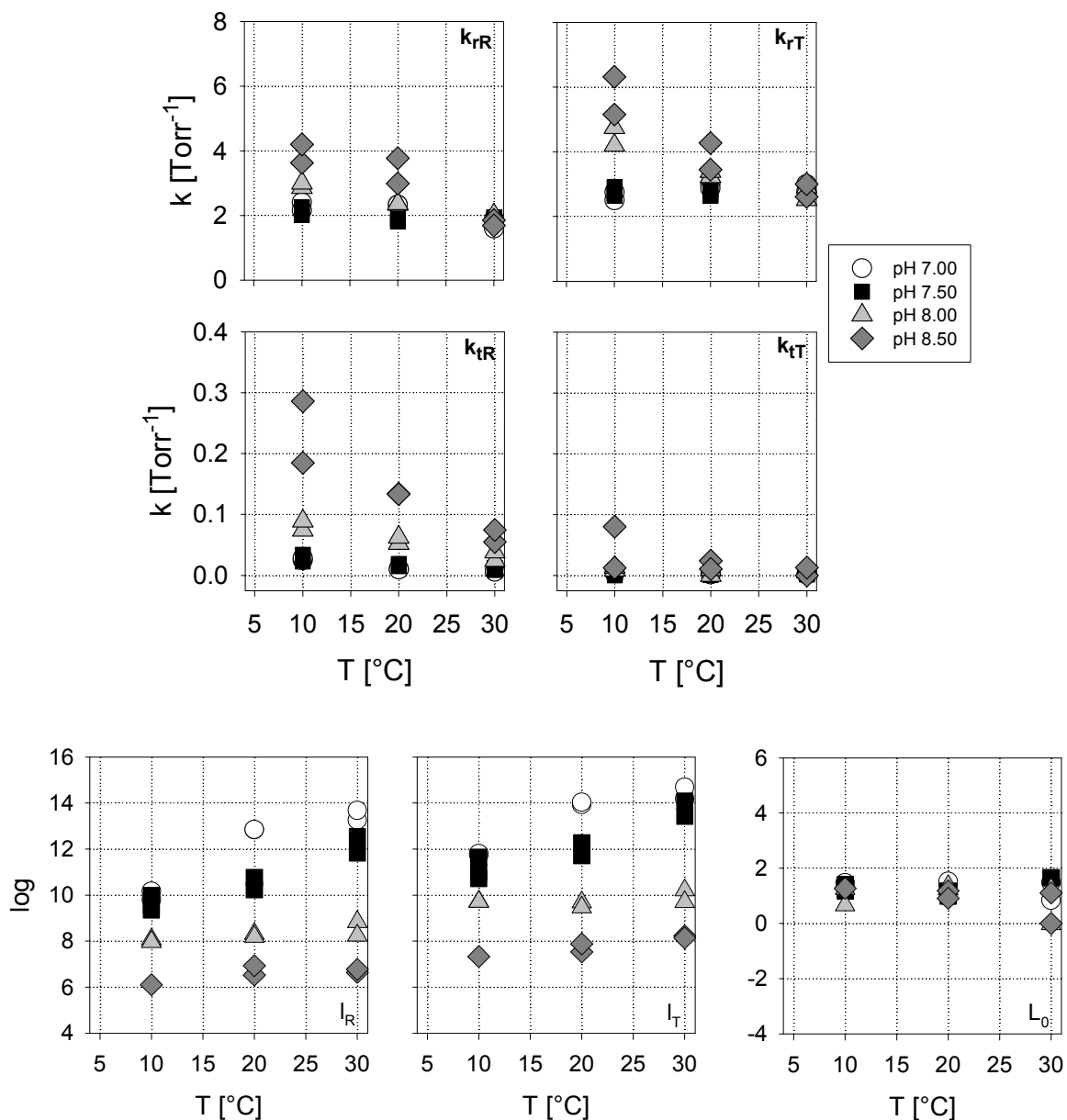
- *Analyse nach dem Nesting-Modell für pH=const.*
  - i)  $k_{iT}$  ist Temperatur und pH unabhängig
  - ii)  $k_{iR}$  bei 10°C und 20°C etwas pH empfindlich ( $k_{iR} \downarrow$  wenn  $pH \downarrow$ ), bei 30°C keine pH-Empfindlichkeit;  $k_{iR}$  ist temperaturempfindlich ( $k_{iR} \downarrow$  wenn  $T \uparrow$ )
  - iii)  $k_{iR}$  und  $k_{iT}$  bei 10°C und 20°C sehr pH empfindlich ( $k_{iR} \downarrow$  &  $k_{iT} \downarrow$  wenn  $pH \downarrow$ ); bei 30°C keine pH Empfindlichkeit;  $k_{iR}$  und  $k_{iT}$  sind temperaturempfindlich ( $k_{iR} \downarrow$  &  $k_{iT} \downarrow$  wenn  $T \uparrow$ )

Die Abb. 3.9-30 zeigt die vier errechneten Bindungs- und allosterischen Gleichgewichtskonstanten in Abhängigkeit von Temperatur und pH. Die zugehörigen Zahlenwerte für die jeweiligen Konstanten sind aus den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Temperatur	pH			
$k_{iR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	2.28±0.12	2.12±0.11	2.93±0.07	3.91±0.28
20°C	2.33±0.00	1.81±0.08	2.36±0.01	3.38±0.39
30°C	1.74±0.14	1.87±0.07	1.94±0.08	1.77±0.08
Temperatur	pH			
$K_{iR}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.027±0.002	0.028±0.005	0.082±0.008	0.24±0.05
20°C	0.010±0.000	0.017±0.002	0.058±0.005	0.13±0.00
30°C	0.0065±0.0003	0.010±0.002	0.032±0.007	0.065±0.010
Temperatur	pH			
$K_{iT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.0044±0.0005	0.0052±0.0020	0.011±0.002	0.046±0.034
20°C	0.0026±0.0008	0.0049±0.0010	0.0099	0.017±0.007
30°C	0.0021±0.0002	0.0033±0.0014	0.0086±0.0027	0.013
Temperatur	pH			
$K_{iT}$ [Torr <sup>-1</sup> ]	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	2.63±0.13	2.75±0.11	4.47±0.27	5.73±0.59
20°C	2.92±0.06	2.57±0.24	3.31±0.08	3.87±0.42
30°C	2.88±0.11	2.71±0.12	2.71±0.20	2.81±0.20

**Tab. 3.9-23:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten  $k_{iR}$ ,  $K_{iR}$ ,  $k_{iT}$  und  $K_{iT}$  für die im Nesting-Modell postulierten Halb-moleküle der T-Konformation des *C. granulata* Hämocyanins bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten. Die Werte für  $k_{iR}$ ,  $K_{iR}$ ,  $k_{iT}$  und  $K_{iT}$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten  $I_R$  und  $I_T$  sind pH abhängig. Bei pH 7.00 und 7.50 zeigen beide eine Temperaturempfindlichkeit. Wird der pH auf 7.00 bzw. 7.50 eingestellt, so nimmt  $I_R$  von 9.98±0.18 bzw. 9.78±0.21 bei 10°C auf 13.46±0.21 bzw. 12.18±0.36 bei 30°C zu und  $I_T$  steigt von 11.78±0.03 bzw. 11.32±0.34 auf 14.43±0.26 bzw. 13.75±0.33. Bei pH 8.00 ( $I_R=8.30±0.38$ ;  $I_T=9.84±0.23$ ) u. 8.50 ( $I_R=6.48±0.26$ ;  $I_T=7.83±0.38$ ) besteht keine Temperaturempfindlichkeit. Die allosterische Gleichgewichtskonstante für das Gesamtmolekül  $L_0$  ist pH- und temperaturempfindlich. Für das Hämocyanin (12-mer) beträgt  $L_0$  1.18±0.36 unabhängig von pH und Temperatur.



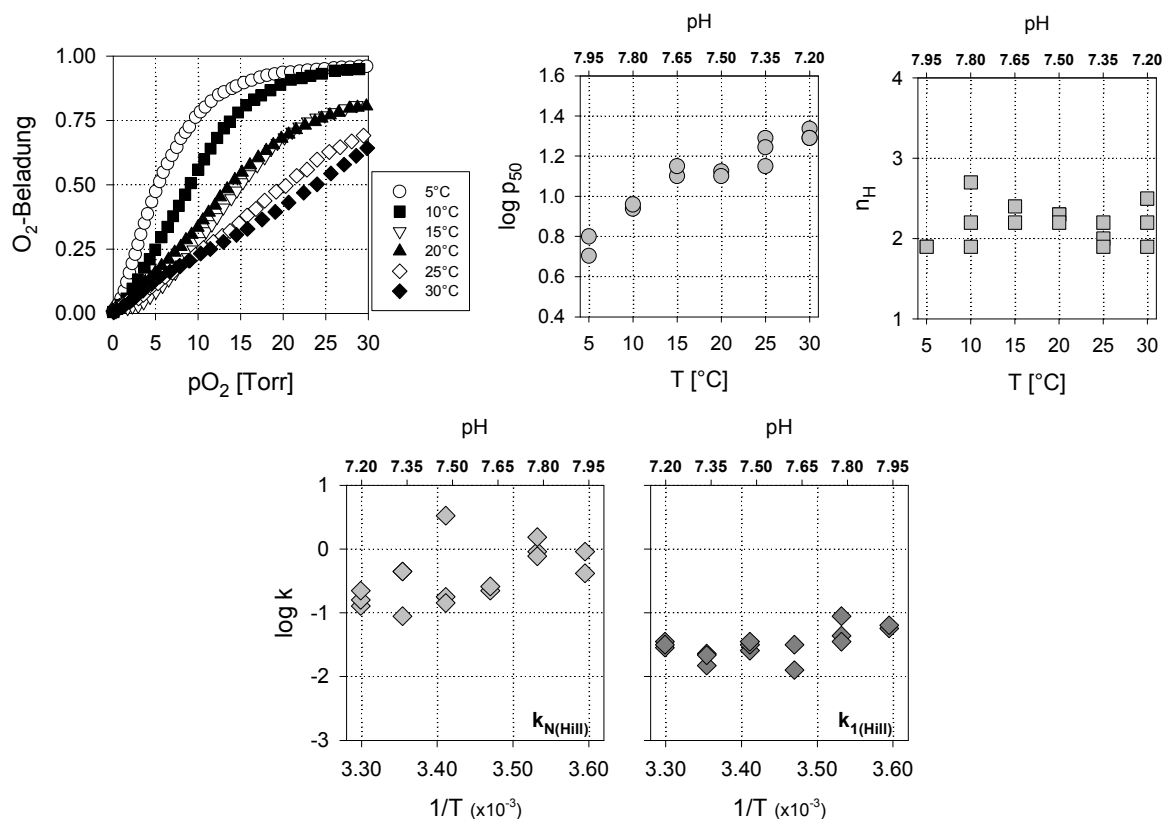
**Abb. 3.9-30:**  $\text{O}_2$ -Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstanten für *C. granulata* Hämocyanin ermittelt mit Hilfe des Nesting-Modells. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in einem  $0.1 \text{ M}$  TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von  $20 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ . Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf  $7.00$ ,  $7.50$ ,  $8.00$  und  $8.50$  bei jeweils  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  und  $30^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Ein temperaturabhängiger pH-Drift wurde dadurch verhindert.

3.9.13 I (pH=pH(T)) *Panulirus interruptus* Hämocyanin

Die O<sub>2</sub>-Bindungskurven des 6-meren *Panulirus* Hämocyanins wurden mit dem einfachen MWC-Modell analysiert.

♦ der pH ist abhängig von der Temperatur pH=pH(T)

Die Abb. 3.9-31 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungsparameter bei verschiedenen Temperaturen. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt und variiert in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH ändert sich von 7.95 auf 7.20, was einem  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von 0.03 pH-Einheiten entspricht.



**Abb. 3.9-31:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Bindungsparameter (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>N</sub>, k<sub>1</sub>) von *P. interruptus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der Temperatur induzierte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg·ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

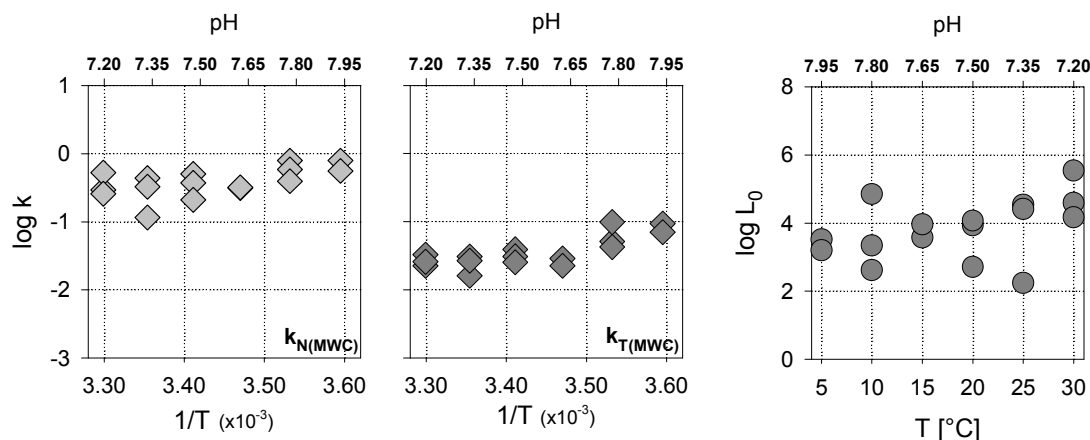
Der p<sub>50</sub>, d.h. der pO<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck, nimmt von 5.68±0.63 Torr bei 5°C auf 20.30±0.23 Torr bei 30°C zu. Der Bohr-Koeffizient ( $\Delta\log p_{50}/\Delta\text{pH}(T)$ ) ist innerhalb des pH-Bereichs von 7.95 (bei 5°C) bis 7.20 (bei 30°C) mit einem Wert von -0.67 konstant (Abb. 3.9-31, oben links).

Die Kooperativität (n<sub>H</sub>) der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyaninmolekül ist temperaturunempfindlich. Im untersuchten pH- und Temperaturbereich besitzt n<sub>H</sub> ein Wert von 2.17±0.23. (Abb. 3.9-31, oben rechts)

Die aus dem Hill-Plot ermittelten Bindungskonstanten k<sub>1(Hill)</sub> und k<sub>N(Hill)</sub> werden mit zunehmender Erwärmung und gleichzeitig abnehmenden pH-Wert kleiner (Abb. 3.9-31, unten). Die Bindungskonstante der R-Konformation (k<sub>N(Hill)</sub>) fällt von 0.66±0.25 Torr<sup>-1</sup> bei 5°C (pH 7.95) auf 0.17±0.04 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C (pH 7.20). Die T-Konformation (k<sub>1(Hill)</sub>) erreicht bei 5°C eine maximale Bindungskonstante von 0.060±0.003 Torr<sup>-1</sup>, mit fortschreitender Erwärmung verringert sich diese auf 0.033±0.002 Torr<sup>-1</sup> bei 30°C.

- Analyse nach dem MWC-Modell für  $pH=pH(T)$

Mit einer auf dem MWC-Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die zwei Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_T$ , sowie die allosterische Gleichgewichtskonstante des Gesamtmoleküls ( $L_0$ ) bestimmen.



**Abb. 3.9-32: O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstante für das *P. interruptus* Hämocyanin.** Die Datenanalyse erfolgte nach dem MWC-Modell. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.50 bei 20°C eingestellt. Der pH-Shift mit der Temperatur wurde nicht korrigiert. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die Bindungskonstanten  $k_{1(MWC)}$  und  $k_{N(MWC)}$  werden mit zunehmender Erwärmung und gleichzeitig abnehmenden pH-Wert kleiner (Abb. 3.9-32). Die Bindungskonstante der R-Konformation ( $k_{N(MWC)}$ ) fällt von  $0.68 \pm 0.12 \text{ Torr}^{-1}$  bei 5°C (pH 7.95) auf  $0.39 \pm 0.14 \text{ Torr}^{-1}$  bei 30°C (pH 7.20). Die T-Konformation ( $k_{1(MWC)}$ ) erreicht bei 5°C eine maximale Bindungskonstante von  $0.082 \pm 0.012 \text{ Torr}^{-1}$ , mit fortschreitender Erwärmung verringert sich diese auf  $0.027 \pm 0.004 \text{ Torr}^{-1}$  bei 30°C.

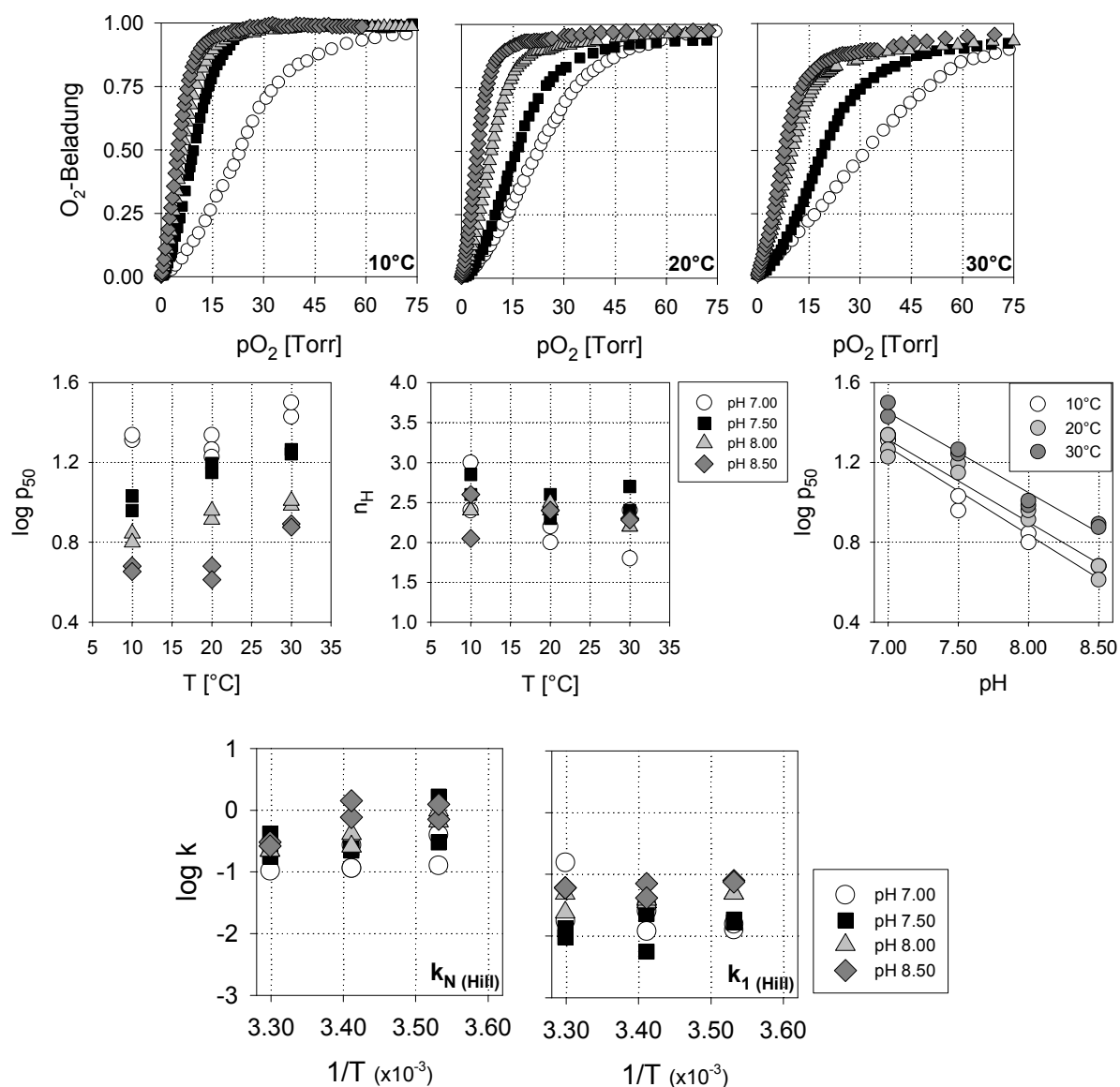
Beobachtet man in der Abb. 3.9-32 den Verlauf der allosterischen Gleichgewichtskonstante ( $L_0$ ) des Hämocyaninmoleküls zwischen 5°C und 30°C, so nehmen die Werte für von  $4.00 \pm 0.00$  auf  $7.42 \pm 0.15$  bzw. von  $5.40 \pm 0.20$  auf  $9.29 \pm 0.11$  zu.  $L_0$  zeigt keine signifikante Abhängigkeit und besitzt im untersuchten Temperaturbereich einen konstanten Wert von  $3.83 \pm 0.85$ .



3.9.14 II (pH=const.) *Panulirus interruptus* Hämocyanin

♦ der pH ist unabhängig von der Temperatur pH=const.

Vier pH-Werte (7.00, 7.50, 8.00 und 8.50) wurden jeweils bei 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Die Abb. 3.9-33 zeigt die O<sub>2</sub>-Bindungskurven und Parameter des *P. interruptus* Hämocyanins bei den verschiedenen pH- und Temperaturwerten.



**Abb. 3.9-33:** O<sub>2</sub>-Bindungskurven, -parameter und Bohreffekt (p<sub>50</sub>, n<sub>H</sub>, k<sub>N</sub>, k<sub>1</sub>, und  $\Delta \log p_{50}/\Delta \text{pH}$ ) von *P. interruptus* Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Ein pH-Shift mit der Temperatur war dadurch ausgeschlossen. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

- i) der  $p_{50}$  nimmt mit steigender Temperatur zu
- ii) der  $p_{50}$  nimmt mit steigendem pH ab.
- iii) die Kooperativität ( $n_H$ ) ist pH und Temperatur unempfindlich

Der  $p_{50}$  (Abb. 3.9-33; Mitte links) steigt bei pH 7.00 von  $21.10 \pm 0.60$  Torr bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $29.25 \pm 2.35$  Torr bei  $30^\circ\text{C}$ . Bei pH 7.50 ändert sich der  $p_{50}$  im gleichen Temperaturintervall von  $9.92 \pm 0.83$  Torr auf  $17.95 \pm 0.45$  Torr. Bei pH 8.00 und 8.50 nimmt der  $p_{50}$  zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  von  $6.65 \pm 0.35$  Torr bzw.  $4.65 \pm 0.15$  Torr auf  $9.93 \pm 0.28$  Torr bzw.  $7.65 \pm 0.15$  Torr zu. Die Bohrkoeffizienten für die jeweilige Temperatur sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Temperatur	$\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$
$10^\circ\text{C}$	-0.44
$20^\circ\text{C}$	-0.41
$30^\circ\text{C}$	-0.40

**Tab. 3.9-24: Der Bohreffekt von *P. interruptus* Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.** Der  $\Delta \text{pH}$ -Wert betrug 1.50. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  eingestellt. Die Hämocyaninkonzentration betrug  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) (Abb. 3.9-33; Mitte Mitte) als das Maß für die Kooperativität der  $\text{O}_2$ -Bindung an das *P. interruptus* Hämocyanin, zeigt bei pH 7.00 und 7.50 eine Temperaturempfindlichkeit:  $n_H$  verringert sich von  $2.70 \pm 0.30$  (pH 7.00) bzw.  $2.73 \pm 0.13$  (pH 7.50) bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $2.10 \pm 0.30$  bzw.  $2.55 \pm 0.15$  bei  $30^\circ\text{C}$ . Diese signifikante Temperatursensitivität geht bei pH 8.00 ( $n_H = 2.35 \pm 0.11$ ) und 8.50 ( $n_H = 2.34 \pm 0.16$ ) verloren.

Temperatur	pH			
$k_1 [\text{Torr}^{-1}]_{(\text{HIII})}$	7.00	7.50	8.00	8.50
$10^\circ\text{C}$	$0.014 \pm 0.002$	$0.018 \pm 0.001$	$0.049 \pm 0.000$	$0.077 \pm 0.002$
$20^\circ\text{C}$	$0.023 \pm 0.008$	$0.014 \pm 0.009$	$0.037 \pm 0.002$	$0.056 \pm 0.015$
$30^\circ\text{C}$	$0.087 \pm 0.070$	$0.012 \pm 0.002$	$0.037 \pm 0.012$	$0.060 \pm 0.000$
Temperatur	pH			
$k_N [\text{Torr}^{-1}]_{(\text{HIII})}$	7.00	7.50	8.00	8.50
$10^\circ\text{C}$	$0.26 \pm 0.14$	$0.99 \pm 0.68$	$0.83 \pm 0.17$	$0.98 \pm 0.27$
$20^\circ\text{C}$	$0.17 \pm 0.08$	$0.23 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.08$	$1.10 \pm 0.33$
$30^\circ\text{C}$	$0.20 \pm 0.09$	$0.30 \pm 0.12$	$0.22 \pm 0.00$	$0.28 \pm 0.02$

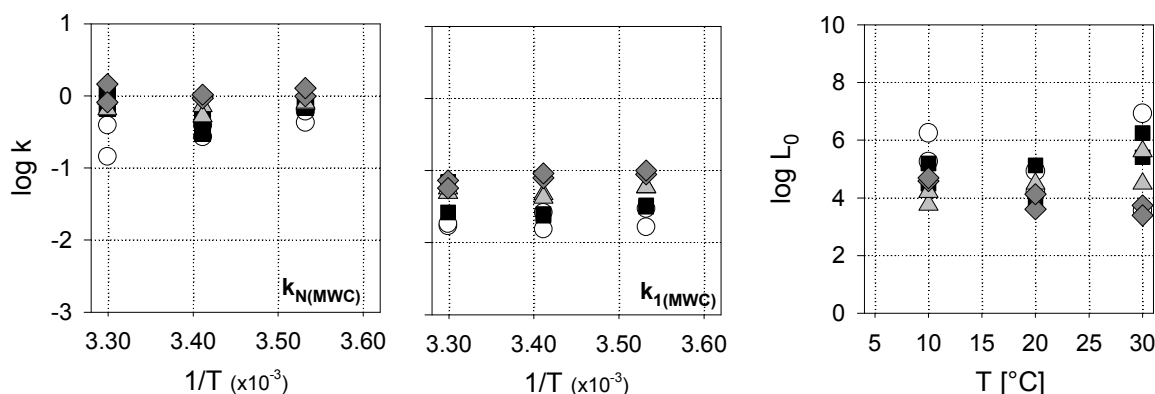
**Tab. 3.9-25:  $\text{O}_2$ -Bindungskonstanten (aus dem Hill-Plot) für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *P. potamios* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.**  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.

- Analyse nach dem MWC-Modell für  $pH=const.$

Mit einer auf dem MWC-Modell beruhenden Fit-Routine lassen sich die zwei Bindungskonstanten  $k_N$  und  $k_1$ , sowie die allosterische Gleichgewichtskonstante  $L_0$  bestimmen.

Temperatur	pH			
$k_1$ [Torr <sup>-1</sup> ] <sub>(MWC)</sub>	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.023±0.007	0.032±0.001	0.059±0.001	0.094±0.006
20°C	0.021±0.005	0.024±0.001	0.045±0.002	0.085±0.006
30°C	0.018±0.001	0.048±0.022	0.053±0.001	0.065±0.008
Temperatur	pH			
$k_N$ [Torr <sup>-1</sup> ] <sub>(MWC)</sub>	7.00	7.50	8.00	8.50
10°C	0.52±0.09	0.75±0.06	0.79±0.01	1.13±0.15
20°C	0.33±0.06	0.40±0.10	0.62±0.10	0.98±0.06
30°C	0.27±0.13	0.89±0.22	0.78±0.13	1.17±0.28

**Tab. 3.9-26:** O<sub>2</sub>-Bindungskonstanten (aus dem MWC-Modell) für den ersten und letzten Bindungsschritt ( $k_1$  und  $k_N$ ) an das *P. potamios* Hämocyanin bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten.  $k_1$  und  $k_N$  wurden aus jeweils zwei Bindungskurven ermittelt.



**Abb. 3.9-34:** O<sub>2</sub>-Bindungs- und allosterische Gleichgewichtskonstante für das *P. interruptus* Hämocyanin ermittelt mit Hilfe des MWC-Modells. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0.15 mg\*ml<sup>-1</sup> in einem 0.1 M TRIS-HCl Puffer in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>. Der pH der Hämocyaninlösung wurde auf 7.00, 7.50, 8.00 und 8.50 bei jeweils 10°C, 20°C und 30°C eingestellt. Eine temperaturabhängige pH-Drift wurde dadurch verhindert.

Die allosterische Gleichgewichtskonstante zeigt eine geringe pH-Empfindlichkeit. Bei pH 7.00 und 7.50 wird für  $\log L_0$  ein Wert von  $5.12 \pm 1.02$  ermittelt. Bei pH 8.00 und 8.50 verringert sich  $\log L_0$  auf  $4.02 \pm 0.49$ .

### 4 Diskussion

Untersucht wurden Hämocyanine aus sieben verschiedenen Arthropodenarten (sechs Crustaceenarten und eine Arachnidenart). Verglichen wurde der Einfluss der Temperatur und des pHs auf die Sauerstoffbindungseigenschaften. Neben den relativ gut charakterisierten Hämocyaninmolekülen aus *Eurypelma californicum*, *Astacus astacus*, *Homarus americanus* und *Panulirus interruptus* [DECKER & STERNER, 1990; DECKER, 1981; KUIPER et al, 1980], wurden drei relativ unbekannte Hämocyanine aus *Calappa granulata*, *Potamon potamios* und *Paralithodes camtschatica* näher analysiert. Neben der phänomenologischen Betrachtung der Bindungsparameter, erfolgte eine Analyse der molekularen Wechselwirkungen an Hand von theoretischen Modellen (Nesting- und MWC-Modell). Ziel war es eine mögliche Beziehung zwischen der Funktion von Hämocyaninmolekülen und dem Biotop des jeweiligen Tieres zu finden.

#### 4.1 Die Hämolymphe-Zusammensetzung

Das Hauptprotein in der Hämolymphe von Crustaceen und Cheliceren ist mit mehr als 80% das respiratorische Protein Hämocyanin. Neben diesem respiratorischen Protein lässt sich aus der Hämolymphe auch ein Nicht-Respiratorisches-Protein, das sogenannte „NRP“, isolieren. Weiterhin finden sich je nach Geschlecht, Entwicklungsphase und Ernährungszustand der Tiere verschiedene Lipoproteine in der Hämolymphe.

##### 4.1.1 Die Lipoproteine

In der Hämolymphe von Crustaceen und Cheliceren fanden sich artspezifische Lipoproteine in unterschiedlicher Anzahl, Farbe und Dichte (Abb. 3.7-1). Die mit der Ultrazentrifuge in einem Dichtegradienten aufgetrennten Lipoproteine zeigten ähnliche Absorptionsspektren mit einem Hauptpeak im UV-Bereich zwischen 273 nm und 277 nm, sowie einen weiteren Peak im VIS-Bereich zwischen 460 nm und 490 nm (Abb. 3.7-3). Die Absorptionsbanden im UV-Bereich können dem Proteinanteil (Apolipoprotein) des Lipoproteins zugeordnet werden. Die mit den Lipoproteinen assoziierten Carotenoide (Astaxanthin;  $\beta$ -Carotin), sorgen für die im VIS-Bereich liegenden Banden [PATERAKI & STRATAKIS, 1997; WALLACE et al, 1967]. Die mit Hilfe einer SDS-PAGE durchgeführte Molekulargewichtsabschätzung (Abb. 3.7-4) der Apolipoproteine, ergab eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten aus früheren Arbeiten [PATERAKI & STRATAKIS, 1997; STRATAKIS et al., 1993; STRATAKIS et al., 1992]. Eine erste Untersuchung einiger Lipoproteine zeigte, dass der Gehalt an Cholesterin und Triglyceriden unterschiedlich war, wobei in der Untersuchung nicht auf das Geschlecht, Ernährung und Entwicklungsstufe der Tiere eingegangen wurde. Der Cholesterin- und Triglyceridgehalt ist vergleichbar mit Lipoproteinen aus anderen Arthropodenarten [LUBZENS et al., 1997].

Ein möglicher Einfluss von Lipoproteinen auf die Sauerstoffbindungseigenschaften der Hämocyanine wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Allerdings ist dieser nicht von der Hand zu weisen, da bei Hämocyaninen eine Lipidbindungskapazität beschrieben worden ist [CUNNINGHAM et al., 1999; ZATTA, 1980] und diese könnte die Affinität zum Sauerstoff beeinflussen.

### 4.1.2 Das Nicht-Respiratorische-Protein (NRP)

Drei NRPs von *E. californicum*, *A. astacus* und *C. maenas* wurden näher charakterisiert. Das NRP von *E. californicum* wies zu den beiden Crustaceen NRPs deutliche strukturelle Unterschiede auf. Das  $M_r$  der beiden Untereinheiten der Vogelspinne liegt mit 126 kDa und 102 kDa beträchtlich über dem der beiden Crustaceenarten. Im EM Bild besitzt das NRP von *E. californicum* eine linsenförmige Gestalt, wogegen die Crustaceen ein NRP mit einer hexameren Struktur zeigen (Abb. 3.6-2). Das NRP der Vogelspinne wird in früheren Arbeiten [MARKL et al., 1976] als ein 16S Tetramer beschrieben. In der Arbeit von STRATAKIS et al. (1993) wird ein aus der HL von *E. californicum* isoliertes Lipoprotein mit einer Dichte von 1.27 g\*ml (VHDL) als das mögliche NRP diskutiert. Für ein Lipoprotein sprechen das SDS-PAGE Bandenmuster, welches dem eines Apolipoproteins gleicht (Abb. 3.6-1) und die im EM erkennbare Linsenform des NRPs. Aufnahmen von Insekten-Lipoproteinen zeigen eine im EM dem NRP aus *E. californicum* sehr ähnlichen Form [BLACKLOCK & RYAN, 1994]. Eine genauere Charakterisierung erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit.

### 4.1.3 Die Hämocyanine

Die strukturell gut charakterisierten Hämocyanine [van HOLDE, 1998, 1995] aus *P. interruptus* (6-mer) und *E. californicum* (24-mer) werden im weiteren als Referenz verwendet. Alle Crustaceen (außer *P. interruptus* (6-mer)) Hämocyanine erscheinen im EM als 2x6-mer (Abb. 3.5-1) und weisen gelchromatographisch ein sehr ähnliches Elutionsprofil auf. An Hand der Elutionsvolumina lässt sich grob ein  $M_r$  von etwa 950 kD für die 2x6-mere ermitteln (Tab. 3.3-1). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den  $M_r$  Werten von anderen Crustaceen Hämocyaninen [ELLERTON et al., 1983; van HOLDE & MILLER, 1995; MARKL & DECKER, 1992]. Das längere Aufbewahren bei  $-18^{\circ}\text{C}$  führt bei dem Hämocyanin aus *P. potamios* zur teilweisen, und beim Hämocyanin aus *C. granulata* zu einer vollständigen Dissoziation in 6-mere (Abb. 3.4-2). In alkalischer PAGE zerfällt das 2x6-mer Hämocyanin von *H. americanus* vollständig in 6-mere, während die anderen Hämocyanine intakt bleiben. Die sehr ähnlichen 2x6-mer Quartärstrukturen der Crustaceen werden aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt, die sich hinsichtlich Größe und elektrischer Mobilität in der SDS-PAGE deutlich unterscheiden (Abb. 3.4-1). Die Heterogenität der Untereinheiten ist artspezifisch und unterschiedlich stark ausgeprägt. Während bei *P. potamios* nur ein Typ von Untereinheit erkannt wird, sind beim Hämocyanin aus *C. granulata* vier verschiedene Typen zu unterscheiden. Die mit Hilfe der SDS-PAGE bestimmten relativen Molekulargewichte ( $M_r$ ) der Untereinheiten (Tab. 3.4-1) sind in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten [ELLERTON et al., 1983; van HOLDE & MILLER, 1995].

## 4.2 Vergleich der Hämocyanine hinsichtlich Funktion, Biotop, Struktur und Stabilität

Die Hämocyanine aus den untersuchten Tieren, lassen sich an Hand ihres Lebensraumes in zwei Gruppen gliedern. Die Gruppe (1) umfasst den Flusskrebs *Astacus astacus*, die semi-terrestrisch lebende Süßwasserkrabbe *Potamon potamios*, sowie die Vogelspinnenart *Eurypelma californicum*. Der zweiten Gruppe (2) werden die ozeanischen Crustaceen *Paralithodes camtschatica* (sehr kalte Gewässer), *Panulirus interruptus* (kalte Gewässer) *Homarus americanus* (gemäßigte Gewässer) und *Calappa granulata* (warme Gewässer) zugeordnet. Die Körpertemperatur dieser poikilothermen Tiere und damit die Hämolymphtemperatur und der HämolympH-pH, sind von der Umgebungstemperatur abhängig. *In vivo* ergibt sich daher ein synergistischer Effekt durch eine temperaturbedingte pH Verschiebung und durch eine metabolisch bedingte pH-Veränderung auf die Funktion des frei in der Hämolymphe vorkommenden Hämocyanins,. Durch die beiden Versuchsansätze  $\text{pH}=\text{pH}(\text{T})$  und  $\text{pH}=\text{const.}$  konnte der reine Temperatur- und pH-Effekt auf das Hämocyanin getrennt betrachtet werden.

#### 4.2.1 Gruppe (1): *Astacus astacus* (*leptodactylus*), *Potamon potamios* und *Eurypelma californicum*

##### i) Die Hämocyaninfunktion bei $pH=pH(T)$

Der Vergleich der  $O_2$ -Bindungsparameter zeigt bei diesen Tieren ein Hämocyanin mit einer sehr hohen  $O_2$ -Affinität und einem sehr guten Sauerstoff-Freisetzungspotential. Für die hohe Affinität im Temperaturbereich von  $5^\circ C$  bis  $30^\circ C$  sprechen die niedrigen  $p_{50}$ -Werte. Das Hämocyanin der Süßwasserkrabbe *P. potamios* weist hier die niedrigsten Werte auf. Die deutlich ausgeprägte Kooperativität der drei untersuchten Hämocyanine sorgt für eine gute Mobilisierung des gebundenen Sauerstoffs am Ort des  $O_2$ -Bedarfs, d.h. auf Ebene der stoffwechselaktiven Zellen. Eine geringe Abnahme der  $O_2$ -Konzentration in der Hämolymphe führt zu einer schnellen Freisetzung des am Hämocyanin gebundenen Sauerstoffs. Das 4x6-mer Hämocyanin der Vogelspinne hat aufgrund der höheren Anzahl von  $O_2$ -Bindungsstellen eine gut doppelt so große Kooperativität, wie die 2x6-mer Hämocyanine der beiden Crustaceen. Die stark kooperative  $O_2$ -Bindung ermöglicht es der Vogelspinne in ihren kurzen aktiven Phasen, den an das Hämocyanin gebundenen Sauerstoff rasch zu mobilisieren. Die Hämolymphezirkulation bei einer aktiven Spinne kommt vollständig zum Erliegen und wird an den Buchlungen nicht mehr mit Sauerstoff angereichert [PAUL et al. 1991]. Durch den erhöhten Stoffwechsel in der Aktivitätsphase reicht der in der Hämolymphe physikalisch gelöste Sauerstoff für einen aeroben Stoffwechsel nicht mehr aus. Die freie  $O_2$ -Konzentration nimmt am Ort des Verbrauchs rasch ab, der gebundene Sauerstoff wird jetzt aufgrund der ausgeprägten Kooperativität des Hämocyaninmoleküls rasch freigesetzt. In der anschließenden Erholungsphase setzt die Hämolymphezirkulation wieder ein. Die Hämolymphe wird an den Buchlungen wieder mit  $O_2$  angereichert und die Hämocyaninmoleküle werden erneut beladen. Das Hämocyanin von *A. astacus* und *P. potamios* hat physiologisch die gleiche Funktion, nur dass bei den Crustaceen die Zirkulation der Hämolymphe nicht unterbrochen wird, sondern auch in der Bewegungsphase ständig aufrecht erhalten und an den Kiemen mit  $O_2$  versorgt wird. Das Bewegungsmuster der Krabbe unterscheidet sich sehr von dem der Vogelspinne. Die Spinne bewegt sich nur sehr selten, kurz und schnell (Jagd; Flucht), mit anschließender Erholungsphase zur Reoxygenierung der Hämolymphe. Die Crustaceen bewegen sich langsamer, öfter und länger (Nahrungssuche) und brauchen eine kontinuierliche  $O_2$ -Versorgung über die Kiemen. Alle drei Hämocyanine dieser Gruppe (1) besitzen eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber pH-Änderungen. Ist diese temperaturbedingt, so wirken der Temperatur- und pH-Effekt (Bohr-Effekt) synergistisch auf die Sauerstoffaffinität des Hc-Moleküls: die Affinität nimmt ab und der  $p_{50}$  steigt an. Bei dem *E. californicum* Hämocyanin ist der gleichzeitige Einfluss von pH und Temperatur mit  $(\Delta \log p_{50} / \Delta pH + \Delta \log p_{50} / \Delta T) = -1.32$  am stärksten ausgeprägt. Etwas schwächer mit  $-1.09$  fällt dieser bei *P. potamios*, so wie mit  $-0.82$  bei *A. astacus* aus. Beim Vergleich der Biotope dieser drei Tiere fällt auf, dass *A. astacus* eine rein aquatische Lebensweise im Süßwasser führt, wogegen die ebenfalls aus dem Süßwasser kommende Krabbe *P. potamios* zu einer amphibischen Lebensweise übergegangen ist. Gänzlich terrestrisch ist die in ariden Gebieten Nordamerikas lebende Vogelspinne *E. californicum*. Der im Wasser lebende Süßwasserkrebs *A. astacus* ist Temperaturschwankungen zwischen  $5^\circ C$  und  $20^\circ C$  ausgesetzt. *P. potamios* trifft in seinem Lebensraum auf eine Temperaturspanne von  $5^\circ C$  im Januar und bis zu über  $25^\circ C$  im August. Den größten Temperaturbereich von  $5^\circ C$  bis zu über  $35^\circ C$  hat die Vogelspinne *E. californicum* in Ihrem wüstenähnlichen Lebensraum zu bewältigen.

Die Hämocyanine dieser drei Tiere zeigen *in vitro* keine signifikante funktionelle Biotopanpassung. Die  $p_{50}$ -Werte von *A. astacus* und *E. californicum* Hämocyanin liegen trotz der deutlich verschiedenen Lebensräume im gleichen Größenbereich. Die amphibisch lebende Süßwasserkrabbe *P. potamios* nimmt hinsichtlich ihres Biotops eine Mittelstellung zwischen *A. astacus* und *E. californicum* ein, das Hämocyanin von *P. potamios* hat aber eine doppelt so große Affinität zum Sauerstoff, wie die beiden anderen Tiere. Bei allen drei Tieren besitzt das Hämocyanin bei einer hohen Temperatur ( $30^\circ C$ ) und niedrigem pH ( $7.20$  bzw.

7.50) eine hohe O<sub>2</sub>-Affinität und ist daher in der Lage genügend Sauerstoff in der Hämolymphe zu transportieren.

Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  sind mit einem relativ großen Fehler behaftet, so dass sie nur eine geringe Aussagekraft hinsichtlich eines Vergleichs zwischen den Tieren haben. Beide Konstanten werden mit steigender Temperatur und sinkendem pH kleiner. Am empfindlichsten reagiert die Bindungskonstante für das letzte O<sub>2</sub>-Molekül ( $k_N$ ) auf die kombinierte Temperaturzu- und pH-Abnahme:  $k_N$  verringert sich bei 30°C auf ein Zehntel (ein Fünftel bei *E. californicum*) des Wertes bei 5°C. Die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls ( $k_1$ ) an das Hämocyanin von *A. astacus*, *P. potamios* und *E. californicum* wird durch einen Temperaturanstieg mit gleichzeitiger pH-Abnahme etwas weniger beeinflusst. Die schon bei 5°C sehr kleinen Bindungskonstanten der drei Hämocyaninspecies verringern sich bei 30°C bis auf ein Fünftel des Ausgangswertes.

Tier-Art	T <sub>VS</sub> (pH)	T <sub>50</sub> (pH)	T <sub>D</sub> (pH)	Hämocyanin
<i>A. leptodactylus</i>	45°C (7.32)	-	59°C (6.33)	12-mer
<i>P. potamios</i>	38°C (6.96)	59°C (6.33)	61°C (6.27)	12-mer
<i>E. californicum</i>	35°C (7.35)	-	70°C (6.30)	24-mer

**Tab. 4.2-1: Charakteristische Parameter zur Beurteilung des Einflusses der Temperatur und pH auf die O<sub>2</sub>-Beladung verschiedener Hämocyanine.** Bestimmt aus der Abb. 3.8-2; Es bedeuten: T<sub>VS</sub> die Temperatur bis der noch Vollsättigung (rel. O<sub>2</sub>-Beladung >0.90) vorliegt; T<sub>50</sub> die Temperatur ab der Halbsättigung erreicht ist; T<sub>D</sub> die Temperatur ab der eine irreversible Denaturierung eintritt

Gemeinsam ist den drei Hämocyaninen eine hohe Temperaturstabilität. Das Hämocyanin von *A. leptodactylus* und *P. potamios* denaturiert (T<sub>D</sub>) bei 59°C (pH 6.33) bzw. 61°C (pH 6.27) (Abb. 3.8-2). Bis 70°C (pH 6.30) bleibt das Hämocyaninmolekül von *E. californicum* stabil. Für das Spinnenhämocyanin ist bei DSC-Versuchen eine Hitzestabilität von über 85°C beschrieben worden [STERNER & DECKER, 1995; HÜBLER, 2001]. Eine Schädigung konnte durch ein Kontrollgel (NATIVE-PAGE) ausgeschlossen werden, so dass diese Diskrepanz bei der thermischen Denaturierung auf die unterschiedliche Versuchsanordnung (DSC vs. temperierte Absorptionsspektroskopie) zurückzuführen ist.

Die hohe Temperaturstabilität für das Hämocyanin aus *P. potamios* und *E. californicum* lässt sich gut mit den möglichen hohen Temperaturen im Biotop in Beziehung setzen. Bei *A. leptodactylus* scheitert dieser Erklärungsversuch jedoch. Der Grund für diese ausgeprägte Temperaturstabilität muss hier eher in der Quartärstruktur der Hämocyaninmoleküle gesucht werden. Für das 2x6-mer *A. astacus* Hämocyanin ist eine Disulfidbrücke zwischen den Hexameren für die ausgeprägte Stabilität verantwortlich [MARKL et al. 1992]. Wogegen bei *E. californicum* das 4x6mer Hämocyanin durch eine große Anzahl von nichtkovalenten Bindungen und zweiwertigen Kationen (Ca<sup>2+</sup>; Mg<sup>2+</sup>) auch bei sehr hohen Temperaturen stabilisiert wird [STERNER & DECKER, 1995]. Für das *P. potamios* Hämocyanin ist die genaue Quartärstruktur nicht bekannt, so dass über mögliche kovalente Bindungen zur Stabilisierung des Moleküls als Ursache für die Wärmestabilität nur spekuliert werden kann.

Wenn die Überlegung stimmt, dass das Hämocyanin aus *E. californicum* und *P. potamios* die Aufgabe hat bei hohen Temperaturen möglichst viel Sauerstoff zu binden, um den Verlust an physikalisch gelöstem Sauerstoff in der Hämolymphe auszugleichen, dann sollte das Hämocyanin dieser Tiere auch bei hohen Temperaturen fast vollständig mit O<sub>2</sub> beladen sein. Das Hämocyanin aus *A. leptodactylus* sollte aus dieser Überlegung heraus einen deutlich niedrigeren Beladungsgrad aufweisen, da der Flusskrebs gemäßigte Temperaturbedingungen in seinem Biotop vorfindet. Diese Hypothese lässt sich experimentell aber nicht bestätigen. Das Hämocyanin aus *A. leptodactylus* hat mit 45°C sogar den höchsten T<sub>VS</sub>-Wert, demgegenüber haben die Hämocyanine aus der Vogelspinne und der Süßwasserkrabbe einen T<sub>VS</sub>-Wert von 35°C bzw. 38°C (Tab. 4.2-1). Eine vom Biotop abhängige Temperaturanpassung der O<sub>2</sub>-Beladung, ist daher bei den Gruppe (1) Hämocyaninen nicht festzustellen.

➤ Thermodynamische Analysen für pH=pH(T)

- Der Hill-Plot

Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

An Hand der Bindungskonstanten  $k_1$  für das erste und  $k_N$  für das letzte  $O_2$ -Molekül lässt sich mit  $\Delta G_{1\text{ bzw. }N} = -RT \ln(k_{1\text{ bzw. }N}/\kappa)$  die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung an die T- bzw. R-Form des Hämocyaninmoleküls berechnen. Das  $\Delta G_{1\text{ bzw. }N}$  ist bei allen drei Tieren Temperatur und pH unabhängig (Tab. 4.2-2 und Abb. 4.2-1).

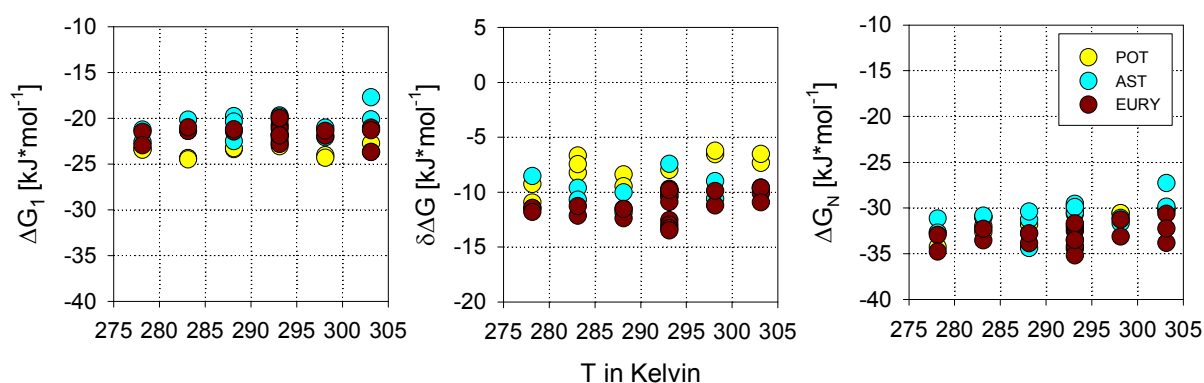
Tier	$\Delta G_1$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_N$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]
<i>P. potamios</i>	-23.65±0.63	-31.77±1.34
<i>A. astacus</i>	-20.74±1.29	-30.72±1.53
<i>E. californicum</i>	-21.65±0.83	-33.00±1.23

**Tab. 4.2-2: Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung** an die niedrig-affine T- und die hoch-affine R-Konformation der Gruppe (1) Hämocyanine. Der Temperaturbereich lag zwischen 5°C und 30°C. Der temperaturbedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert

Die Differenz der freien Gibbschen Energie ( $\delta\Delta G$ ), mit  $\delta\Delta G = -RT \ln(k_N/k_1)$ , liefert die Information über die freie Energie, die dem Konformationsübergang von T nach R innewohnt. Diese bleibt für die Hämocyanine der Gruppe (1) im gewählten Temperaturbereich konstant. (Tab. 4.2-3 und Abb. 4.2-1).

Tier	$\delta\Delta G$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]
<i>P. potamios</i>	-8.12±1.53
<i>A. astacus</i>	-9.99±1.12
<i>E. californicum</i>	-11.35±1.23

**Tab. 4.2-3: Differenz der freien Gibbschen Energie ( $\delta\Delta G$ )** beim Konformationsübergang von der niedrig affinen T-Form in die hoch affine R-Form der Gruppe (1) Hämocyanine. Der Temperaturbereich lag zwischen 5°C und 30°C. Der temperaturbedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert



**Abb. 4.2-1: Thermodynamische Parameter ( $\Delta G_1$ ,  $\delta\Delta G$ ,  $\Delta G_N$ )** der  $O_2$ -Bindung an die Gruppe (1) Hämocyanine. Der pH shiftet mit der Temperatur und wurde nicht nach korrigiert.



Die Beträge der freien Energie der Bindung von Sauerstoff an die drei Hämocyane in der T- oder R-Konformation sind gering. Sie liegen in der Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen ( $10\text{-}30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Die Energiedifferenz zwischen der T- und der R-Konformation fällt noch niedriger aus, so dass diese im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien ( $<10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) liegt. Diese niedrigen  $\Delta G$ -Werte besitzen dennoch einen sehr großen Einfluss auf die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$ . Dieses wird deutlich, wenn die Formel  $\Delta G_{1 \text{ bzw. } N} = -RT \ln(k_{1 \text{ bzw. } N}/\kappa)$  nach  $(k_{1 \text{ bzw. } N}/\kappa) = e^{\Delta G/-RT}$  umgestellt wird. Durch den exponentiellen Zusammenhang zwischen der  $k_{1 \text{ bzw. } N}$  und dem  $\Delta G$ , bewirkt eine kleine Änderung der freien Energie eine große Änderung der Bindungskonstante.

Die zugehörigen Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) für  $k_1$  und  $k_N$  sind bei allen drei Hämocyaninen unabhängig von der Temperatur, die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  werden daher mit zunehmender Temperatur kleiner. Aus dem linearen Verlauf des van't Hoff Plots

( $\ln k = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$ ) lassen sich für die einzelnen Hämocyane folgende  $\Delta H$ -Werte bestimmen:

Tier	$\Delta H_1 (5^\circ\text{C-}30^\circ\text{C})$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_N (5^\circ\text{C-}30^\circ\text{C})$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]
<i>P. potamios</i>	-38.20	-74.85
<i>A. astacus</i>	-52.40	-72.10
<i>E. californicum</i>	-30.20	-59.35

**Tab. 4.2-4: Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) für  $\text{O}_2$  an die T- und R-Konformation der Gruppe (1) Hämocyane.** Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $5^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde auf 7.50 bzw. 7.80 für *E. californicum* eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert.

Bei *P. potamios* und *E. californicum* erfolgt die Bindung des letzten  $\text{O}_2$ -Moleküls unter Freisetzung von doppelt soviel Energie ( $\Delta H_N$ ), wie bei der Bindung des ersten Moleküls ( $\Delta H_1$ ). Bei *A. astacus* ist  $\Delta H_N$  nur ein Drittel größer als  $\Delta H_1$ . Die verschiedenen  $\Delta H$ -Werte haben ihre Ursache in den unterschiedlichen Wärmekapazitäten ( $\Delta C_p$ ) der Hämocyane. Denn es gilt für die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H$ :

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p (T - T_0)$$

und übertragen auf die Bindungskonstante bedeutet dies:

$$-\ln k = \frac{\Delta G}{RT} = \frac{1}{R} \left( \frac{\Delta H}{T} - \Delta S \right) \text{ mit } \frac{\Delta H(T)}{T} = \frac{\Delta H(T_0)}{T} + \Delta C_p \left( 1 - \frac{T_0}{T} \right)$$

Vier Hauptterme bestimmen die Wärmekapazität eines nativen Proteins in Lösung, a) die Primärstruktur mit den kovalenten Bindungen, b) die Sekundär- und Tertiärstruktur mit den nichtkovalenten Bindungen, c) der Hydratationsgrad und d) der Protonierungsgrad des Proteins. Die Änderung der Wärmekapazität bei einem Konformationsübergang, wie im vorliegenden Fall von T nach R, wird durch die Terme b), c) und d) beeinflusst [GOMEZ et al. 1995].

Die Größenordnung der ermittelten  $\Delta H$ -Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit Bindungsenthalpien aus früheren Arbeiten [PARODY-MORREALE et al. 1986]. Auch die Bindung von Sauerstoff an verschiedenen Säugetier-, Mollusken- und Fischhämoglobinen zeigt ähnlich große Enthalpiewerte [PELLEGRINI et al. 1999; BUGGE & WEBER 1999; VORGER 1999; Di PRISCO et al. 1991].

- Das Nesting-Modell für  $\text{pH}=\text{pH}(\text{T})$   
Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta\text{G}$  und  $\Delta\text{H}$

Die Analyse der Bindungskonstanten aus dem Nesting-Modell hinsichtlich der Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta\text{H}$ ), zeigt bei den beiden Krebsarten und der Vogelspinne für alle vier Bindungskonstanten  $k_{\text{rR}}$ ,  $k_{\text{tR}}$ ,  $k_{\text{rT}}$  und  $k_{\text{tT}}$  einen linearen Verlauf des van't Hoff Plots.

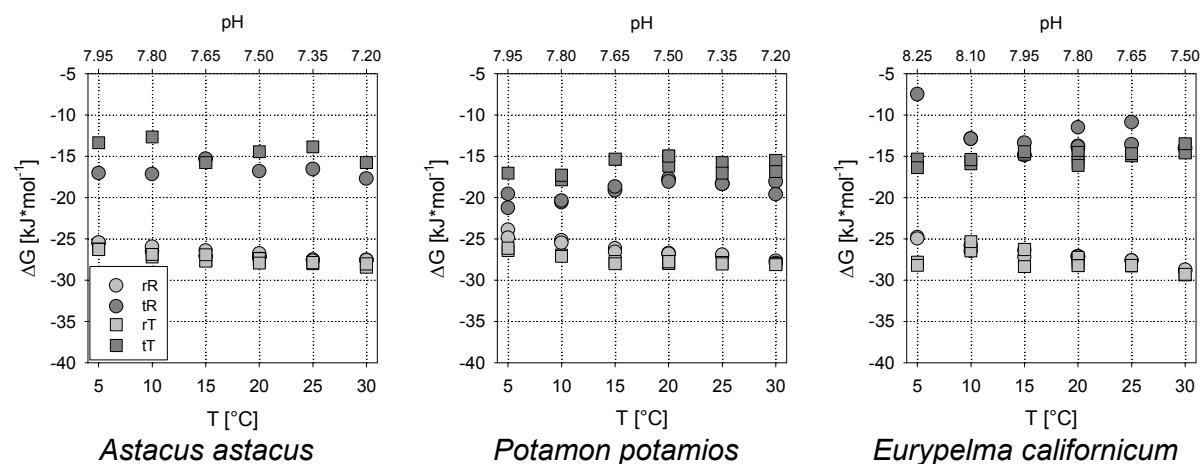
Bindungs konstante	$\Delta\text{H}_{(5^\circ\text{C}-30^\circ\text{C})} [\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$			
	<i>A. astacus</i>	<i>P. potamios</i>		<i>E. californicum</i>
$k_{\text{rR}}$	-4.85	+2.20		+4.36
$k_{\text{tR}}$	-18.30	-85.60 5°C-20°C	+7.00 20°C-30°C	-63.50
$k_{\text{rT}}$	-6.75	+4.66 5°C-15°C	-30.75 15°C-30°C	+5.05
$k_{\text{tT}}$	+1.35	-33.90		-41.65

**Tab. 4.2-5: Bindungsenthalpien ( $\Delta\text{H}$ ) für die Sauerstoffbindung an die im Nesting-Modell postulierten Konformationen.** Der  $\text{O}_2$ -Löslichkeitskoeffizient wurde berücksichtigt. Untersucht wurde im Temperaturbereich von 5°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde bei 20°C auf 7.50 bzw. 7.80 für *E. californicum* eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift von 0.03 pH-Einheiten pro °C wurde nicht korrigiert.

Im Temperaturbereich bis ca. 20°C besitzen das Hämocyanin der Süßwasserkrabe und das Hämocyanin der Vogelspinne ähnliche Bindungsenthalpien. Bei *P. potamios* zeigen  $\Delta\text{H}_{\text{tR}}$  und  $\Delta\text{H}_{\text{rT}}$  eine Temperaturabhängigkeit. Die  $\text{O}_2$ -Bindung wird um die 20°C an die tR-Konformation endotherm und an die rT-Konformation exotherm.

Im Vergleich zu *P. potamios* und *E. californicum* sind die  $\text{O}_2$ -Bindungsenthalpien der einzelnen Konformationen für das *A. astacus* Hämocyanin nur schwach exotherm bis endotherm. Durch die kovalenten Di-Sulfidbrückenbindungen zwischen den Halbmolekülen sind die Freiheitsgrade des Hämocyaninmoleküls reduziert. Dies beeinflusst die Änderung der inneren Energie des Moleküls mit der Temperatur. Die Wärmekapazität ist dadurch verringert und  $\Delta\text{H}$  ist weniger stark von der Temperatur abhängig.

An Hand der vier Bindungskonstanten  $k_{\text{rR}}$ ,  $k_{\text{tR}}$ ,  $k_{\text{rT}}$  und  $k_{\text{tT}}$  lässt sich mit  $\Delta\text{G} = -RT \ln(k/\kappa)$  die freie Gibbsche Energie ( $\Delta\text{G}$ ) der  $\text{O}_2$ -Bindung an die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen des Hämocyaninmoleküls berechnen. Bei allen drei Tieren zeigt das  $\Delta\text{G}_{\text{rR}}$  bis  $\text{tT}$  eine schwach ausgeprägte Temperatur- und/oder pH-Abhängigkeit (Abb. 4.2-2).



**Abb. 4.2-2: Freie Gibbsche Energie ( $\Delta\text{G}$ ) der  $\text{O}_2$ -Bindung für die Gruppe (1) Hämocyanine an die im Nesting-Modell postulierten Konformationen (rR, tR, rT & tT).**

Die Beträge der freien Energie ( $\Delta G$ ) der Bindung von Sauerstoff an die vier im Nesting-Modell postulierten Hämocyaninkonformationen sind wie zuvor bei den Hill-Konstanten gering. Sie liegen ebenfalls in der Größenordnung einiger Ionen- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen ( $10\text{-}30\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) und auch die Energiedifferenz zwischen den Konformationen liegt im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien ( $<10\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Aber auch hier gilt, eine kleine Änderung beim  $\Delta G$ , hat einen großen Einfluss auf die Bindungskonstante.

Einen Zusammenhang zwischen dem  $p_{50}$  und den Bindungsenthalpien bzw. den  $\Delta G$ -Werten lässt sich nicht herleiten. So haben das *A. astacus* und *E. californicum* Hämocyanin trotz der sehr unterschiedlichen Lebensräume ähnliche  $p_{50}$ -Werte, besitzen aber deutlich verschiedene  $\text{O}_2$ -Bindungsenthalpien. Die  $\Delta G$ -Werte für die drei Hämocyanine liegen unabhängig von Tierart, Biotop und Funktion ( $p_{50}$ ) im gleichen Größenbereich. Die sehr hohe Bindungsaffinität des *P. potamios* Hämocyanins findet bei den thermodynamischen Bindungsparameter keine Entsprechung.

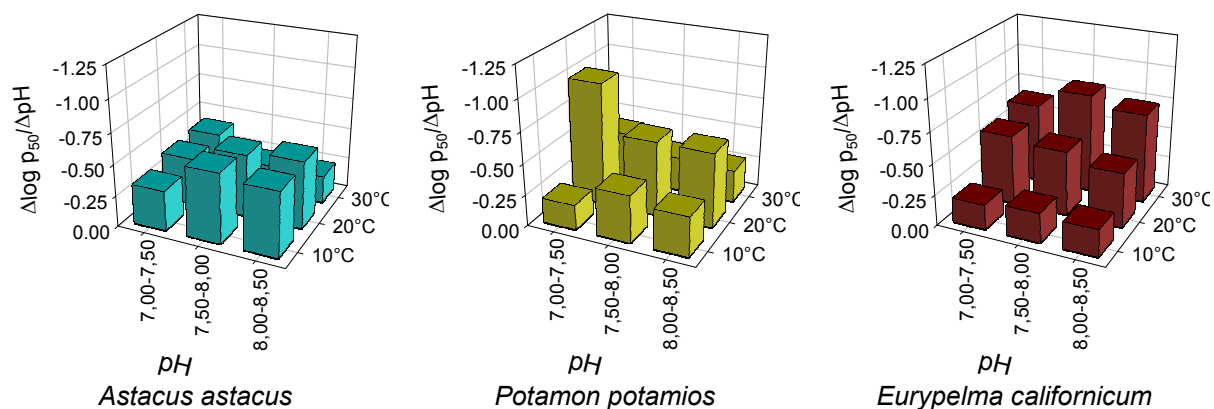
#### ii) Die Hämocyaninfunktion bei $\text{pH}=\text{const}$

Die getrennte Betrachtung des Einflusses der Temperatur und des  $\text{pH}$ -Wertes auf die Bindungseigenschaften zeigt, dass der Bohr-Effekt ( $\Delta \log p_{50}/\Delta \text{pH}$ ) auf die Hämocyaninmoleküle von *A. astacus*, *P. potamios* und *E. californicum* größer ist, als der Temperatureffekt ( $\Delta \log p_{50}/\Delta T$ ) (siehe Abb. 4.2-4). Allerdings kommt der reine Temperatureffekt *in vivo* so nicht vor. Die Tiere sind nicht in der Lage den  $\text{pH}$ -Wert in der Hämolymphe aktiv zu kontrollieren. Eine geringe Pufferwirkung haben die Proteine in der Hämolymphe, oder die mögliche Mobilisierung von  $\text{CaCO}_3$  aus dem Exoskelett kann einer  $\text{pH}$ -Abnahme entgegen wirken [ADAMCZEWSKA & MORRIS 1994]. Trotz dieser möglichen Puffersysteme in der Hämolymphe ist eine Temperaturänderung immer verbunden mit einer gleichzeitigen  $\text{pH}$ -Änderung. Dagegen ist eine  $\text{pH}$ -Abnahme der Hämolymphe bei konstanter Temperatur aufgrund einer metabolischen und respiratorischen Azidose bei aktiven Tieren *in vivo* zu beobachten. Durch eine metabolische (Bildung von D-Lactat) und einer respiratorischen ( $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) Azidose kommt es zu einer Abnahme des  $\text{pH}$ -Wertes um bis zu 0.50 Einheiten bei Arachniden [PAUL et al. 1994] und 0.80 Einheiten bei Crustaceen [ADAMCZEWSKA & MORRIS 1994]. Der Bohreffekt bewirkt eine Freisetzung des gebundenen Sauerstoffs aus den Hämocyaninmolekülen und vergrößert so den Sauerstoffgradienten zwischen der Hämolymphe und dem stoffwechselaktiven Gewebe.

Der  $p_{50}$  vom *A. astacus* Hämocyanin wird im Vergleich zu dem Hämocyanin aus *P. potamios* und *E. californicum* von der Temperatur am wenigsten beeinflusst. Der T-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50}/\Delta T$ ) ist bei  $\text{pH}$  7.00 und zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $20^\circ\text{C}$  am ausgeprägtesten. Bei  $\text{pH}$  8.00 und 8.50 ist der  $p_{50}$  vom *A. astacus* Hämocyanin nahezu temperaturunempfindlich (Abb. 4.2-4). Die amphibisch lebende Krabbe *P. potamios* besitzt ein Hämocyanin, welches eine deutliche Temperaturempfindlichkeit aufweist. Bei diesem Tier ist zwischen  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  der T-Koeffizient bei  $\text{pH}$  8.00 und 8.50 am größten. Bei  $\text{pH}$  7.00 und 7.50 nimmt der Einfluss der Temperatur auf die  $\text{O}_2$ -Bindungsaffinität des *P. potamios* Hämocyanins leicht ab (Abb. 4.2-4). Das 4x6-mere Hämocyanin aus der Vogelspinne *E. californicum* besitzt einen deutlichen, aber  $\text{pH}$ -unabhängigen T-Koeffizienten.

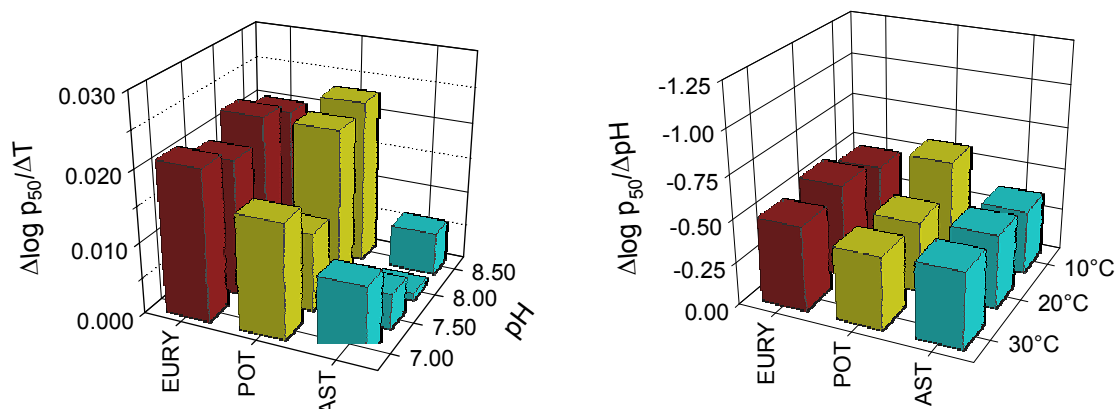
Die Hämocyanine aller drei Tiere zeigen im gesamten untersuchten  $\text{pH}$ -Bereich (7.00-8.50) einen von der Temperatur unabhängigen und in etwa gleich großen Bohrkoeffizienten (*A. astacus* =  $-0.41 \pm 0.03$ ; *P. potamios* =  $-0.47 \pm 0.07$ ; *E. californicum* =  $-0.50 \pm 0.03$ ). Erfolgt eine Unterteilung des gesamten  $\text{pH}$ -Bereichs in 0.50  $\text{pH}$ -Schritten, so wird bei *P. potamios* und *E. californicum* eine Temperaturabhängigkeit des Bohrkoeffizienten erkennbar. Bei einer stufenweisen Berechnung des Bohrkoeffizienten besitzt das Hämocyanin von *P. potamios* die größten Werte bei  $20^\circ\text{C}$ . Dies bedeutet, der Einfluss der Protonenkonzentration auf die  $\text{O}_2$ -Bindungsaffinität des Hämocyanins ist bei  $20^\circ\text{C}$  am stärksten. Der temperaturempfindlichste  $\text{pH}$ -Bereich bei *P. potamios* ist zwischen 7.00 und 7.50 (Abb. 4.2-3, Mitte). Das Hämocyanin von *E. californicum* zeigt bei konstanter Temperatur für jeden  $\text{pH}$ -Schritt einen nahezu konstanten Bohrkoeffizienten.

Der Einfluss der Protonenkonzentration auf die O<sub>2</sub>-Affinität des Spinnen-Hämocyanins nimmt mit steigender Temperatur zu, d.h. der Bohrkoeffizient wird größer (Abb. 4.2-3, rechts). Das *A. astacus* Hämocyanin weist keine signifikante Abhängigkeit des Bohrkoeffizienten gegenüber der Temperatur und dem pH auf (Abb. 4.2-3, links).



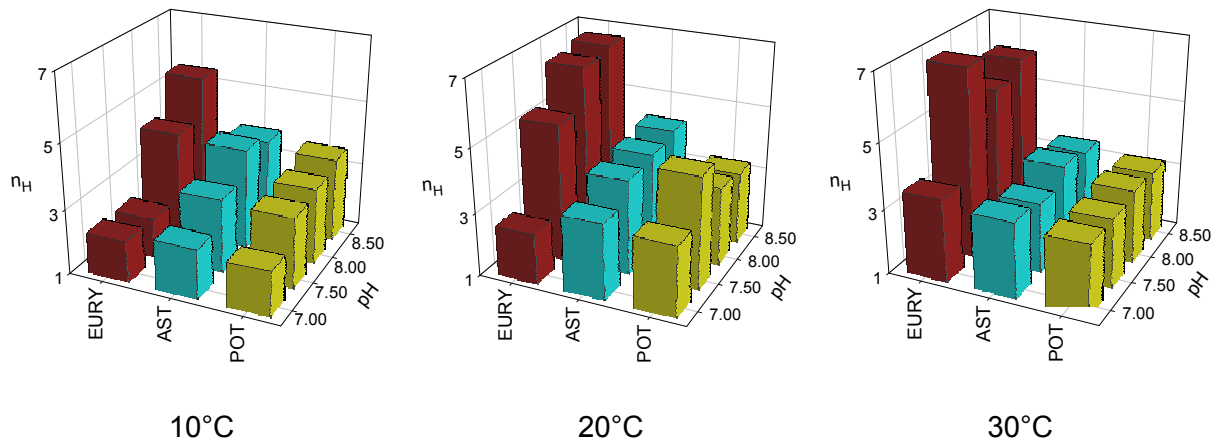
**Abb. 4.2-3:** Nach pH-Stufen aufgelöster Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von Hämocyanin aus drei verschiedenen Tieren, in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Die Abb. 4.2-4 (links) zeigt den reinen Temperatureffekt (T-Koeffizient) in Abhängigkeit vom pH auf den  $p_{50}$  der drei untersuchten Hämocyanine. Dieser ist im Vergleich zum Bohr-Koeffizienten im Betrag bis zu dreißigfach geringer, ist aber bei Berücksichtigung des absoluten Wertebereiches nur noch um einen Faktor 2 bis 2.5 kleiner. Die rechte Grafik gibt den Bohr-Koeffizient für den gesamten hier untersuchten pH-Bereich wieder. Eine erhöhte Temperaturempfindlichkeit bringt für das *A. astacus* Hämocyanin keinen Vorteil, da das Tier überwiegend aquatisch lebt und es im Wasser selten zu starken Temperaturschwankungen kommt. Im Gegensatz dazu stehen *P. potamios* und *E. californicum*, die beide aufgrund ihrer amphibischen bzw. terrestrischen Lebensweise einen breiten Temperaturbereich ausgesetzt sind. Der Vorteil eines größeren Temperatureffektes auf das Hämocyaninmolekül dieser beiden Tiere, liegt in der vermehrten Freisetzung von gebundenen Sauerstoff in die Hämolymphe bei einem Temperaturanstieg. Durch die gleichzeitige Abnahme des pH-Wertes und den dadurch eintretenden Bohreffekt, kommt es zu einer Addition von T- und Bohr-Effekt ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} + \Delta \log p_{50} / \Delta T$ ), die O<sub>2</sub>-Bindungsaffinität des Hämocyanins sinkt.



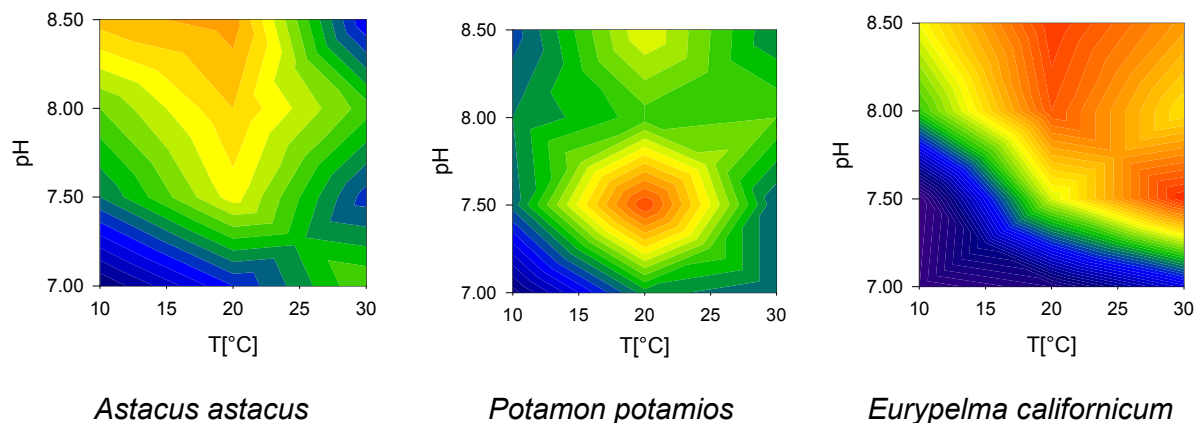
**Abb. 4.2-4:** T- und Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta T$ ;  $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von Hämocyanin aus drei verschiedenen Tieren. Das  $\Delta T$  beträgt 20°C (von 10°C bis 30°C) und das  $\Delta \text{pH}$  beträgt 1.50 pH-Einheiten (pH 7.00 bis 8.50).

Die Kooperativität der O<sub>2</sub>-Bindung bei 10°C, 20°C und 30°C, ausgedrückt durch den Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ), zeigt nur bei dem Spinnen-Hämocyanin eine signifikante pH-Abhängigkeit. Der Sauerstoff wird bei einer höheren Protonenkonzentration weniger stark kooperativ gebunden und bei einer gleichzeitigen Temperaturerniedrigung verringert sich die Kooperativität des *E. californicum* Hämocyanins zusätzlich (Abb. 4.2-5, links). Die beiden Crustaceen-Hämocyanine zeigen nur eine leichte Beeinflussung der Kooperativität durch pH und Temperatur. Die Kooperativität des *A. astacus* Hämocyanins zeigt bei 10°C und 20°C eine gewisse pH-Empfindlichkeit: der Hill-Koeffizient wird mit niedrigeren pH-Werten kleiner. Bei 30°C hat die kooperative O<sub>2</sub>-Bindung ihre pH-Empfindlichkeit verloren (Abb. 4.2-5, rechts).



**Abb. 4.2-5:** Die Kooperativität ( $n_H$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyanin aus *E. californicum*, *A. astacus* und *P. potamios*, in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Das Hämocyanin von *P. potamios* zeigt nur bei 10°C eine gering pH-empfindliche Kooperativität. Sie nimmt mit steigendem pH leicht zu (Abb. 4.2-5, links). Bei 20°C und 30°C bindet das *P. potamios* Hämocyanin den Sauerstoff unabhängig vom eingestellten pH mit einer konstanten Kooperativität (Abb. 4.2-5, rechts). Es zeigt sich, dass das 4x6-mer gegenüber den beiden 2x6-meren empfindlicher auf pH- und Temperaturänderungen reagiert.



**Abb. 4.2-6:** Die Kooperativität ( $n_H$ ) der  $O_2$ -Bindung an das Hämocyanin aus *A. astacus*, *P. potamios* und *E. californicum* in Abhängigkeit von pH und Temperatur als Höhenliniendarstellung. Die Bereiche mit der höchsten Kooperativität sind rot.

Die drei Hämocyaninspezies besitzen hinsichtlich der Kooperativität ihr Optimum bei verschiedenen Temperatur- und pH-Werten.

Das Hämocyanin des Flusskrebse *A. astacus* hat seine maximalen  $n_H$ -Werte bei 20°C ab pH 7.50 (Abb. 4.2-6, links). Hier spiegelt sich das Biotop in der Funktion des Hämocyanins wieder, Temperaturen oberhalb von 20°C sind für *A. astacus* in seinem Frischwasserbiotop sehr selten. Für eine Adaption der Funktion des Hämocyanins an eine Temperatur oberhalb von 20°C besteht daher keine Notwendigkeit. Die hohe Kooperativität bei 20°C über einen großen pH-Bereich (pH 7.50-8.50), garantiert den gerade bei „warmen“ Temperaturen aktiven Tieren eine gute Sauerstoffversorgung.

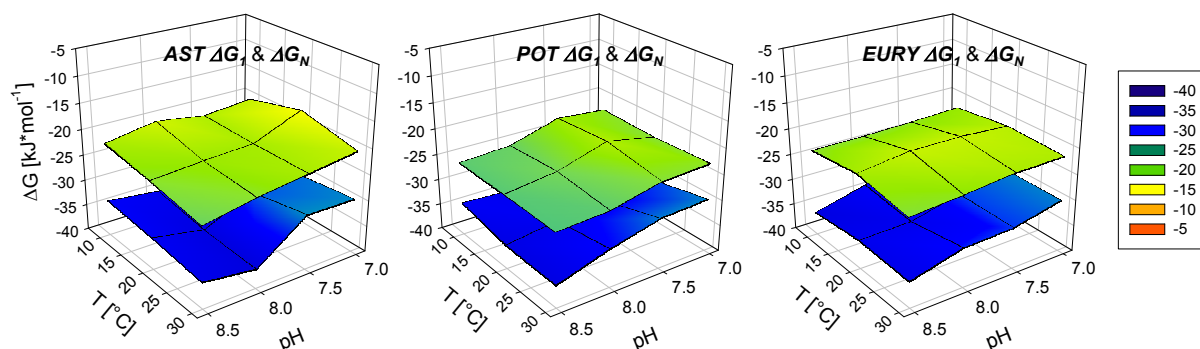
Das *P. potamios* Hämocyanin hat sein Kooperativitätsoptimum zwischen 15°C und 25°C, und in einem pH-Bereich von 7.25 bis 7.75 (Abb. 4.2-6, Mitte). Der genannte Temperatur- und pH-Bereich entspricht dem, den die nachtaktiven Tiere bzw. das Hämocyanin in ihrem Biotop bzw. in der Hämolymphe in der Nacht vorfinden. Die erhöhte Stoffwechselaktivität während den Aktivitätsphasen, führt zu einer Abnahme des pHs in der Hämolymphe auf einen Wert unter 7.50. Auch hier finden die Umweltbedingungen des Biotops eine Entsprechung bei der Funktion (Kooperativität) des Hämocyanins.

Bei dem *E. californicum* Hämocyanin ist der Bereich hoher Kooperativität sehr groß. Dieser reicht von 10°C und pH 8.50 bis 30°C und pH 7.25 (Abb. 4.2-6, rechts). Dieser Bereich stimmt gut mit den Temperatur- und pH-Bedingungen überein, mit denen das Hämocyanin im Biotop der Vogelspinne konfrontiert wird. Temperaturen von unter 10°C in der Nacht und von über 30°C im Schatten am Tage sind in dem ariden Biotop keine Seltenheit. Dies bedeutet für das Hämocyanin, bei diesen Temperaturen und den damit verbundenden pH-Werten, eine schnelle Sauerstoffaufnahme und -abgabe zu gewährleisten. Die Funktion (Kooperativität) hat sich an die Umweltbedingungen im Biotop adaptiert.

➤ **Thermodynamische Analysen für pH=const**

- Der Hill-Plot  
Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

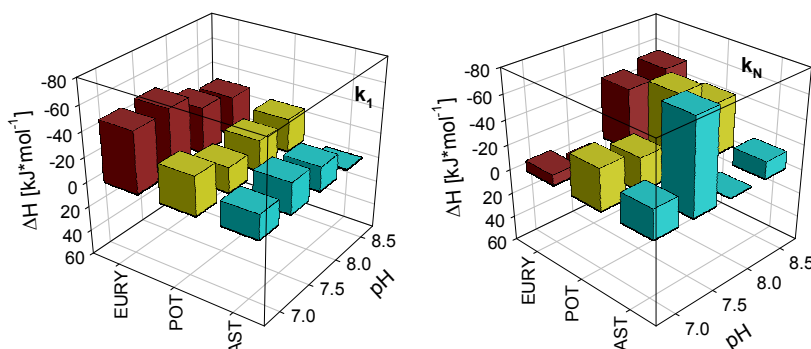
Bei den  $\Delta G$ -Werten besteht zwischen den beiden Versuchsansätzen pH=pH(T) und pH=const. kein signifikanter Unterschied. Die bei pH=const. aus dem Hill-Plot bestimmten  $\Delta G$ -Werte für die T- bzw. R-Konformation der drei Hämocyaninspezies haben ebenfalls die Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen ( $15\text{-}35 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Auch die mit ca.  $10\text{ kJ}$  geringe Energiedifferenz zwischen den beiden Konformationen findet sich bei pH=const. sowie bei pH=pH(T). Es gilt auch hier, dass die niedrigen  $\Delta G$ -Werte durch den exponentiellen Zusammenhang  $(k_1 \text{ bzw. } N/k) = e^{\Delta G/-RT}$  einen sehr großen Einfluss auf die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  besitzen.



**Abb. 4.2-7: Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $\text{O}_2$ -Bindung an die niedrigaffine T- ( $\Delta G_1$ ) und hochaffine R-Form ( $\Delta G_N$ ) dreier Hämocyanine aus drei verschiedenen Spezies. Die Werte für  $\Delta G_1$  bilden die obere, die Werte für  $\Delta G_N$  bilden die untere Fläche.**

Die Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) für pH=const., sind für das *E. californicum* und *A. astacus* Hämocyanin nicht bei allen pH-Werten temperaturunabhängig. Bei diesen beiden Tieren bleiben die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  bei pH 8.50 ( $k_1$ , AST), 8.00 ( $k_N$ , AST) und 7.50 ( $k_N$ , EURY) mit zunehmender Temperatur konstant, die Steigung des van't Hoff Plots geht gegen Null und damit auch das  $\Delta H$ .

Aus dem linearen Verlauf des van't Hoff Plots ( $\ln k = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$ ) lassen sich für die einzelnen Hämocyanine die folgenden  $\Delta H$ -Werte bestimmen:



**Abb. 4.2-8: Bindungsenthalpien für  $\text{O}_2$  an die T- und R-Konformation drei verschiedener Hämocyanine.** Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , der pH des TRIS-HCl Puffers war konstant. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

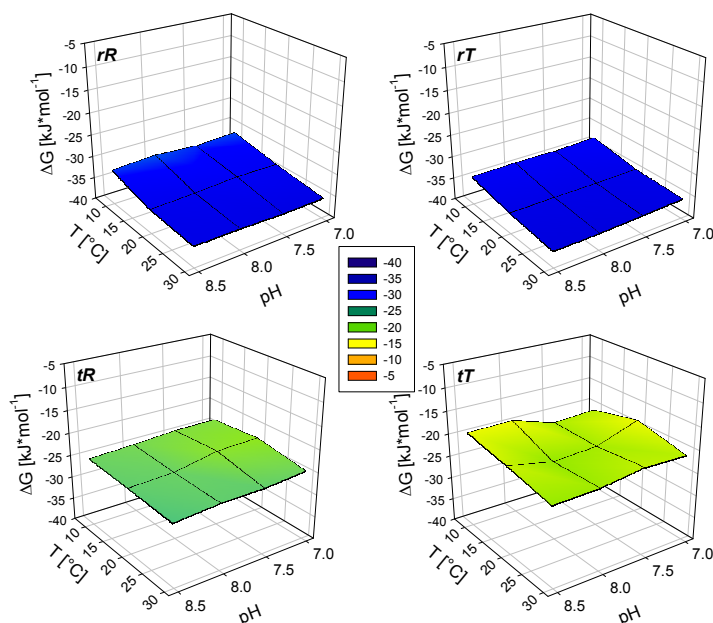
Bei allen drei Tieren ist die pH-Empfindlichkeit von  $\Delta H$  bei der Bindung des letzten O<sub>2</sub>-Moleküls ( $k_N$ ) an das Hämocyanin deutlich ausgeprägter, als es bei der Bindung des ersten O<sub>2</sub>-Moleküls ( $k_1$ ) der Fall ist (Abb. 4.2-8, rechts).

- Das Nesting-Modell für pH=const  
Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

Für die Hämocyanine der drei untersuchten Spezies gelten folgende Feststellungen:  
Die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der Sauerstoffbindung für die vier im Nesting-Modell postulierten (Unter-)Konformationen rR, tR, rT und tT hat die gleiche Größenordnung, wie die zuvor aus dem Hill-Plot für die R- und T-Konformation berechneten  $\Delta G$ -Werte. Das  $\delta\Delta G$  für die jeweils zwei möglichen Unterkonformationen innerhalb der R- oder T-Konformation des Gesamtmoleküls beträgt  $\sim 10\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Dies entspricht der im Hill-Plot bestimmten  $\Delta G$ -Differenz zwischen der R- und T-Konformation (MWC-Modell) für das Gesamtmolekül (vergl. Abb. 4.2-7). Auf der Ebene der Unterkonformationen sind die  $\Delta G$ -Werte zwischen rR und rT bzw. tR und tT gleich groß.

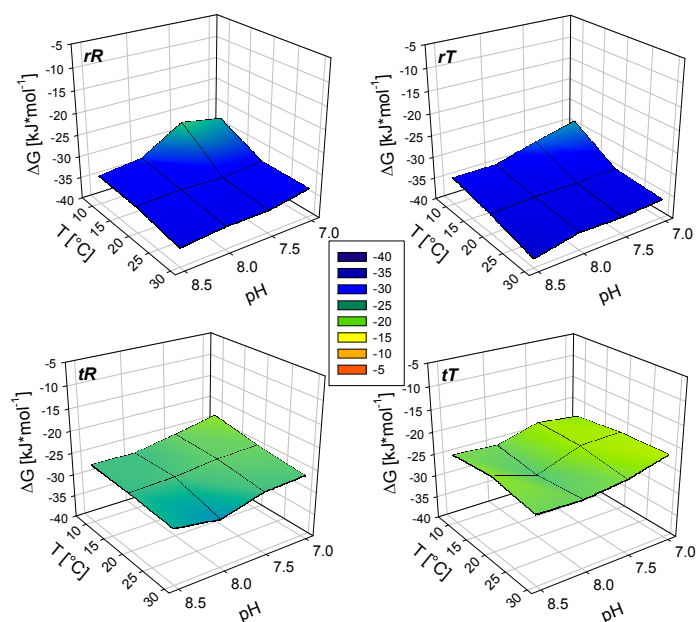
Das  $\Delta G$  der O<sub>2</sub>-Bindung an die hochaffine rR- und rT-Konformation zeigt sich bei dem *A. astacus* und dem *E. californicum* Hämocyanin als pH und Temperatur unempfindlich. Die blauen  $\Delta G$ -Flächen weisen keine andersfarbigen Maxima und Minima auf (Abb. 4.2-9 & 4.2-11, oben). Bei dem *P. potamios* Hämocyanin zeigt das  $\Delta G$  für die rR- und rT-Konformation im neutralen pH-Bereich eine Temperaturempfindlichkeit, das  $\Delta G$  hat hier bei 10°C ein Minimum. In der 3-D-Grafik hat die blaue  $\Delta G$ -Fläche dort ein grünliches Maximum (Abb. 4.2-10, oben). Bei den niedrigaffinen Konformationen tR und tT besteht bei allen drei Hämocyaninspezies für das  $\Delta G$  eine gewisse pH- und Temperaturempfindlichkeit. Die grünlichen  $\Delta G$ -Flächen besitzen für diese Unterkonformationen Maxima und Minima (Abb. 4.2-9, 4.2-10 & 4.2-11, unten).

Das  $\Delta G$ -Flächenrelief der tR- und vor allem der tT-Konformation finden sich bei den  $\Delta G$ -Flächen für die T-Konformation des Gesamthämocyanins aus dem Hill-Plot wieder (vergl. Abb. 4.2-7). Am deutlichsten ist dies beim *A. astacus* und *P. potamios* Hämocyanin zu erkennen.

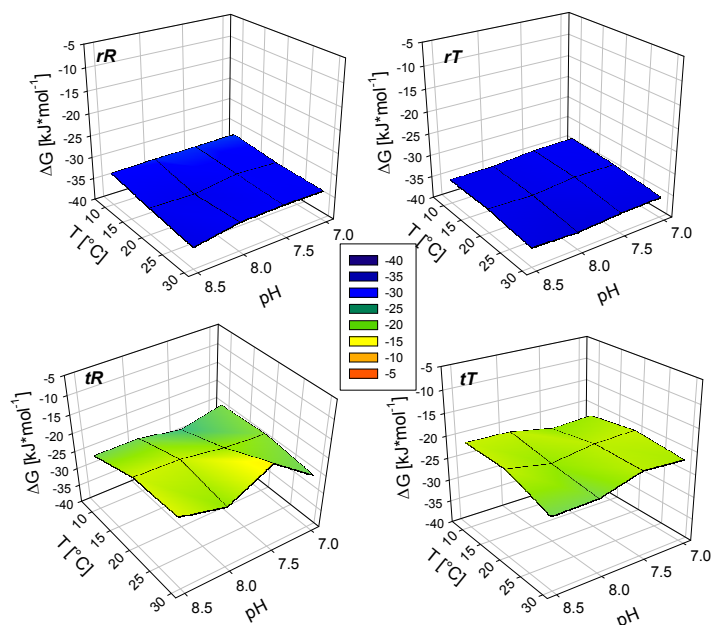


**Abb. 4.2-9:** Freie Gibbsche Energie  $\Delta G$  der O<sub>2</sub>-Bindung an das *A. astacus* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.





**Abb. 4.2-10:** Freie Gibbsche Energie  $\Delta G$  der O<sub>2</sub>-Bindung an das *P. potamios* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen *rR*, *tR*, *rT* und *tT*. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

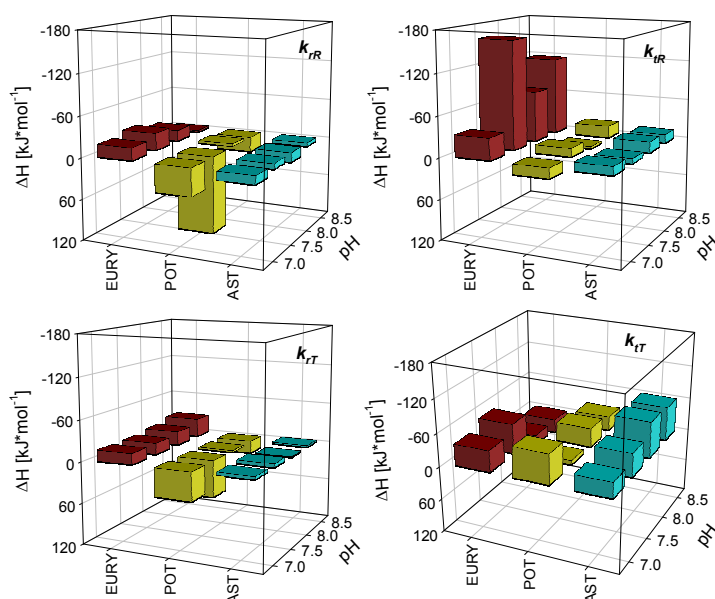


**Abb. 4.2-11:** Freie Gibbsche Energie  $\Delta G$  der O<sub>2</sub>-Bindung an das *E. californicum* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen *rR*, *tR*, *rT* und *tT*. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

Die Betrachtung der Oxygenierungsenthalpien für die vier Konformationen des Nesting-Modells, zeigt für das *A. astacus* Hämocyanin bei der tT-Konformation eine signifikante pH-Abhängigkeit. Mit der Abnahme der  $H^+$ -Konzentration kommt es zu einer verstärkt exothermen Sauerstoffbindung an die tT-Konformation. Die drei restlichen Unterkonformationen des *A. astacus* Hämocyanins binden den Sauerstoff pH-unabhängig und mit einer sehr schwachen exothermen bis schwach endothermen Bindungsreaktion (Abb. 4.2-12).

Im untersuchten pH-Bereich bindet das *P. potamios* Hämocyanin den Sauerstoff nur in der tT-Konformation exotherm. Bei den übrigen Konformationen erfolgt die  $O_2$ -Bindung überwiegend endotherm. Die größte endotherme Oxygenierungsenthalpie besitzen die sehr affinen rR- und rT-Konformationen bei pH 7.0 und 7.5 (Abb. 4.2-12, links).

Die tR-Konformation des *E. californicum* Hämocyanins besitzt im Alkalischen die höchsten Oxygenierungsenthalpien. Die berechneten k-Werte für die tR-Konformation sind sehr klein und lassen sich im Alkalischen aufgrund ihres geringen Anteils nur schwer bestimmen. Bei höheren pH-Werten ist der relative Anteil dieser niedrig-affinen tR-Konformation am Gesamtpool der vier Konformationen sehr gering [STERNER, 1990], so dass diese trotz der hohen Enthalpiewerte keinen großen Einfluss auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Vogelspinnen Hämocyanins hat. Bei der tT-Konformation kommt es, beim Übergang vom Neutralen hin zum Alkalischen, bei den Enthalpiewerten zu einem Vorzeichenwechsel (Abb. 4.2-12, unten rechts). Die  $O_2$ -Bindung an die affine rR- und rT-Konformation erfolgt im untersuchten pH-Bereich exotherm. Dabei ist für die rT-Konformation eine pH-Abhängigkeit festzustellen: Die  $\Delta H$ -Werte werden größer mit abnehmender  $H^+$ -Konzentration.



**Abb. 4.2-12:** Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) von  $O_2$  an Hämocyanin aus drei verschiedenen Tierarten für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $10^\circ C$  bis  $30^\circ C$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

#### 4.2.2 Gruppe (2): *Paralithodes camtschatica*, *Homarus americanus*, *Calappa granulata* und *Panulirus interruptus*

##### i) Die Hämocyaninfunktion bei $\text{pH}=\text{pH}(\text{T})$

Das 12-meres Hämocyanin der Steinkrabbe *P. camtschatica* und des Hummers *H. americanus* zeigen hinsichtlich des  $p_{50}$  ähnliche Eigenschaften. Beide Hämocyanine besitzen bei 5°C einen, im Vergleich zu den anderen untersuchten Arthropoden-Hämocyaninen, deutlich höheren  $p_{50}$ . Beide Tiere leben in kalten und O<sub>2</sub>-reichen Gewässern, so dass die Konzentration an physikalisch gelöstem Sauerstoff in der Hämolymphe hoch ist. Ein Hämocyanin mit einem hohen  $p_{50}$  ist daher auch in Gegenwart von relativ hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Lage zusätzlichen Sauerstoff im Bedarfsfall (Flucht, Angriff, Jagd) abzugeben, ein zu affines Hämocyanin mit einem kleinen  $p_{50}$ -Wert wäre dazu nicht fähig. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Hämocyanin bei Tieren in O<sub>2</sub>-reichen Gewässern eine untergeordnete Rolle beim Sauerstofftransport spielt. Wie schon in früheren Arbeiten [LALLIER, F. & TRUCHOT, J.P. 1989] beschrieben, wird unter norm-oxischen Bedingungen der O<sub>2</sub>-Bedarf zu 80% von dem in der Hämolymphe physikalisch gelöstem Sauerstoff gedeckt. Erst bei hypo-oxischen Bedingungen wird die O<sub>2</sub>-Lieferung zu über 90% von dem Hämocyanin übernommen. Die unterschiedlichen Aktivitätsmuster von *P. camtschatica* und *H. americanus* spiegeln sich in der Kooperativität und dem Brutto-Bohreffekt ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} + \Delta \log p_{50} / \Delta T$ ) des jeweiligen Hämocyanins wieder. Mit einem Brutto-Bohreffekt von -0.94 und einer Kooperativität von 4.05 bei 5°C ist das Hummer-Hämocyanin in der Lage den gebundenen Sauerstoff während den starken Aktivitätsphasen des Hummers schnell abzugeben. Das Hämocyanin der trägen und langsamen Steinkrabbe mit einem Brutto-Bohreffekt von -0.65 und einer Kooperativität von 2.50 bei 5°C ist für Aktivitätsspitzen mit einem stark erhöhten Sauerstoffbedarf nicht optimiert.

Von den hier untersuchten Tieren besitzt die im Mittelmeer lebende Schamkrabbe *Calappa granulata* das Temperatur/pH empfindlichste Hämocyanin. Die O<sub>2</sub>-Affinität ist bei 5°C und basischen pH mit einem  $p_{50}$  von 6.50 Torr am höchsten, wird die Temperatur auf 30°C (pH 7.20) erhöht kommt es zu einer dramatischen Abnahme der O<sub>2</sub>-Bindungsaffinität, der  $p_{50}$  steigt auf über 100 Torr. Da *C. granulata* in Tiefen von 30 bis 150m lebt, sind große Temperaturdifferenzen für dieses Tier unbekannt. Im europäischen Mittelmeer sind in größten Tiefen nie weniger als 12°C gemessen worden [TARDENT, P. 1979], so dass für den Lebensraum von *C. granulata* ein Temperaturbereich von 15°C bis 20°C angenommen werden kann. Das Hämocyanin der Schamkrabbe besitzt für diesen Temperaturbereich einen  $p_{50}$  zwischen 20 und 30 Torr, dies entspricht einer O<sub>2</sub>-Konzentration von ca. 26 bis 36  $\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$ . Im Oberflächenwasser des Meeres sind im Mittel (abhängig von der Salinität) bei einem Luftdruck von 1013 mbar 280  $\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$  O<sub>2</sub> gelöst. In der oberflächennahen Schicht hält sich die Produktion und der Verbrauch von O<sub>2</sub> durch die Organismen die Waage, die Sauerstoffkonzentration bleibt konstant. Mit zunehmender Tiefe überwiegen in tropischen und subtropischen Meeren die O<sub>2</sub> konsumierenden Prozesse, die Sauerstoffkonzentration nimmt ab. In einer Tiefe von 150 m verringert sich der O<sub>2</sub>-Gehalt auf ca. 240  $\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$ , dies bedeutet ein Hämocyanin mit einem  $p_{50}$  von umgerechnet 36  $\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$  ist aber immer noch zu 100% mit Sauerstoff beladen. Die Sauerstoffkonzentration im Litoral und Sublitoral warmer und kalter Meere kann daher kein limitierender Faktor für die Verbreitung der dort lebenden Crustaceen sein. Interessant bei dem Hämocyanin der Schamkrabbe ist der ungewöhnlich stark ausgeprägte Brutto-Bohreffekt von -1.62; dies ist der höchste Wert unter den in dieser Arbeit untersuchten Hämocyaninen. Auch bei der Kooperativität zeigt das *C. granulata* Hämocyanin eine Anpassung an das wärmere Biotop. Die höchsten Kooperativitätswerte werden im oberen Temperaturbereich erreicht. Höhere Temperaturen steigern die Stoffwechselrate, wodurch eine metabolische Azidose der Hämolymphe eintritt. Der ausgeprägte Brutto-Bohreffekt des Hämocyanins ermöglicht daher eine schnelle Freisetzung des gebundenen Sauerstoffs. Die höhere Kooperativität wiederum gewährleistet eine schnelle Reoxygenierung des Hämocyanins an den Kiemen.

Die Temperatur- bzw. pH-Empfindlichkeit des  $p_{50}$ -Wertes des 6-mer Hämocyanins aus *P. interruptus* ist im Vergleich zu den zuvor betrachteten Crustaceenarten deutlich geringer. Der Brutto-Bohreffekt und der Hill-Koeffizient sind fast identisch mit dem 12-mer Hämocyanin der Steinkrabbe *P. camtschatica*. Der geringe  $p_{50}$ -Wert passt eher zu den Gruppe (1) Hämocyaninen. Eine Notwendigkeit für solch ein affines Hämocyanin besteht für *P. interruptus* eigentlich nicht, denn das kalte und  $O_2$ -reiche Wasser seines Biotopes gewährleistet immer eine sehr gute Sauerstoffversorgung.

Während der Winter-Migration von *P. interruptus* in wärmere Gewässer kommt es zu einem erhöhten Stoffwechsel und  $O_2$ -Bedarf, um diesen decken zu können muss die Herzfrequenz und damit die Hämolymphezirkulation an den Kiemen erhöht werden. Jetzt ist das sehr affine Hämocyanin von Vorteil, denn es ermöglicht auch bei einem schnellen Durchgang der Hämolymphe durch die Kiemen eine effektive Sauerstoffbindung. Die beladenen Hämocyaninmoleküle dienen in Zeiten maximaler Aktivität (z.B. Winter-Migration) und für den Fall, dass der physikalisch gelöste Sauerstoff den Bedarf nicht decken kann, als  $O_2$ -Reservoir.

Hinsichtlich ihrer Sauerstoffbeladung in Abhängigkeit von Temperatur und pH ( $pH=pH(T)$ ) zeigen zwei 12-mer Hämocyanine ähnliche Eigenschaften. Eine Ausnahme ist das *P. camtschatica* Hämocyanin mit einem deutlich niedrigeren  $T_{VS}$ -Wert.

Tier-Art	$T_{VS}$ (pH)	$T_{50}$ (pH)	$T_D$ (pH)	Hämocyanin
<i>C. granulata</i>	26°C (7.32)	35°C (7.05)	59°C (6.33)	12-mer
<i>H. americanus</i>	26°C (7.32)	38°C (6.96)	54°C (6.48)	12-mer
<i>P. camtschatica</i>	20°C (7.50)	35°C (7.05)	52°C (6.54)	12-mer
<i>P. interruptus</i>	35°C (7.05)	59°C (6.33)	65°C (6.15)	6-mer

**Tab. 4.2-6: Charakteristische Parameter zur Beurteilung des Einflusses der Temperatur und pH auf die  $O_2$ -Beladung verschiedener Hämocyanine.** Bestimmt aus der Abb. 3.8-1 u. 3.8-2 ; Es bedeuten:  $T_{VS}$  die Temperatur bis der noch Vollsättigung (rel.  $O_2$ -Beladung  $>0.90$ ) vorliegt;  $T_{50}$  die Temperatur ab der Halbsättigung erreicht ist;  $T_D$  die Temperatur ab der eine irreversible Denaturierung eintritt

Das Hämocyanin der Steinkrabbe ist hinsichtlich der  $O_2$ -Vollsättigung, deutlich temperatur-/pH-empfindlicher, als die restlichen Gruppe (2) Hämocyanine. Dieser niedrige  $T_{VS}$ -Wert scheint eine Kaltwasseradaptation dieser Krabbenart zu sein. Der Vorteil ist eine gewisse Regulierbarkeit der  $O_2$ -Beladung bei niedriger Temperatur und basischem pH, auch bei hohen Sauerstoffpartialdrücken.

Es ist interessant, dass das Hämocyanin aus *P. interruptus* diese Kaltwasseradaptation nicht aufweist, sondern im Gegenteil, dass es bis 35°C (pH 7.05) eine  $O_2$ -Vollsättigung besitzt und erst bei 59°C (pH 6.33) die Hälfte seiner  $O_2$ -Moleküle verliert. Auch die Denaturierung erfolgt im Vergleich zu den übrigen Gruppe (2) Hämocyaninen bei einer deutlich höheren Temperatur. In einer früheren Arbeit [HRISTOVA, R. et al. 1997] wird ein  $T_D$  von 67°C für ein Panulirus Hämocyanin in der apo-Form beschrieben.

Es muss unterschieden werden zwischen der überwiegend pH-abhängigen Sauerstoffbeladung und der temperatur-/pH-abhängigen Molekülstabilität, charakterisiert durch die Denaturierungstemperatur ( $T_D$ ). Die  $O_2$ -Beladung wird hauptsächlich durch den Bohrkoeffizienten beeinflusst, wogegen für die Stabilität der oligomeren Hämocyanine die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Untereinheiten entscheidend sind. Ein 12-mer Hämocyanin sollte daher aufgrund der größeren Anzahl von Untereinheiten und den damit verbundenen Wechselwirkungen deutlich stabiler sein als ein 6-mer Hämocyanin. Diese Annahme lässt sich für das *P. interruptus* Hämocyanin aber nicht bestätigen. Die Art der Wechselwirkungen spielt bei der Temperaturstabilität ebenfalls eine große Rolle.

So werden z.B. die hydrophoben Wechselwirkungen mit zunehmender Temperatur stärker und auch der pH wirkt sich je nach Aminosäuresequenz der Untereinheiten stabilisierend oder destabilisierend auf das Hämocyanin aus. So kann die hohe Temperaturstabilität des *P. interruptus* Hämocyanins durchaus auf hydrophobe Wechselwirkungen der  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten zurückzuführen sein. Immunologisch lassen sich für Crustaceen-Hämocyanine drei Untereinheitentypen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  unterscheiden [MARKL, J. et al. 1986]. Unterschiedliche Kombinationen dieser Untereinheiten ergeben Hämocyanine mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen und funktionellen Eigenschaften; unabhängig von der Aggregationshöhe.

Der synergistische Effekt von pH und Temperatur auf den Sauerstoffbeladungsgrad ist beim *C. granulata*, *H. americanus* und *P. camtschatica* Hämocyanin von allen hier untersuchten Hämocyaninen am stärksten ausgeprägt. Das *P. interruptus* Hämocyanin zeigt dagegen nur eine reine Temperaturempfindlichkeit; die gleichzeitige pH-Abnahme hat einen geringen bis gar keinen Effekt auf die O<sub>2</sub>-Beladung (s. Tab. 3.8-1, S.39). Am temperaturempfindlichsten erweist sich das *P. camtschatica* Hämocyanin, diese Eigenschaft passt wiederum gut zu der schon zuvor vermuteten Kaltwasseradaptation.

➤ Thermodynamische Analysen für pH(T)

- Der Hill-Plot

Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

An Hand der Bindungskonstanten  $k_1$  für das erste und  $k_N$  für das letzte O<sub>2</sub>-Molekül lässt sich mit  $\Delta G_{1\text{ bzw. }N} = -RT \ln(k_{1\text{ bzw. }N} / \kappa)$  die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an die T- bzw. R-Form des Hämocyaninmoleküls berechnen. Das  $\Delta G_{1\text{ bzw. }N}$  ist bei allen vier Tieren temperatur- und pH-unabhängig (Tab. 4.2-7 und Abb. 4.2-13). Das 6-mer Hämocyanin von *P. interruptus* besitzt signifikant höhere  $\Delta G$ -Werte für die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls. Der Aggregationsgrad der Hämocyanine scheint hier eine Rolle zu spielen.

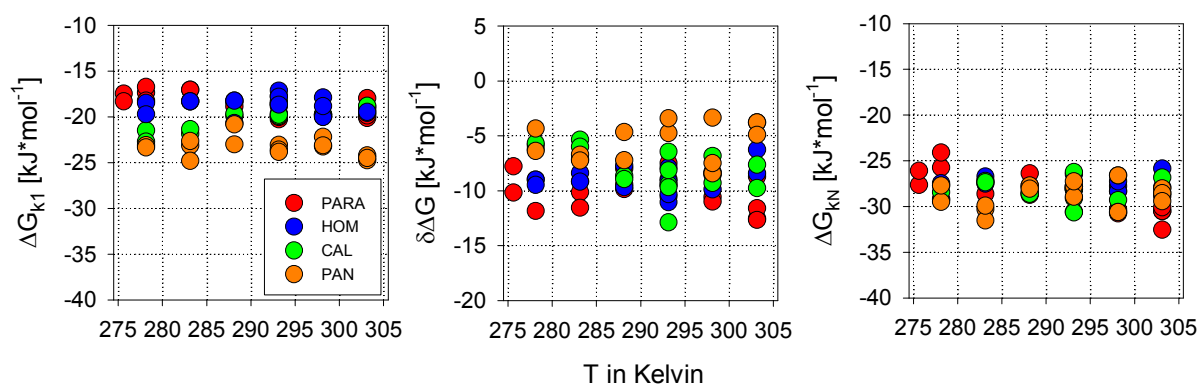
Tier	$\Delta G_1$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_N$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]
<i>P. camtschatica</i>	-18.64±1.12	-28.50±1.99
<i>H. americanus</i>	-18.78±0.92	-27.70±0.82
<i>C. granulata</i>	-20.02±1.34	-28.09±1.15
<i>P. interruptus</i>	-23.34±1.01	-29.28±2.06

**Tab. 4.2-7: Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an die niedrigaffine T- und hochaffine R-Form vier Hämocyanine aus verschiedenen Tierarten. Der O<sub>2</sub>-Löslichkeitskoeffizient ( $\kappa$ ) wurde berücksichtigt. Untersucht wurde im Temperaturbereich von 5°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift von 0.03 pH-Einheiten pro °C wurde nicht korrigiert.**

Die Differenz der freien Gibbschen Energie ( $\delta\Delta G$ ), mit  $\delta\Delta G = -RT \ln(k_N/k_1)$ , liefert wie schon zuvor die Information über die freie Energie, die dem Konformationsübergang von T nach R innewohnt. Diese bleibt für die Hämocyanine der Gruppe (2) im gewählten Temperaturbereich konstant. (Tab. 4.2-8 und Abb. 4.2-13). Die Energiedifferenz  $\delta\Delta G$  zwischen der affinen R-Konformation und der weniger affinen T-Konformation ist für das 6-mer Hämocyanin aus *P. interruptus* deutlich geringer, als für die 12-mer Hämocyanine.

Tier	$\delta\Delta G_1$ [kJ*mol <sup>-1</sup> ]
<i>P. camtschatica</i>	-9.79±1.76
<i>H. americanus</i>	-8.92±1.14
<i>C. granulata</i>	-8.07±2.04
<i>P. interruptus</i>	-5.94±2.20

**Tab. 4.2-8:** Differenz der freien Gibbschen Energie ( $\delta\Delta G$ ) beim Konformationsübergang von der niedrigaffinen T-Form in die hochaffine R-Form bei vier Hämocyaninen aus verschiedenen Tierarten.



**Abb. 4.2-13:** Thermodynamische Parameter ( $\Delta G_1$ ,  $\delta\Delta G$ ,  $\Delta G_N$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an Hämocyanine aus vier verschiedenen Tieren. Die Parameter wurden mit Hilfe des Hill-Plots ermittelt. Der pH shiftet mit der Temperatur und wurde nicht korrigiert.

Die Beträge der freien Energie der Bindung von Sauerstoff an die vier Hämocyanine in der T- oder R-Konformation sind auch hier gering. Sie liegen in der Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen (10-30 kJ\*mol<sup>-1</sup>). Die Energiedifferenz zwischen der T- und der R-Konformation fällt noch niedriger aus, so dass diese im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien (<10 kJ\*mol<sup>-1</sup>) liegt. Diese niedrigen  $\Delta G$ -Werte besitzen dennoch einen sehr großen Einfluss auf die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$ . Dieses wird deutlich wenn die Formel  $\Delta G_{1 \text{ bzw. } N} = -RT \ln(k_{1 \text{ bzw. } N} / \kappa)$  nach  $(k_{1 \text{ bzw. } N} / \kappa) = e^{\Delta G / -RT}$  umgestellt wird. Durch den exponentiellen Zusammenhang zwischen der Bindungskonstanten und dem  $\Delta G$ , bewirkt eine kleine Änderung in der freien Energie eine große Änderung bei der Bindungskonstante.

Aus dem linearen Verlauf des van't Hoff Plots ( $\ln k = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$ ) lassen sich für die einzelnen Hämocyane folgende  $\Delta H$ -Werte bestimmen:

Tier	$\Delta H_{k_1}$ (5°C-30°C) [kJ* $\text{mol}^{-1}$ ]	$\Delta H_{k_N}$ (5°C-30°C) [kJ* $\text{mol}^{-1}$ ]
<i>P. camtschatica</i>	-3.95	+5.25
<i>H. americanus</i>	-25.75	-45.40
<i>C. granulata</i>	-67.60	-36.35
<i>P. interruptus</i>	-22.90	-46.30

**Tab. 4.2-9: Bindungsenthalpien für Sauerstoff an die T- und R-Konformation vier verschiedener Hämocyane.** Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 5°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert.

Die Bindungsenthalpien ( $\Delta H_{1 \text{ bzw. } N}$ ) für  $k_1$  bzw.  $k_N$  sind bei drei Hämocyaninen unabhängig von der Temperatur, d.h. die Auftragung von  $\ln(k_{1 \text{ bzw. } N})$  vs.  $1/T$  im van't Hoff Plott ergibt eine Gerade mit einer positiven Steigung. Eine Ausnahme bildet das *P. camtschatica* Hämocyanin mit seinen temperaturunabhängigen Bindungskonstanten. Die im van't Hoff Plott bestimmten Bindungsenthalpien  $\Delta H_1$  und  $\Delta H_N$  liegen nahe bei Null. Die Bindung des Sauerstoffs an das Hämocyanin der Steinkrabbe benötigt daher weder Energie (endotherme Bindung), noch wird Energie freigesetzt (exotherme Bindung). Diese besondere thermodynamische Eigenschaft kann als eine Funktionsanpassung des *P. camtschatica* Hämocyanins an das subpolare Biotop interpretiert werden. Der Vorteil von kleinen  $\Delta H$ -Werten besteht für dieses Hämocyanin darin, dass es für die Bindung von  $\text{O}_2$  in den Kiemen und bei der Abgabe im Gewebe kaum Energie (Wärme) benötigt. Diese Art von thermodynamischer Anpassung wurde zuvor schon bei Hämoglobinen aus Tieren im arktischen und antarktischen Lebensraum beschrieben [PRISCO et al. 1991].

Eine Auffälligkeit findet sich bei dem Hämocyanin aus der in warmen Gewässern lebenden Krabbe *C. granulata*: die Sauerstoffbindung des ersten  $\text{O}_2$ -Moleküls ist hier fast doppelt so exotherm wie die Bindung des letzten  $\text{O}_2$ -Moleküls. Bei allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Hämocyaninen verhält es sich genau umgekehrt. Was ist der Vorteil einer thermodynamisch begünstigten Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls an die niedrig affine T-Konformation? Höhere Wassertemperaturen bewirken eine Zunahme der  $\text{H}^+$ -Konzentration (pH-Abnahme) in der Hämolymphe. Die Protonen wiederum stabilisieren als Effektoren die T-Konformation des Hämocyanins, welches zu einer Verschiebung des allosterischen Gleichgewichtes zu Gunsten der T-Konformation führt. Deutlich wird dies bei *C. granulata* durch einen hohen  $p_{50}$ -Wert zwischen 20°C und 30°C (s. Abb. 3.9-26). Gleichzeitig ist in wärmeren Gewässern der Sauerstoffgradient an den Kiemen durch die reduzierte Konzentration an gelösten Sauerstoff kleiner und das Hämocyanin kann im Falle einer erhöhten Aktivität der Krabbe nicht mehr vollständig beladen werden. Wenn keine Sättigung vorliegt befinden sich nicht alle Hämocyaninmoleküle in der R-Konformation und die  $\text{O}_2$ -Versorgung muss auch mit den weniger affinen T-Konformationen gewährleistet sein. Eine exotherme Bindung des Sauerstoff an die T-Konformation ist daher von Vorteil.

Die geringen Unterschiede in den Bindungsenthalpien zwischen dem *H. americanus* und *P. interruptus* Hämocyanin zeigen, dass ähnliche Biotopbedingungen ähnliche thermodynamische Bindungseigenschaften bewirken. Die Aggregationshöhe hat auf die Enthalpie keinen Einfluss.

Im Allgemeinen sind die Unterschiede in den Bindungsenthalpien zwischen der T- und R-Konformation auf die unterschiedlichen Wärmekapazitäten ( $\Delta C_p$ ) der Hämocyaninmoleküle zurückzuführen (s. auch S. 99).

- Das Nesting-Modell für  $\text{pH}=\text{pH}(\text{T})$

Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

Die Analyse der Bindungskonstanten ( $k_{rR}$ ,  $k_{tR}$ ,  $k_{rT}$  und  $k_{tT}$ ) aus dem Nesting-Modell, zeigt hinsichtlich der Oxygenierungsenthalpie ( $\Delta H$ ) für die 12-mer Hämocyane aus *P. camtschatica*, *H. americanus* und *C. granulata* einen linearen Verlauf des van't Hoff Plots.

Für das hexamere Hämocyanin aus *P. interruptus* erfolgt die Analyse nach dem MWC-Modell in Kapitel 4.2.3 in der hier vorliegenden Arbeit.

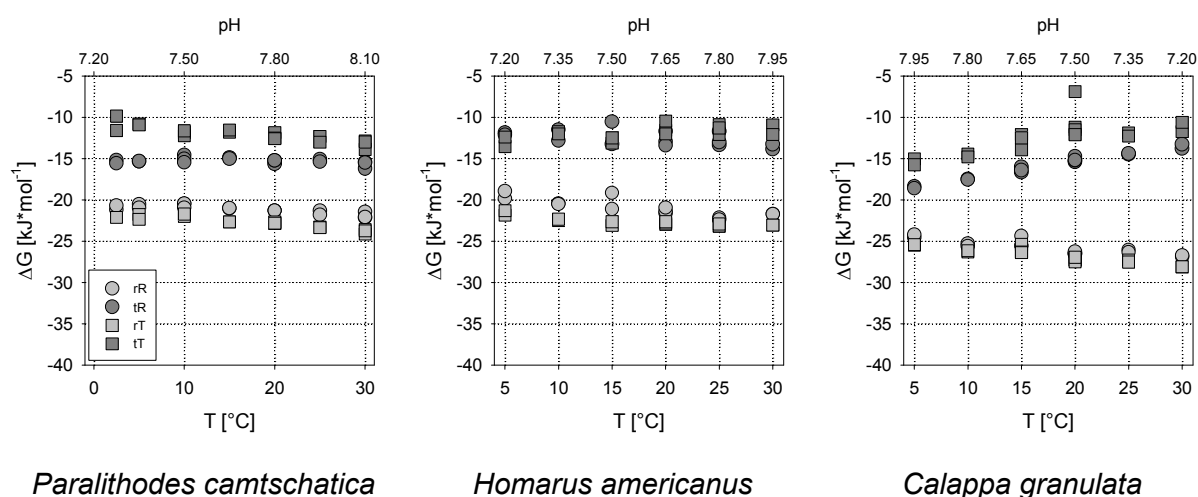
Bindungskonstante	$\Delta H$ [kJ* $\text{mol}^{-1}$ ]		
	<i>P. camtschatica</i>	<i>H. americanus</i>	<i>C. granulata</i>
$k_{rR}$	-18.35	+2.10	-8.55
$k_{tR}$	-21.30	-5.65	-84.32
$k_{rT}$	-10.85	-15.80	-6.75
$k_{tT}$	+3.40	-38.85	-78.75

**Tab. 4.2-10: Bindungsenthalpien für Sauerstoff** an die im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der  $\text{O}_2$ -Löslichkeitskoeffizient wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 5°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde bei 20°C auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift von 0.03 pH-Einheiten pro °C wurde nicht korrigiert.

Beim *C. granulata* Hämocyanin zeigt der Vergleich der Bindungsenthalpien auch für das Nesting-Modell eine Besonderheit. Wie zuvor bei dem Hill-Plot ist hier die Bindungsenthalpie der weniger affinen Konformationen tR und tT deutlich stärker exotherm als für die affinen Konformationen rR und rT. Auch dies kann als eine Adaption an das Warmwasser-Biotop von *C. granulata* interpretiert werden. Die aus dem Hill-Plot für  $k_1$  und  $k_N$  errechneten Bindungsenthalpien finden im Nesting-Modell als Bindungsenthalpien für  $k_{tR}$  und  $k_{tT}$  bzw.  $k_{rR}$  und  $k_{rT}$  ihre Entsprechung. Bei dem *P. camtschatica* und *H. americanus* Hämocyanin lässt sich dieser Zusammenhang zwischen den Bindungsenthalpien aus dem Hill-Plot und dem Nesting-Modell nicht herstellen.

An Hand der vier Bindungskonstanten  $k_{rR}$ ,  $k_{tR}$ ,  $k_{rT}$  und  $k_{tT}$  lässt sich mit  $\Delta G = -RT \ln(k/\kappa)$  die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $\text{O}_2$ -Bindung an die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen des Hämocyaninmoleküls berechnen. Bei zwei Tieren zeigt das  $\Delta G_{rR \text{ bis } tT}$  eine schwach ausgeprägte Temperatur- und/oder pH-Abhängigkeit (Abb. 4.2-14, links u. Mitte). Eine deutlichere Temperatur- und/oder pH-Abhängigkeit ist für das  $\Delta G_{rR \text{ bis } tT}$  beim *C. granulata* Hämocyanin festzustellen.





**Abb. 4.2-14:** Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung, für drei Hämocyane verschiedener Tierarten, an die im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der  $O_2$ -Löslichkeitskoeffizient wurde berücksichtigt. Untersucht wurde im Temperaturbereich von  $5^\circ C$  bis  $30^\circ C$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde bei  $20^\circ C$  auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift von 0.03 pH-Einheiten  $pro^\circ C$  wurde nicht korrigiert.

Mit zunehmender Temperatur und steigender Protonenkonzentration wird das  $\Delta G$  für die  $O_2$ -Bindung an die weniger affinen Konformationen tR und tT signifikant kleiner. Das  $\Delta G$  für die affinen Konformationen rR und rT wird dagegen etwas größer. Dies bedeutet, beim *C. granulata* Hämocyanin nimmt die Energiedifferenz zwischen den weniger affinen und affinen Konformationen mit steigender Temperatur und Protonenkonzentration zu (Abb. 4.2-14, rechts). Durch diese Zunahme der freien Gibbschen Energie wird die  $O_2$ -Bindung an die affinen Hämocyaninkonformationen begünstigt. Die Sauerstoffaufnahme an den Kiemen wird somit im wärmeren Gewässer effektiver. Auch im Vergleich zu dem *P. camtschatica* und *H. americanus* Hämocyanin ist das  $\Delta G$  des *C. granulata* Hämocyanins deutlich negativer, d.h. größer.

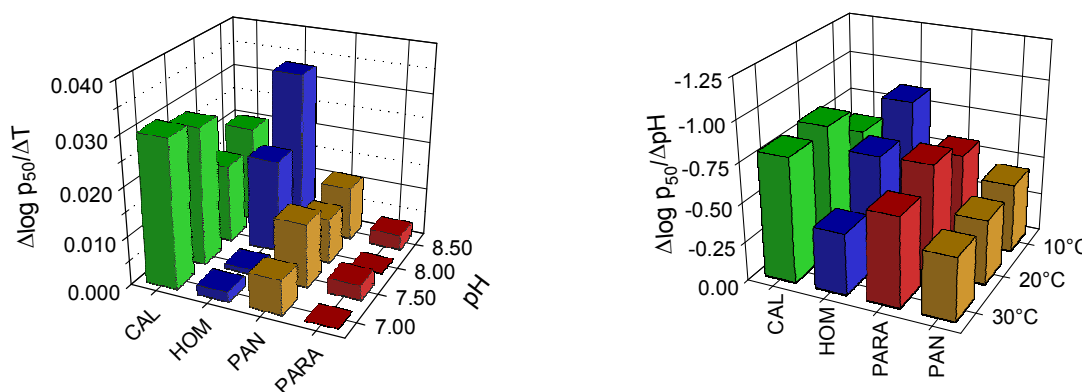
Die Beträge der freien Energie ( $\Delta G$ ) an die vier im Nesting-Modell postulierten Hämocyaninkonformationen sind, wie zuvor bei den Hill-Konstanten, gering. Sie liegen wie bei den zuvor untersuchten Hämocyaninen in der Größenordnung einiger Ionen- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen ( $10$ - $30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) und auch die Energiedifferenz zwischen den Konformationen liegt im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien ( $<10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Eine Ausnahme ist das *C. granulata* Hämocyanin mit  $\delta\Delta G > 10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  zwischen  $20^\circ C$  und  $30^\circ C$ . Auch hier gilt, eine kleine Änderung beim  $\Delta G$ , hat einen großen Einfluss auf die Bindungskonstante.

Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem  $p_{50}$  und den thermodynamischen Parametern lässt sich nicht herleiten. So haben das *P. camtschatica* und *H. americanus* Hämocyanin trotz der unterschiedlichen Lebensräume ähnliche  $p_{50}$ -Werte, besitzen aber deutlich verschiedene  $O_2$ -Bindungsenthalpien. Die  $\Delta G$ -Werte liegen für *P. camtschatica* und *H. americanus* unabhängig von Biotop und Funktion ( $p_{50}$ ) im gleichen Größenbereich. Demgegenüber besitzt das *C. granulata* Hc bei affinen Konformationen ein um die  $5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  negativeres  $\Delta G$ .

## ii) Die Hämocyanin-Funktion bei pH=const.

Die getrennte Betrachtung des Einflusses der Temperatur und des pH-Wertes auf die Bindungseigenschaften zeigt auch bei den Gruppe (2) Hämocyaninen, dass der Bohr-Effekt ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) größer ist als der Temperatureffekt ( $\Delta \log p_{50} / \Delta T$ ) (siehe Abb. 4.2-15). Der reine Temperatureffekt kommt *in vivo* so nicht vor. Die Tiere sind nicht in der Lage den pH-Wert in der Hämolymphe aktiv zu kontrollieren. Die Proteine in der Hämolymphe, oder die Mobilisierung von  $\text{CaCO}_3$  aus dem Exoskelett bewirken eine mögliche Pufferung [ADAMCZEWSKA & MORRIS, 1994]. Trotz dieser möglichen Puffersysteme in der Hämolymphe ist eine Temperaturänderung immer verbunden mit einer gleichzeitigen pH-Änderung. Dagegen ist eine pH-Abnahme der Hämolymphe bei konstanter Temperatur aufgrund einer metabolischen und respiratorischen Azidose bei aktiven Tieren *in vivo* zu beobachten. Durch eine metabolische (Bildung von D-Laktat) und einer respiratorischen ( $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) Azidose kommt es zu einer Abnahme des pH-Wertes um bis zu 0.50 Einheiten bei Arachniden [PAUL et al., 1994] und 0.80 Einheiten bei Crustaceen [ADAMCZEWSKA & MORRIS, 1994]. Der Bohreffekt bewirkt dann eine Freisetzung des gebundenen Sauerstoffs aus den Hämocyaninmolekülen und vergrößert so den Sauerstoffgradienten zwischen der Hämolymphe und dem stoffwechselaktiven Gewebe.

Der  $p_{50}$  vom *P. camtschatica* Hämocyanin ist im Vergleich zu den anderen Gruppe (2) Hämocyaninen im untersuchten pH-Bereich nahezu temperaturunempfindlich. Der  $p_{50}$  des hexameren Hämocyanins aus der Languste *P. interruptus* zeigt eine, wenn auch nur sehr schwache Temperaturempfindlichkeit. Der T-Koeffizient ist auch hier im untersuchten pH-Bereich nahezu konstant. Das *H. americanus* Hämocyanin besitzt einen pH-abhängigen T-Koeffizient. Im neutralen pH-Bereich hat die Temperatur keinen Einfluss auf den  $p_{50}$ , im Basischen ist der Temperatureinfluss deutlich ausgeprägt und der  $p_{50}$  wird mit steigender Temperatur größer. Die Temperaturempfindlichkeit des  $p_{50}$ -Wertes im gesamten hier untersuchten pH-Bereich ist für das *C. granulata* Hämocyanin am größten. Zusätzlich lässt sich noch eine leichte pH-Abhängigkeit erkennen. Im Neutralen ist der Einfluss der Temperatur auf den  $p_{50}$  am ausgeprägtesten und der T-Koeffizient am größten (Abb. 4.2-15, links).

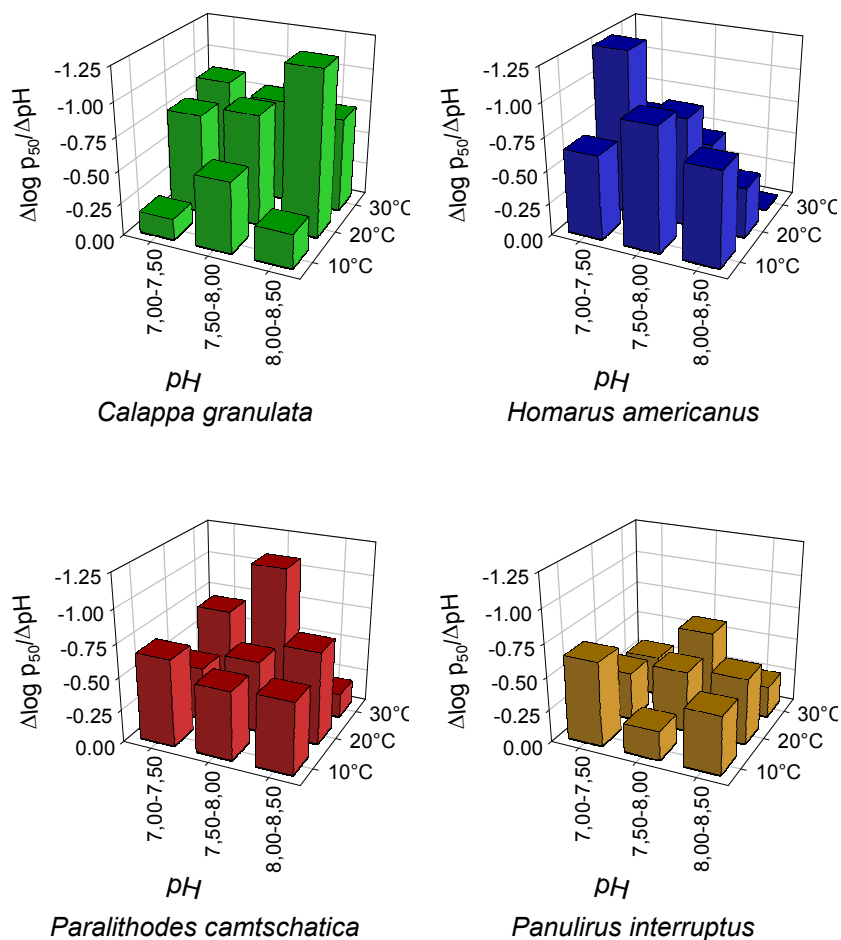


**Abb. 4.2-15:** T- und Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta T$ ;  $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von Hämocyanin aus vier verschiedenen Tieren. Das  $\Delta T$  beträgt 20°C (von 10°C bis 30°C) und das  $\Delta \text{pH}$  beträgt 1.50 pH-Einheiten (pH 7.00 bis 8.50).

Die Hämocyanine aus drei Tieren zeigen im gesamten untersuchten pH-Bereich (7.00-8.50) einen von der Temperatur unabhängigen Bohrkoefizienten: *C. granulata* =  $-0.74 \pm 0.09$ ; *P. camtschatica* =  $-0.61 \pm 0.06$ ; *P. interruptus* =  $-0.42 \pm 0.02$ . Dem gegenüber besitzt das *H. americanus* Hämocyanin einen Temperatur abhängigen Bohrkoefizienten, dieser sinkt von  $-0.86$  bei 10°C auf  $-0.39$  bei 30°C.

Erfolgt eine Unterteilung des untersuchten pH-Bereichs in 0.50 pH-Schritten, so wird bei *C. granulata* und *H. americanus* eine Temperaturabhängigkeit des Bohrkoeffizienten erkennbar. Bei einer stufenweisen Berechnung des Bohrkoeffizienten besitzt das Hämocyanin von *C. granulata* die größten Werte bei 20°C und 30°C. Der Einfluss der Protonenkonzentration auf die O<sub>2</sub>-Bindungsaffinität des Hämocyanins ist bei 20°C am stärksten. Der temperaturempfindlichste pH-Bereich bei *C. granulata* liegt zwischen 8.00 und 8.50 (Abb. 4.2-16, oben links). Diese Hämocyanineigenschaft eines großen Bohrkoeffizienten bei höherer Temperatur, passt gut zum subtropischen Biotop der Schamkrabbe *C. granulata*. Das Hämocyanin von *H. americanus* besitzt bei 10°C und 20°C die höchsten Bohrkoeffizienten. Bei 20°C ist der Einfluss der Protonenkonzentration auf die O<sub>2</sub>-Affinität des Hummer-Hämocyanins am ausgeprägtesten, d.h. der Bohrkoeffizient wird mit zunehmender H<sup>+</sup>-Konzentration größer (Abb. 4.2-16, oben rechts). Bei 20°C ist die Stoffwechselrate des Tieres in der Ruhephase, wie auch in der aktiven Phase erhöht. Es kommt zu einer schnelleren metabolischen Azidose, d.h. die H<sup>+</sup>-Konzentration in der Hämolymphe steigt und durch die Verstärkung des Bohreffekts wird die O<sub>2</sub>-Freisetzung am Hämocyanin erhöht. Auch hier passt die Hämocyanineigenschaft gut zu den Temperaturbedingungen des Hummer Biotops.

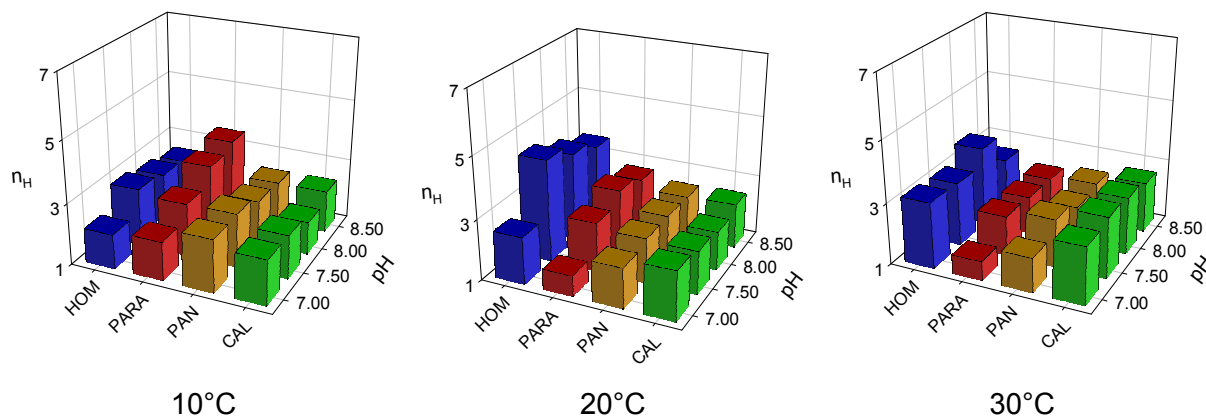
Das *P. camtschatica* und das *P. interruptus* Hämocyanin weisen keine signifikante Abhängigkeit des Bohrkoeffizienten gegenüber der Temperatur und dem pH auf (Abb. 4.2-16, unten). Eine Anpassung der Funktion hinsichtlich des Bohrkoeffizienten an das Biotop kann für diese beiden Hämocyanine nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 4.2-16:** Nach pH-Stufen aufgelöster Bohr-Koeffizient ( $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ ) von Hämocyanin aus vier verschiedenen Tieren, in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

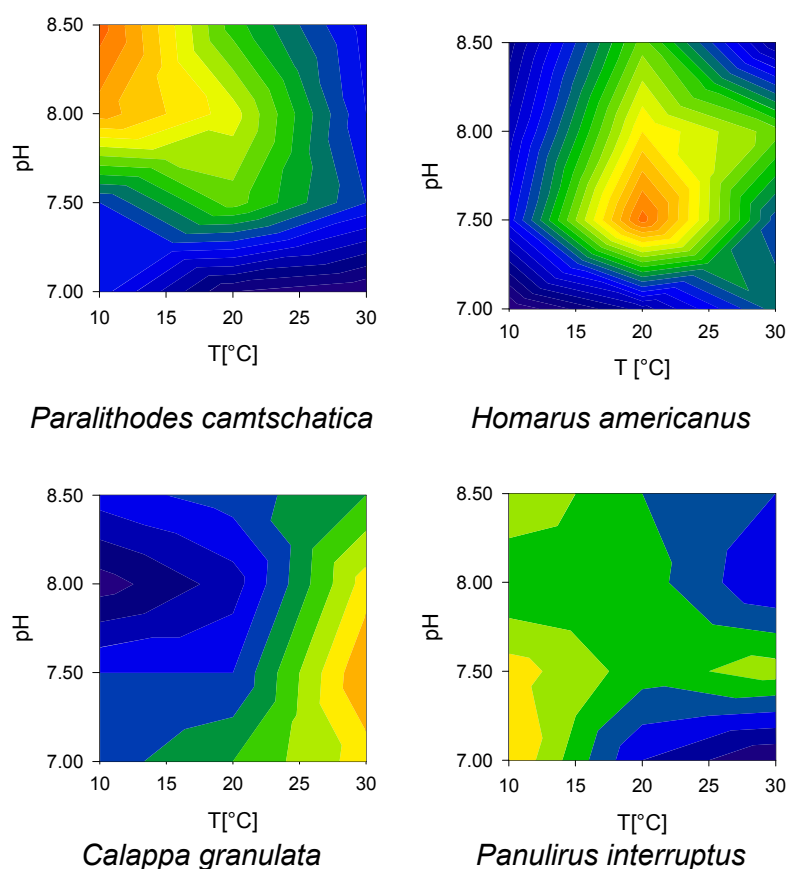
Die Kooperativität der O<sub>2</sub>-Bindung bei 10°C, 20°C und 30°C, ausgedrückt durch den Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ), zeigt bei 10°C nur für das *P. camtschatica* Hämocyanin eine signifikante pH-Abhängigkeit. Der Sauerstoff wird bei einer höheren Protonenkonzentration weniger kooperativ gebunden. Diese pH-Abhängigkeit nimmt mit steigender Temperatur ab. Die höchsten Kooperativitätswerte erreicht das *P. camtschatica* Hämocyanin bei 10°C.

Das *H. americanus* Hämocyanin hat seine höchste Kooperativität bei 20°C, eine eindeutige pH-Abhängigkeit ist aber nicht festzustellen. Die Languste *P. interruptus* hat ein relatives pH- und temperaturunempfindliches Hämocyanin und nur bei 10°C ist die Kooperativität unabhängig vom pH-Wert leicht erhöht. Das Hämocyanin der Schamkrabbe *C. granulata* zeigt keine pH-abhängige Kooperativität, aber eine schwache Temperaturabhängigkeit, so dass bei 30°C die höchsten Kooperativitäten gemessen werden (Abb. 4.2-17).



**Abb. 4.2-17:** Die Kooperativität ( $n_H$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an das Hämocyanin aus *H. americanus*, *P. camtschatica*, *P. interruptus* und *C. granulata* in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Die zuvor bei den Gruppe (1) Hämocyaninen auf Seite 103 gemachte Feststellung, dass die höher aggregierten Hämocyanine temperatur- und pH-empfindlicher sind, lässt sich hier nur teilweise bestätigen. Beim Vergleich des 6-meren Hämocyanins aus *P. interruptus* mit dem 12-meren Hämocyanin aus *H. americanus* und *P. camtschatica* trifft die zuvor gemachte Annahme zu, nicht aber bei dem 12-meren Hämocyanin aus *C. granulata*.



**Abb. 4.2-18:** Die Kooperativität ( $n_H$ ) der  $O_2$ -Bindung an Hämocyanin aus *P. camtschatica*, *H. americanus*, *C. granulata* und *P. interruptus* in Abhängigkeit von pH und Temperatur als Höhenliniendarstellung. Die Bereiche mit der höchsten Kooperativität sind rot.

Die vier Hämocyaninspezies besitzen bei verschiedenen Temperatur- und pH-Werten unterschiedliche Kooperativitätsoptima. Das Hämocyanin des Hummers *H. americanus* hat seine maximalen  $n_H$ -Werte zwischen 15  $^{\circ}C$  bis 25  $^{\circ}C$  und pH 7.50 bis 8.00 (Abb. 4.2-18, oben rechts). Der Temperaturbereich im Biotop des Hummers liegt zwischen 10  $^{\circ}C$  und 20  $^{\circ}C$ , wird also vom Kooperativitätsoptimum im unteren Bereich nicht ganz abgedeckt. Bei niedrigeren Temperaturen reicht der in der Hämolymphe physikalisch gelöste Sauerstoff in der Regel zur Versorgung der stoffwechselaktiven Zellen aus. Eine zusätzliche schnelle Mobilisierung von Sauerstoff über eine Erhöhung der Kooperativität des Hämocyanins ist nicht nötig. Hier spiegelt sich das Biotop in der Funktion des Hämocyanins wieder. Die hohe Kooperativität bei 20  $^{\circ}C$  über einen großen pH-Bereich (pH 7.50-8.50), garantiert den gerade bei höheren Temperaturen aktiveren Tieren eine gute Sauerstoffversorgung.

Ganz anders ist das Bild bei dem *P. camtschatica* Hämocyanin, hier reicht das Kooperativitätsoptimum von unter 10  $^{\circ}C$  bis 15  $^{\circ}C$  und in einem pH-Bereich von 8.00 bis 8.50 (Abb. 4.2-18, oben links). Dies deckt sich mit den Umweltbedingungen, die die Tiere bzw. das Hämocyanin in ihrem Biotop bzw. in der Hämolymphe vorfinden. Das Biotop hat auch hier die Funktion des Hämocyanins mitbestimmt.

Bei dem *C. granulata* Hämocyanin liegt das Kooperativitätsoptimum bei über 30  $^{\circ}C$  und in einem pH-Bereich von 7.00 bis 7.50 (Abb. 4.2-18, unten links). Dieser Bereich stimmt gut mit den Temperatur- und pH-Bedingungen überein, mit denen das Hämocyanin im Biotop der Schamkrabbe konfrontiert wird. Denn Temperaturen von über 25  $^{\circ}C$  sind in subtropischen Gewässern keine Seltenheit.

Bei diesen Temperaturen und den damit in der Hämolymphe verbundenen pH-Werten (zwischen 7.00 und 7.50), bedeutet dies für das Hämocyanin eine schnelle Sauerstoffaufnahme und -abgabe zu gewährleisten. Also auch in diesem Fall bestimmen die Umweltbedingungen im Biotop die Funktion (Kooperativität) des Hämocyanins.

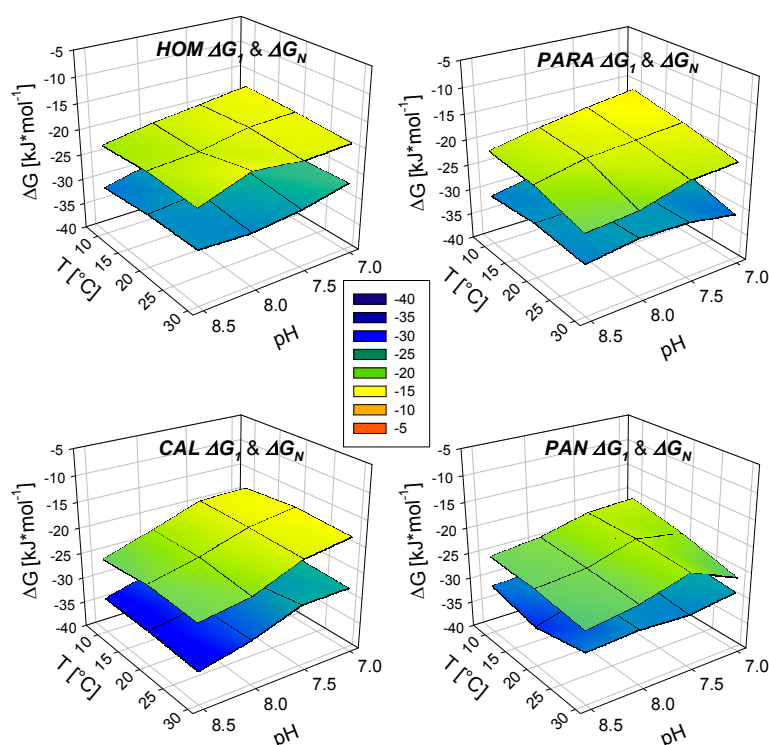
Das hexamere Hämocyanin aus der Languste *P. interruptus* besitzt kein eindeutiges Kooperativitätsoptimum. Allerdings ist bei Temperaturen von unter 20°C eine leichte Tendenz zu höheren Kooperativitätswerten zu erkennen (Abb. 4.2-18, unten rechts). Das Biotop scheint auch bei der Languste, wenn auch nicht sehr ausgeprägt, die Funktion des Hämocyanins zu beeinflussen. Ein möglicher Grund für das Fehlen eines Kooperativitätsoptimums könnte die geringere Aggregationshöhe des Panulirus Hämocyaninmoleküls, und die deshalb fehlende Möglichkeit einer Feinabstimmung der Sauerstoffbindung sein.

➤ Thermodynamische Analysen für pH=const

• Der Hill-Plot

Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

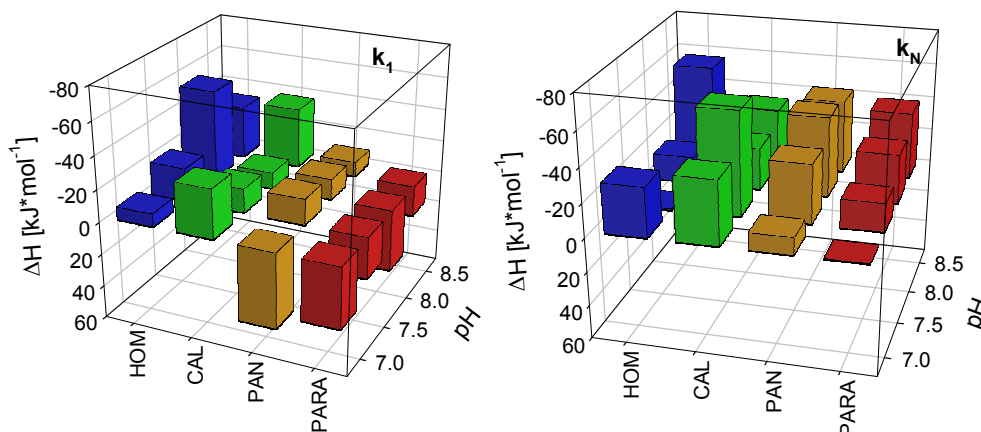
Bei den  $\Delta G$ -Werten (Abb. 4.2-19) besteht auch bei den Gruppe (2) Hämocyaninen zwischen den beiden Versuchsansätzen pH=pH(T) und pH=const. kein signifikanter Unterschied. Die bei pH=const. aus dem Hill-Plot bestimmten  $\Delta G$ -Werte für die T- bzw. R-Konformation der vier Hämocyaninspezies haben die Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen (15-30 kJ\*mol<sup>-1</sup>). Auch die mit ca. 10 kJ\*mol<sup>-1</sup> (5 kJ\*mol<sup>-1</sup> bei *P. interruptus*) geringe Energiedifferenz zwischen den beiden Konformationen findet sich bei beiden Versuchsansätzen. Es gilt auch hier, dass die niedrigen  $\Delta G$ -Werte durch den exponentiellen Zusammenhang  $(k_1 \text{ bzw. } N/\kappa) = e^{\Delta G/-RT}$  einen sehr großen Einfluss auf die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  besitzen.



**Abb. 4.2-19:** Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der O<sub>2</sub>-Bindung an die niedrig-affine T- ( $\Delta G_1$ ) und hoch-affine R-Form ( $\Delta G_N$ ) vier Hämocyanine aus vier verschiedenen Spezies. Die Werte für  $\Delta G_1$  bilden die obere und die Werte für  $\Delta G_N$  bilden die untere Fläche.

Im Vergleich zu den Gruppe (1) Hämocyaninen (s.S. 105) sind die  $\Delta G$ -Werte hier deutlich kleiner, dies gilt besonders für die  $O_2$ -Bindung an die hochaffine R-Konformation. Der Unterschied liegt bei einer Größenordnung von  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

Aus dem linearen Verlauf des van't Hoff Plots ( $\ln k = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$ ) lassen sich für die vier Hämocyanine die folgenden  $\Delta H$ -Werte bestimmen:



**Abb. 4.2-20:** Bindungsenthalpien für Sauerstoff an die T- und R-Konformation vier verschiedener Hämocyanine. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der jeweils eingestellte pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

Bei *P. interruptus* und *P. camtschatica* ist die pH-Empfindlichkeit von  $\Delta H$  bei der Bindung des letzten  $O_2$ -Moleküls ( $k_N$ ) an das Hämocyanin deutlich ausgeprägt. Für *C. granulata* und *H. americanus* lässt sich für  $\Delta H_N$  keine pH-Abhängigkeit erkennen. Die  $O_2$ -Bindung an das Hämocyanin erfolgt für das letzte  $O_2$ -Molekül bei allen vier Tieren und für fast alle untersuchten pH-Werte exotherm (Abb. 4.2-20, rechts).

Die Bindung des ersten  $O_2$ -Moleküls ( $k_1$ ) an das *P. camtschatica* Hämocyanin erfolgt im untersuchten pH-Bereich ausschließlich endotherm. Beim *P. interruptus* Hämocyanin ist die Bindung des ersten  $O_2$ -Moleküls nur bei pH 7.00 endotherm, ansonsten schwach exotherm und unabhängig vom pH-Wert. Beide Kaltwassertiere besitzen ein Hämocyanin mit ähnlichen Bindungsenthalpien für das erste und letzte  $O_2$ -Molekül.

Die Hämocyanine aus *C. granulata* und *H. americanus* binden das erste  $O_2$ -Molekül zwischen pH 7.00 und 8.50 exotherm. Eine signifikante Abhängigkeit der Bindungsenthalpie vom pH-Wert lässt sich aber nicht erkennen.

- Das Nesting-Modell pH=const.

Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

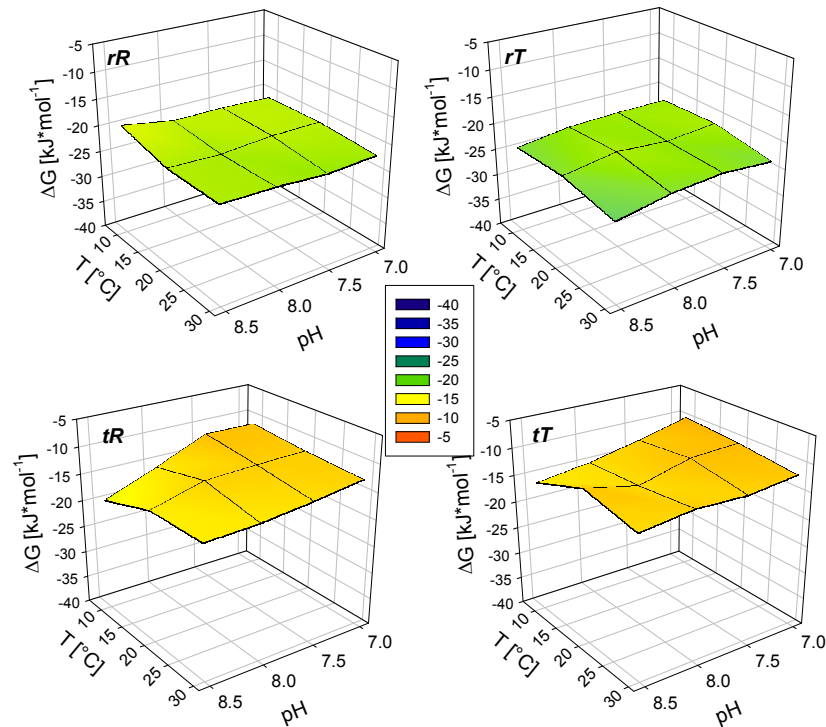
Bei dem *H. americanus*, *P. camtschatica* und *C. granulata* Hämocyanin ist, im Gegensatz zu den Gruppe (1) Hämocyaninen, die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der Sauerstoffbindung an die rR-, tR-, rT- und tT- Konformationen um 5 bis 10 kJ\*mol<sup>-1</sup> kleiner, als an die R- und T-Konformation des Gesamtmoleküls (s. Abb. 4.2-19). Das  $\delta\Delta G$  für das MWC-Modell (Hill-Plot) und das Nesting-Modell beträgt wie zuvor bei den Gruppe (1) Hämocyaninen ca. 10kJ\*mol<sup>-1</sup>.

Das  $\Delta G$  der O<sub>2</sub>-Bindung an die affine rR- und rT-Konformation zeigt sich bei dem *H. americanus*, *P. camtschatica* und *C. granulata* Hämocyanin als pH- und temperatur-unempfindlich. Die grünen bzw. blaugrünen  $\Delta G$ -Flächen weisen keine andersfarbigen Maxima und Minima auf (Abb. 4.2-21 bis 4.2-23, oben). Bei den niedrigaffinen tR- und tT-Konformationen besteht bei allen drei Hämocyaninspezies für das  $\Delta G$  eine geringe pH- und Temperaturempfindlichkeit. Die gelben  $\Delta G$ -Flächen besitzen für diese Unterkonformationen Maxima und Minima (Abb. 4.2-21 bis 4.2-23, unten).

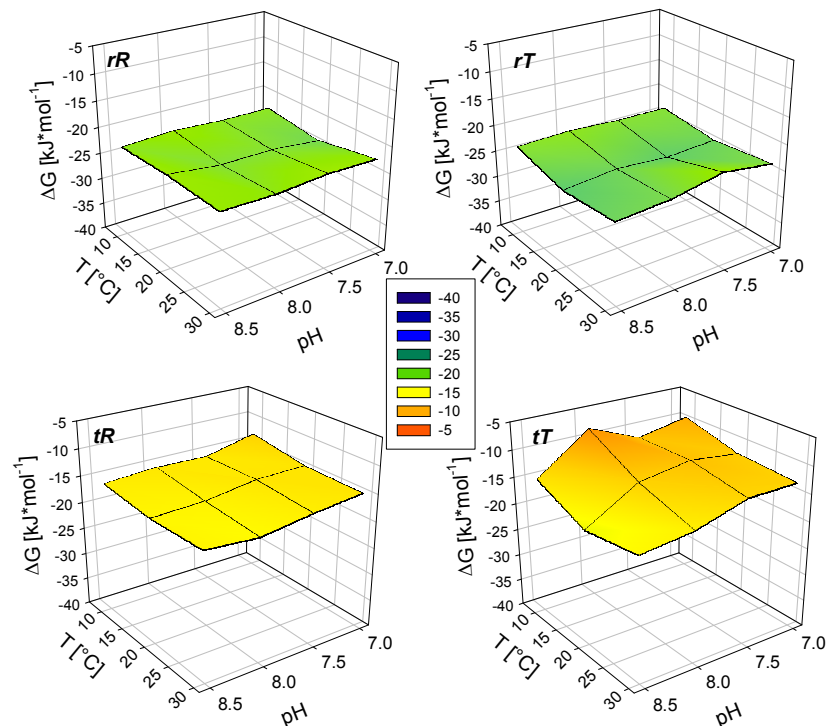
Das  $\Delta G$ -Flächenrelief der tR- und vor allem der tT-Konformation finden sich bei den  $\Delta G$ -Flächen für die T-Konformation des Gesamthämocyanins aus dem Hill-Plot wieder (s. Abb. 4.2-19). Am deutlichsten ist dies beim *C. granulata* Hämocyanin zu erkennen.

Auffällig sind die signifikant negativeren  $\Delta G$ -Werte der Sauerstoffbindung an die rR- und rT-Konformation des Hämocyanins aus der Schamkrabbe *C. granulata* (Abb. 4.2-23). Der Vergleich mit den Hämocyaninen aus *P. camtschatica* und *H. americanus* zeigt ein um 5kJ kleineres  $\Delta G$ . Auf Grund des subtropischen Lebensraums von *C. granulata* mit einer höheren Wassertemperatur (=Hämolymphtemperatur), liegt die rR- und rT-Konformation in verringerter Konzentration vor. Ein negativeres  $\Delta G$  bewirkt eine vergrößerte Triebkraft der O<sub>2</sub>-Bindungsreaktion und bewirkt eine effektivere O<sub>2</sub>-Bindung an die rR- und rT-Konformation.

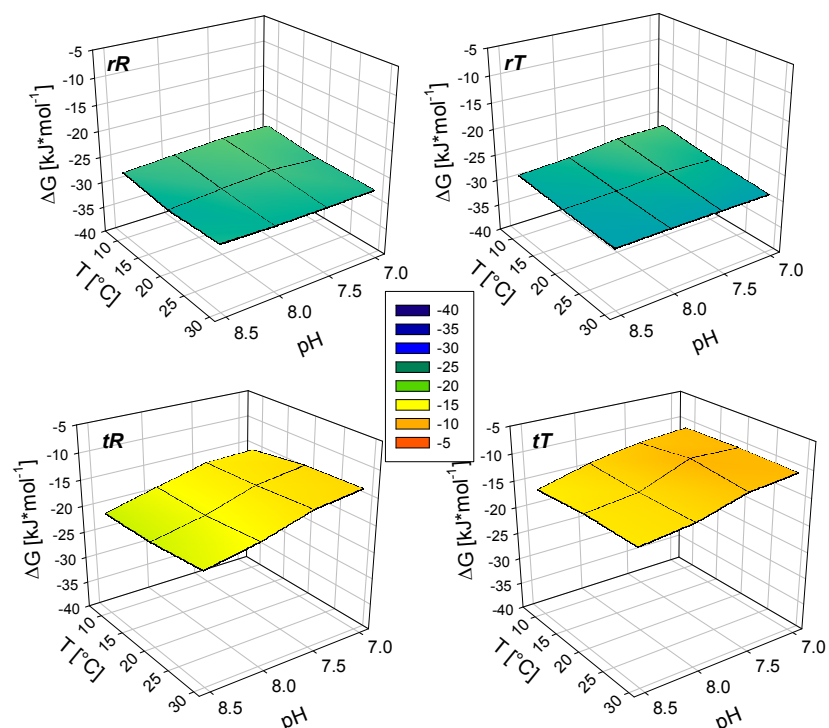




**Abb. 4.2-21:** Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung an das *H. americanus* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.



**Abb. 4.2-22:** Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung an das *P. camtschatica* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Weitere Bedingungen siehe Abb. 4.2-21.



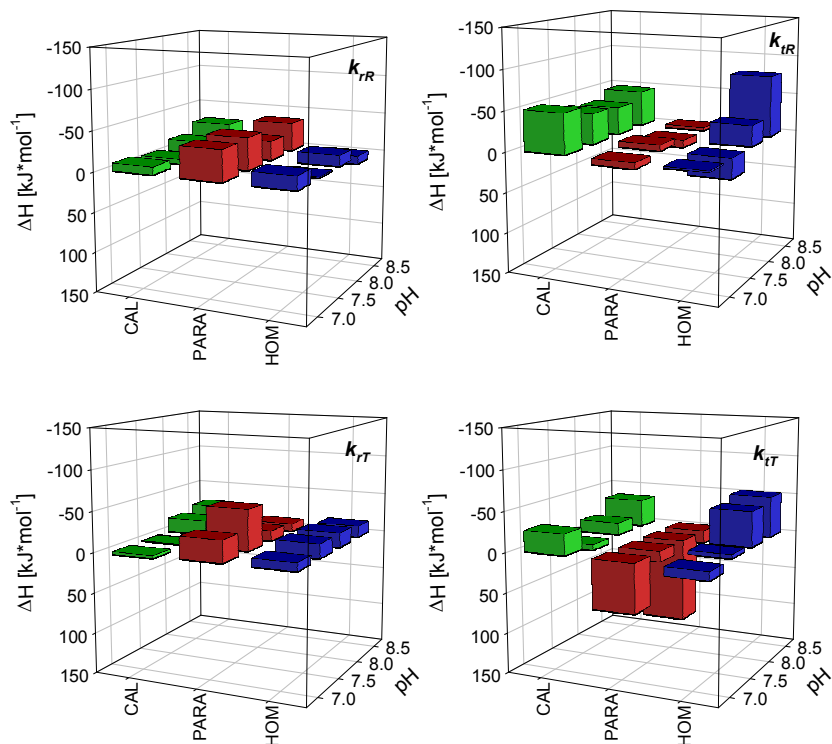
**Abb. 4.2-23:** Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) der  $O_2$ -Bindung an das *C. granulata* Hämocyanin für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

Bei der Betrachtung der Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) für die vier Unterkonformationen des Nesting-Modells, zeigt keines der in diesem Abschnitt betrachteten Hämocyanine eine signifikante pH-Abhängigkeit.

Eine schwache pH-Empfindlichkeit ist beim *H. americanus* Hämocyanin für die tR- und tT-Konformation zu erkennen. Im Basischen kommt es hier zu einer verstärkt exothermen Sauerstoffbindung, wogegen im neutralen pH-Bereich der Sauerstoff nur sehr schwach exotherm oder schwach endotherm gebunden wird. Vom pH unabhängig und schwach exotherm erfolgt die Sauerstoffbindung an die affinen rR- und rT-Konformationen des Nesting-Modells.

Das Hämocyanin der Königskrabbe *P. camtschatica* ist das Einzige in dieser Dreiergruppe, welches den Sauerstoff an die niedrigaffinen Konformationen (tR und tT) endotherm bindet. An die affine rR- und rT-Konformation erfolgt die  $O_2$ -Bindung dagegen ausschließlich exotherm.

Bei dem Hämocyanin der Schamkrabbe *C. granulata* verläuft die Sauerstoffbindung an die niedrigaffinen Nesting-Konformationen deutlich exothermer, als es bei den hochaffinen Konformationen der Fall ist (Abb. 4.2-24).



**Abb. 4.2-24:** Bindungsenthalpien von  $\text{O}_2$  an Hämocyanin aus drei verschiedenen Tierarten für die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen rR, tR, rT und tT. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

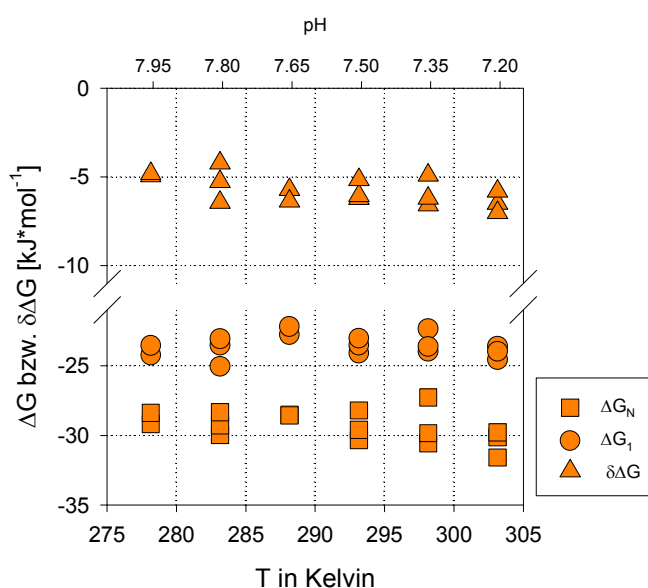
### 4.2.3 Das MWC-Modell für *Panulirus interruptus*

Neben der graphischen Auswertung mit Hilfe des Hill-Plots wurden die Sauerstoffbindungskurven des hexameren Hämocyanins der Languste *P. interruptus* an Hand einer auf dem MWC-Modell basierenden Fit-Routine analysiert. Die Bindungskurven lassen sich nicht mit dem Nesting-Modell beschreiben und wie aus früheren Arbeiten bekannt [CONNELLY et al. 1989; PERTON et al. 1997] lässt sich die Funktion von hexameren Arthropoden-Hämocyaninen mit dem MWC-Modell hinreichend erklären und darstellen.

- pH=pH(T)

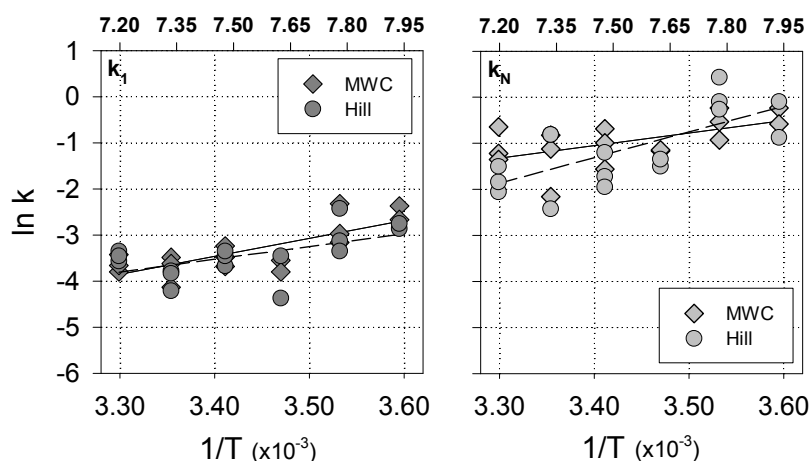
Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  und  $\Delta H$

Auch hier bei dem *P. interruptus* Hämocyanin sind die Beträge der freien Energie bei der Bindung von Sauerstoff an die T- oder R-Konformation gering. Sie liegen wie zuvor bei den anderen Hämocyaninen in der Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen ( $10\text{-}30\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Die Energiedifferenz zwischen der T- und der R-Konformation fällt noch niedriger aus, so dass diese im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien ( $<10\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) liegt. Auch hier gilt wieder der exponentielle Zusammenhang zwischen den Bindungskonstanten  $k_1$  bzw.  $k_N$  und dem  $\Delta G$ . Dieses wird deutlich wenn die Formel  $\Delta G_{1\text{ bzw. }N} = -RT \ln(k_{1\text{ bzw. }N}/\kappa)$  nach  $(k_{1\text{ bzw. }N}/\kappa) = e^{\Delta G/(-RT)}$  umgestellt wird. Eine kleine Änderung der freien Energie  $\Delta G$  bewirkt eine große Änderung der Bindungskonstanten.



**Abb. 4.2-25:** Thermodynamische Parameter ( $\Delta G_1$ ,  $\delta\Delta G$ ,  $\Delta G_N$ ) der  $O_2$ -Bindung an das Hämocyanin aus *P. interruptus*. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $5^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Die Parameter wurden mit Hilfe des MWC-Modells bestimmt.

Die Tabelle 4.2-11 (S. 127) zeigt deutlich, dass es für die  $\Delta G$ -Werte keinen Unterschied macht ob die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  graphisch aus dem Hill-Plot oder mit Hilfe des MWC-Modells am Rechner bestimmt werden. Beide Varianten liefern nahezu identische  $\Delta G$ -Werte.



**Abb. 4.2-26:** Auftragung der  $O_2$ -Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  von Hämocyanin aus *P. interruptus* im van't Hoff Plot. Die Bindungskonstanten wurden einmal mit Hilfe des MWC-Modells errechnet und einmal graphisch aus dem Hill-Plot bestimmt. Die Steigung der Regressionsgeraden liefert die Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ). Untersucht wurde im Temperaturbereich von  $5^\circ C$  bis  $30^\circ C$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde auf 7.50 eingestellt und der Temperatur bedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den mit Hilfe der jeweiligen Bindungskonstanten errechneten  $\Delta H$ -Werten eine deutliche Diskrepanz zwischen den graphisch aus dem Hill-Plot und den mit Hilfe der MWC-Fit-Routine ermittelten Bindungskonstanten. Die Ursache liegt beim Hill-Plot in der Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Asymptoten für den ersten ( $k_1$ ) bzw. letzten  $O_2$ -Beladungsschritt ( $k_N$ ).

<i>Panulirus interruptus</i> [pH=pH(T)]					
Bestimmt mit:	$\Delta H_{k_1(5^\circ C-30^\circ C)}$	$\Delta H_{k_N(5^\circ C-30^\circ C)}$	$\Delta G_{k_1}$	$\Delta G_{k_N}$	$\delta \Delta G$
	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]
<i>MWC-Fit</i>	-32.35	-22.65	-23.60±0.75	-29.35±1.10	-5.75±0.80
<i>Hill-Plot</i>	-22.90	-46.30	-23.35±1.00	29.30±2.05	-5.95±2.20

**Tab. 4.2-11:** Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) und freie Gibbsche Energien ( $\Delta G$ ) für die  $O_2$ -Bindung an die T- und R-Konformation des *P. interruptus* Hämocyanin. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $5^\circ C$  bis  $30^\circ C$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde auf 7.50 eingestellt, der Temperatur bedingte pH-Shift wurde nicht korrigiert.

Die mit Hilfe des MWC-Fit ermittelten  $\Delta H$ -Werte finden eine Bestätigung in früheren Arbeiten [ANTONINI et al. 1983]. Die aus dem Hill-Plot graphisch ermittelten  $\Delta H$ -Werte weichen erheblich von den Literaturwerten ab. Im Vergleich zu den nach dem MWC-Modell berechneten Werten in der Tabelle 4.2-11, scheinen die aus dem Hill-Plot ermittelten Werte für  $\Delta H_{k_1}$  und  $\Delta H_{k_N}$  vertauscht zu sein. Die Ungenauigkeit bei der graphischen  $k_1$ - und  $k_N$ -Bestimmung wird bei den  $\Delta G$ -Werten in Form eines, im Vergleich zum MWC-Fit, teilweise doppelt so großen Fehlers deutlich.

- pH=const.  
Die Betrachtung der thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta G$

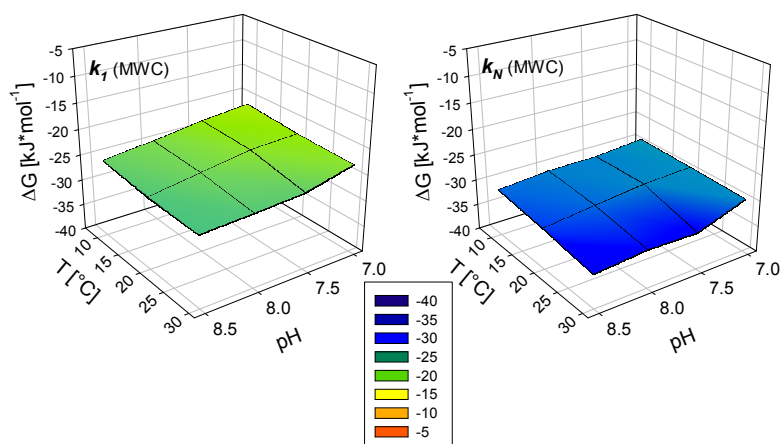
<i>Panulirus interruptus</i> [pH=const]		
pH	$\Delta H_{k_1(MWC)}$	$\Delta H_{k_N(MWC)}$
	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]	[kJ*mol <sup>-1</sup> ]
7.00	-8.30	-16.95
7.50	+9.75	+4.70
8.00	-4.10	-1.15
8.50	-13.65	-1.40

**Tab. 4.2-12: Bindungsenthalpien für Sauerstoff an die T- und R-Konformation des *P. interruptus* Hämocyanins.** Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 10°C bis 30°C, der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

Die Bindungsenthalpie ist bei der höheren H<sup>+</sup>-Konzentration (pH 7.00), für die R-Konformation mit  $k_N$  als Bindungskonstante am negativsten. Eine erhöhte Protonenkonzentration bewirkt eine vermehrte Stabilisierung der wenig O<sub>2</sub>-affinen T-Konformationen und damit einhergehend eine Erhöhung der allosterischen Gleichgewichtskonstante ‚L‘ ( $L=T_0/R_0$ ). Durch die energetisch begünstigte O<sub>2</sub>-Bindung an die R-Konformation, trägt diese trotz der pH-bedingten geringen Molekülkonzentration zur O<sub>2</sub>-Bindung und zum O<sub>2</sub>-Transport in der Hämolymphe bei.

Bei einer geringeren H<sup>+</sup>-Konzentration (pH 8.50) ist die Bindungsenthalpie für die T-Konformation mit  $k_1$  als Bindungskonstante am negativsten. Bei einer niedrigeren Protonenkonzentration liegt die O<sub>2</sub>-affine R-Konformation im Überschuß vor, wodurch sich die allosterische Gleichgewichtskonstante ‚L‘ ( $L=T_0/R_0$ ) verringert. Durch die energetisch begünstigte O<sub>2</sub>-Bindung diesmal an die T-Konformation, trägt diese trotz der pH-bedingten geringen Konzentration von T-Konformationen zur O<sub>2</sub>-Bindung und zum O<sub>2</sub>-Transport in der Hämolymphe bei. Durch diese Beteiligung der T-Konformation wird auch unter sehr affinen Bedingungen in der Hämolymphe eine O<sub>2</sub>-Abgabe gewährleistet.

Bei den mittleren pH-Werten 7.50 und 8.00 zeigen sich hinsichtlich der Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen  $k_1$  und  $k_N$ .



**Abb. 4.2-27: Freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ )** für die  $O_2$ -Bindung an die T- und R-Konformation des *P. interruptus* Hämocyanins. Der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff wurde berücksichtigt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , der pH des TRIS-HCl Puffers wurde konstant gehalten. Der Temperatur bedingte pH-Shift wurde dadurch korrigiert.

Die Berechnung der  $\Delta G$ -Werte der  $O_2$ -Bindung für die mit Hilfe der MWC-Fit-Routine errechneten Bindungskonstanten  $k_T$  und  $k_N$ , zeigt eine signifikante Temperatur- und pH-Unempfindlichkeit der freien Gibbschen Energie. Das  $\Delta G(k_T)$  bzw.  $\Delta G(k_N)$  und  $\delta\Delta G$  liegen, wie schon zuvor bei der rein graphischen Auswertung des Hill-Plots (s. Abb. 4.2-19, unten rechts), bei ca.  $-25$  bzw.  $-30\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  und  $-5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Beide Aussagen gelten für den in dieser Arbeit untersuchten Temperatur- und pH-Bereich.

### 5 Zusammenfassung

Für diese Arbeit werden Hämocyane aus der Hämolymphe sechs verschiedener Crustaceenarten und einer Chelicerenart untersucht. Die hier untersuchten Hämocyane werden in Bezug auf ihre Funktion, Struktur und physikalischen/thermodynamischen Eigenschaften näher charakterisiert. Es stellt sich die Frage, ob sich eine Korrelation zwischen Funktion und Biotop des jeweiligen Spendertieres beschreiben lässt.

#### 5.1 Die Lipoproteine und das ‚Nicht-Respiratorische-Protein‘ (NRP) in der Hämolymphe

Die aufgetrennten Lipoproteine finden sich in unterschiedlicher Anzahl, Farbe und Dichte in der Hämolymphe. Hinsichtlich der Dichte können die zwei verschiedenen Klassen der HD- und VHD-Lipoproteinen nachgewiesen werden. Das Apolipoprotein zeigt bei allen Lipoproteinen einen ähnlichen Absorptionspeak zwischen 273nm und 277nm, die assoziierten Carotinoide haben ihren Absorptionspeak im VIS-Bereich zwischen 460nm und 490nm. Die Molekulargewichtsabschätzung ergibt für einige der untersuchten Crustaceen zwei Typen von Apolipoproteinen. Das Spinnen-Apolipoprotein unterscheidet sich hinsichtlich des Molekulargewichts dabei deutlich von den Apolipoproteinen der Krebsarten.

Neben dem Hämocyanin und den Lipoproteinen wird das so genannte ‚Nicht Respiratorische Protein‘ (NRP) aus der Hämolymphe von *E. californicum*, *A. astacus* und *C. maenas* näher charakterisiert. Das NRP der Vogelspinne *E. californicum* zeigt im Vergleich zu den beiden Crustaceen NRPs deutliche strukturelle Unterschiede. Das Bandenmuster in der SDS-PAGE deutet auf ein Lipoprotein als NRP hin. Unterstützt wird diese Annahme durch die linsenförmige Gestalt im EM-Bild, die dem eines Insekten-Lipoproteins sehr nahe kommt. Dem gegenüber präsentierten sich die NRPs der Crustaceen unter dem Elektronenmikroskop als ein Molekül von hexamerer Struktur.

#### 5.2 Die Eigenschaften der untersuchten Hämocyane in Abhängigkeit zum Biotop

Die untersuchten Hämocyane werden in dieser Arbeit in zwei Gruppen unterteilt. Der Gruppe (1) sind die Hämocyane aus *Astacus astacus*, *Potamon potamios* und *Eurypelma californicum* zugeordnet. Die Gruppe (2) umfasst die ozeanischen Crustaceen *Paralithodes camtschatica*, *Panulirus interruptus* *Homarus americanus* & *Calappa granulata*. Durch die beiden Versuchsansätze  $pH=pH(T)$  und  $pH=const$  konnte der reine Temperatur- und pH-Effekt (Bohr-Effekt) auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins getrennt betrachtet werden. Die mit Hilfe des MWC- und Nesting-Modells analysierten Sauerstoffbindungskurven liefern die Bindungskonstanten für die Berechnung der Parameter  $\Delta G$ ,  $\delta\Delta G$ , und  $\Delta H$ , dies ermöglicht eine thermodynamische Betrachtung der Sauerstoffbindung.

##### 5.2.1 Die Gruppe (1) Hämocyane (*A. astacus*, *E. californicum* u. *P. potamios*)

###### i) Die Sauerstoffbindungseigenschaften bei $pH=pH(T)$

Die Sauerstoffbindungsparameter beschreiben für alle drei untersuchten Tiere ein Hämocyanin mit einer hohen bis sehr hohen Sauerstoffaffinität (niedrige  $p_{50}$ -Werte) und Kooperativität (hohe  $n_{50}$ -Werte). Die höchste Sauerstoffaffinität besitzt das Hämocyanin aus der Süßwasserkrabbe *P. potamios*. Die höchsten Kooperativitäten werden bei dem *E. californicum* Hämocyanin erreicht.

Alle drei Hämocyane dieser Gruppe besitzen eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber pH-Änderungen. Der Temperatur- und pH-Effekt (Bohr-Effekt) wirken synergistisch auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyaninmoleküls.

Hinsichtlich der Sauerstoffaffinität zeigen die in dieser Gruppe untersuchten Hämocyane keine signifikante funktionelle Anpassung an das jeweilige Biotop der Spendertiere.



Gemeinsam ist den drei Hämocyaninen eine hohe Temperaturstabilität. Aber auch in diesem Punkt lässt sich keine signifikant biotopabhängige Anpassung feststellen.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=pH(T)$ (MWC-Modell, Hill-Plot)

Die graphische Bestimmung der apparenten Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$  aus dem Hill-Plot zeigt bei einer Temperaturzunahme eine Verringerung der Bindungskonstanten. Die Bindung des letzten Sauerstoffmoleküls ( $k_N$ ) ist dabei temperaturempfindlicher, als die Bindung des ersten Moleküls ( $k_1$ ). Eine signifikant biotopabhängige Anpassung ist nicht erkennbar.

Das  $\Delta G_{1 \text{ bzw. } N}$  ist bei allen drei Tieren Temperatur und pH unabhängig. Die Differenz der freien Gibbschen Energie ( $\delta\Delta G$ ), bleibt für die Hämocyanine der Gruppe (1) im gewählten Temperaturbereich konstant.

Die Beträge von  $\Delta G$  liegen in der Größenordnung einiger Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen. Die Energiedifferenz ( $\delta\Delta G$ ) liegt im Bereich von einigen van-der-Waals-Energien. Die niedrigen  $\Delta G$ -Werte besitzen durch einen exponentiellen Zusammenhang einen sehr großen Einfluss auf die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$ .

Die zugehörigen Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) für  $k_1$  und  $k_N$  sind bei allen drei Hämocyaninen unabhängig von der Temperatur. Verschiedenen  $\Delta H$ -Werte haben ihre Ursache in den unterschiedlichen Wärmekapazitäten ( $\Delta C_p$ ) der Hämocyanine.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=pH(T)$ (Nesting-Modell)

Im Vergleich zu *P. potamios* und *E. californicum* sind die  $O_2$ -Bindungsenthalpien der einzelnen Konformationen für das *A. astacus* Hämocyanin nur schwach exotherm bis endotherm.

Die Beträge der freien Energie ( $\Delta G$ ) der Bindung von Sauerstoff an die vier im Nesting-Modell postulierten Hämocyaninkonformationen liegen in der Größenordnung einiger Ionen- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen. Aber auch hier gilt, eine kleine Änderung beim  $\Delta G$ , hat einen großen Einfluss auf die Bindungskonstante. Die Energiedifferenz ( $\delta\Delta G$ ) zwischen den Konformationen liegt ebenfalls im Bereich von einigen van-der-Waals Wechselwirkungsenergien.

Einen Zusammenhang zwischen dem  $p_{50}$  und den Bindungsenthalpien bzw. den  $\Delta G$ -Werten lässt sich nicht herleiten. Die  $\Delta G$ -Werte für die drei Hämocyanine liegen unabhängig von Tierart, Biotop und Funktion ( $p_{50}$ ) im gleichen Größenbereich.

## ii) Die Sauerstoffbindungseigenschaften bei $pH=const$

Die getrennte Betrachtung des Einflusses der Temperatur und des pH-Wertes auf die Bindungseigenschaften zeigt, dass der Bohr-Effekt auf die Hämocyaninmoleküle von *A. astacus*, *P. potamios* und *E. californicum* größer ist als der Temperatureffekt.

Die Hämocyanine aller drei Tiere zeigen im gesamten untersuchten pH-Bereich einen von der Temperatur unabhängigen und gleich großen Bohrkoeffizienten. Erfolgt eine Unterteilung des pH-Bereichs in 0.50 pH-Schritten, so wird bei *P. potamios* und *E. californicum* eine Temperaturabhängigkeit des Bohrkoeffizienten erkennbar.

Der Einfluss des Biotops auf die Funktion des Hämocyanins wird bei den Parametern Temperaturkoeffizient und Bohrkoeffizient deutlich sichtbar.

Auch bei der Kooperativität lässt sich für die drei untersuchten Hämocyanine einen Optimumsbereich beschreiben, der sehr gut die Bedingungen im Biotop des jeweiligen Spendertieres widerspiegelt.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=const$ (MWC-Modell, Hill-Plot)

Bei den  $\Delta G$ -Werten (einschließlich dem  $\delta\Delta G$ ) besteht zwischen beiden Versuchsansätzen  $pH=const.$  und  $pH=pH(T)$  kein signifikanter Unterschied. Bei allen drei Tieren ist die pH-Empfindlichkeit von  $\Delta H$  bei der Bindung des letzten  $O_2$ -Moleküls ( $k_N$ ) an das Hämocyanin deutlich ausgeprägter, als bei der Bindung des ersten  $O_2$ -Moleküls ( $k_1$ ).

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=const.$ (Nesting-Modell)

Die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ) und das  $\delta\Delta G$  der Sauerstoffbindung, an die vier im Nesting-Modell postulierten Konformationen, haben die gleiche Größenordnung, wie die zuvor aus dem Hill-Plot für die R- und T-Konformation berechneten Werte.

Bei der Betrachtung der Oxygenierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) zeigt das *A. astacus* Hämocyanin bei der tT-Konformation eine signifikante pH-Abhängigkeit. Das *P. potamios* Hämocyanin bindet den Sauerstoff nur in der tT-Konformation exotherm und die tR-Konformation des *E. californicum* Hämocyanins besitzt im Alkalischen die höchsten Oxygenierungsenthalpien.

### 5.2.2 Die Gruppe (2) Hämocyanine

(*P. camtschatica*, *H. americanus*, *C. granulata* u. *P. interruptus*)

#### i) Die Sauerstoffbindungseigenschaften bei $pH=pH(T)$

Die unterschiedlichen Aktivitätsmuster von *P. camtschatica* und *H. americanus* spiegeln sich in der Kooperativität und dem Brutto-Bohreffekt des jeweiligen Hämocyanins wieder.

*Calappa granulata* besitzt das Temperatur/pH empfindlichste Hämocyanin mit einem sehr ausgeprägtem Brutto-Bohreffekt. Bei der Kooperativität zeigt das *C. granulata* Hämocyanin eine Anpassung an das subtropische Biotop.

Die Temperatur- bzw. pH-Empfindlichkeit des  $p_{50}$ -Wertes für das Hämocyanin aus *P. interruptus* ist gering. Der niedrige  $p_{50}$ -Wert ist eine Anpassung an die Winter-Migration.

Bei der Sauerstoffbeladung in Abhängigkeit von Temperatur und pH zeigen die *H. americanus*, *C. granulata* Hämocyanine ähnliche Eigenschaften. Das *P. camtschatica* Hämocyanin zeigt eine Kaltwasseradaptation. Das Hämocyanin aus *P. interruptus* besitzt diese Kaltwasseradaptation dagegen nicht.

Der synergistische Effekt von pH und Temperatur auf den Sauerstoffbeladungsgrad ist beim *C. granulata*, *H. americanus* und *P. camtschatica* Hämocyanin am stärksten ausgeprägt.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=pH(T)$ (MWC-Modell, Hill-Plot)

Das Hämocyanin aus *P. interruptus* besitzt für die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls die höchsten  $\Delta G$ -Werte, aber eine deutlich geringere Energiedifferenz ( $\delta\Delta G$ ).

Das *P. camtschatica* Hämocyanin besitzt als Funktionsanpassung an das subpolare Biotop temperaturunabhängige Bindungskonstanten.

Das *C. granulata* Hämocyanin bindet das erste  $O_2$ -Molekül doppelt so exotherm, wie das letzte  $O_2$ -Molekül (Funktionsanpassung an das subtropische Biotop).

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=pH(T)$ (Nesting-Modell)

Durch die Warmwasseradaptation des *C. granulata* Hämocyanins ist die  $O_2$ -Bindungsenthalpie der wenig affinen Konformationen am stärksten exotherm. Die Energiedifferenz ( $\delta\Delta G$ ) nimmt beim *C. granulata* Hämocyanin mit steigender Temperatur und Protonenkonzentration zu.

#### ii) Die Sauerstoffbindungseigenschaften bei $pH=const.$

Der  $p_{50}$  vom *P. camtschatica* Hämocyanin ist nahezu temperaturunempfindlich. Der  $p_{50}$  des *P. interruptus* Hämocyanins zeigt eine schwache Temperaturempfindlichkeit und das *H. americanus* Hämocyanin besitzt einen pH-abhängigen T-Koeffizient. Für das *C. granulata* Hämocyanin ist die Temperaturempfindlichkeit des  $p_{50}$ -Wertes am ausgeprägtesten.

Die Hämocyanine aus *C. granulata*, *P. camtschatica* und *P. interruptus* zeigen einen temperaturunabhängigen Bohrkoeffizienten. Das *H. americanus* Hämocyanin besitzt einen temperaturabhängigen Bohrkoeffizienten.

Erfolgt eine Unterteilung des untersuchten pH-Bereichs, so wird bei *C. granulata* eine positive Temperaturabhängigkeit des Bohrkoeffizienten erkennbar. Diese Hämocyanineigenschaft passt gut zum subtropischen Biotop von *C. granulata*.

Auch für das Hämocyanin aus *H. americanus* ist der Bohrkoeffizient gut auf das Biotop abgestimmt.

Eine Anpassung der Funktion hinsichtlich des Bohrkoeffizienten für das *P. camtschatica* und das *P. interruptus* Hämocyanin an das Biotop kann nicht nachgewiesen werden.

Die Lage der Kooperativitätsoptima der vier Hämocyaninspezies aus *H. americanus*, *P. camtschatica*, *C. granulata* und *P. interruptus* stimmen, gut mit den möglichen Temperaturbedingungen im jeweiligen Biotop des Tieres überein.

Das hexamere *P. interruptus* Hämocyanin besitzt aufgrund der geringeren Aggregationshöhe kein eindeutiges Kooperativitätsoptimum.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=const.$ (MWC-Modell, Hill-Plot)

Im Vergleich zu den Gruppe (1) Hämocyaninen sind die  $\Delta G$ -Werte für die vier Hämocyanine aus *H. americanus*, *P. camtschatica*, *C. granulata* und *P. interruptus* deutlich kleiner.

Die Bindungsenthalpien in Abhängigkeit vom pH-Wert für das erste ( $\Delta H_1$ ) und das letzte ( $\Delta H_N$ ) Sauerstoffmolekül an die vier verschiedenen Hämocyaninspezies zeigen keine Biotopabhängigkeit.

### Thermodynamische Betrachtung für $pH=const.$ (Nesting-Modell; außer *P. interruptus*)

Bei dem *H. americanus*, *P. camtschatica* und *C. granulata* Hämocyanin ist das  $\Delta G$  der Sauerstoffbindung an die Nesting-Modell-Konformationen kleiner, als an die R- und T-Konformation des Gesamtmoleküls. Das  $\delta\Delta G$  für das MWC-Modell (Hill-Plot) und das Nesting-Modell ist gleich.

Das  $\Delta G$  für die affinen Konformationen zeigt sich bei dem *H. americanus*, *P. camtschatica* und *C. granulata* Hämocyanin als pH- und temperaturunempfindlich. Bei den niedrigaffinen Konformationen besteht bei allen drei Hämocyaninspezies eine geringe pH- und Temperaturempfindlichkeit.

Das  $\Delta G$ -Flächenrelief der tR- und vor allem der tT-Konformation findet sich bei den  $\Delta G$ -Flächen für die T-Konformation des Gesamthämocyaninmoleküls wieder.

Das *C. granulata* Hämocyanin besitzt als Anpassung an das subtropische Biotop signifikant negativere  $\Delta G$ -Werte für die O<sub>2</sub>-Bindung an die rR- und rT-Konformation.

Keines der Gruppe (2) Hämocyanine zeigt eine signifikante pH-Abhängigkeit der Oxygenierungsenthalpien für die vier Unterkonformationen des Nesting-Modells.

### *P. interruptus*: Thermodynamische Betrachtung für $pH=pH(T)$ und $pH=const.$ (MWC-Fit-Routine)

Der Hill-Plot und das MWC-Modell liefern nahezu identische  $\Delta G$ -Werte. Die  $\Delta G$ -Werte für die Bindungskonstanten  $k_1$  und  $k_N$ , zeigen eine signifikante Temperatur- und pH-Unempfindlichkeit.

Die Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) zeigen eine deutliche Diskrepanz zwischen den graphisch aus dem Hill-Plot und den mit Hilfe der MWC-Fit-Routine ermittelten Bindungskonstanten.

Durch deutlich negative  $\Delta H$ -Werte für die R- ( $k_1$ ) und T-Konformation ( $k_N$ ) bei pH 7.00 bzw. pH 8.50, tragen beide Konformationen trotz der pH bedingten geringen Molekülkonzentration zur O<sub>2</sub>-Bindung und zum O<sub>2</sub>-Transport in der Hämolymphe bei.

Bei pH 7.50 und 8.00 zeigen sich hinsichtlich der Bindungsenthalpien ( $\Delta H$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen  $k_1$  und  $k_N$ .

## 6 Literatur

- (1) ADACHI, K. et al (2003)  
Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme  
Comp. Biochem. Physiol. Part B 134, 135-141; 2003
- (2) ADAMCZEWSKA, A.M., and MORRIS, S. (1998)  
The functioning of the Haemocyanin of the terrestrial Christmas Island Red Crab *Gecarcoidea natalis* and roles for organic modulators  
J. of Exp. Biol. 201: 3233-3244; 1998
- (3) ADAMCZEWSKA, A.M. and MORRIS, S. (1994)  
Exercise in the terrestrial Christmas Island Red Crab *Gecarcoidea natalis*  
I. Blood gas transport  
J. of Exp. Biol. 188: 235-256; 1994
- (4) ADAMCZEWSKA, A.M. et al (1994)  
Exercise in the terrestrial Christmas Island Red Crab *Gecarcoidea natalis*  
II. Energetics of locomotion  
J. of Exp. Biol. 188: 257-274; 1994
- (5) AKETAGAWA, J. et al (1986)  
Primary Structure of *Limulus* Anticoagulant Anti-lipopolsaccharide Factor  
J. of Biol. Chem. Vol. 261, No.16, pp. 7357-7365; June 1986
- (6) ALBERT, J.L. and ELLINGTON, W.R. (1985)  
Patterns of Energy Metabolism in the Stone Crab, *Menippe mercenaria*, During Severe Hypoxia and Subsequent Recovery  
J. of Exp. Zool. 234: 175-183; 1985
- (7) ALBERTY, R.A. (1996)  
Thermodynamics of the binding of ligands by macromolecules  
Biophys. Chem. 62, pp.141-159, 1996
- (8) ANDERSON, S. R. (1991)  
Time resolved Fluorescence Spectroscopy  
Applications to Calmodulin  
The Journal of Biology Chemistry Vol. 266, No. 18, pp. 11405-11408; 1991
- (9) ANGERSBACH, D. and DECKER, H. (1978)  
Oxygen transport in crayfish blood: Effect of thermal acclimation, and short-term fluctuations related to ventilation and cardiac performance  
J. of Comp. Physiol. 123, pp. 105-112 (1978)
- (10) ANTONINI, E. et al (1983)  
Kinetic and Thermodynamic Parameters for Oxygen Binding to the Allosteric States of *Panulirus Interruptus* Hemocyanin  
Biophysical Chem. 18: 117-124; 1983
- (11) AONO, H., DIAZ, G.G. and MORI, K. (1994)  
Cytolysis of Hemocytes Induced by Serum and Plasma in Three Crustaceans, *Panulirus japonicus*, *Penaeus japonicus*, and *Homarus americanus*  
Devel. Comp. Im. Vol. 18, No. 4, pp. 265-275; 1994

- (12) AVERDAM, A., MARKL, J. and BURMESTER, T. (2003)  
Subunit sequences of the 4x6-mer hemocyanin from the golden orb-web spider,  
*Nephila inaurata*  
Eur. J. Biochem. 270, 3432-9; FEBS 2003
- (13) BARNIKOL, W.K.R. et al (1978)  
Eine verbesserte Modifikation der Mikromethode nach Niesel und Thews zur Messung  
von O<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurven in Vollblut und konzentrierten Hb-Lösungen  
Respiration 36: 86-95; 1978
- (14) BARNIKOL, W.K.R. et al (1983)  
Ein Verfahren zur Registrierung von Sauerstoff-Hämoglobin-Bindungskurven in  
extremer Verdünnung  
Funkt. Biol. Med. 2, 254-257; 1983
- (15) BARNIKOL, W.K.R. et al (1996)  
Ein neuartiges Verfahren der Sauerstoffdetektion für Medizin, Biologie,  
Umweltforschung und Biotechnik auf Basis der Lumineszenzlöschung  
Biomed. Technik, 41, 170-177; 1996
- (16) BEINTEMA, J.J. et al (1994)  
Evolution of Arthropod Hemocyanins and Insects Storage Proteins (Hexamerins)  
Mol. Biol. Evol. 11(3): 493-503; 1994
- (17) BELLELLI, A. et al (1988)  
Sexual and seasonal variability of lobster hemocyanin  
Comp. Biochem. Physiol., Vol.91A, No.3, pp. 445-449, 1988
- (18) BELTRAMINI, M. et al (1994)  
Luminescence Properties of the Dinuclear Copper Complex in the Active Site of  
Hemocyanins  
Arch. of Biochem. and Biophysics Vol. 313, No. 2 Sept., pp. 318-327, 1994
- (19) BERENDSEN, H.J.C. (1996)  
Bio-Molecular Dynamics Comes of Age  
SCIENCE, Vol.271, 16 February 1996
- (20) BERG, J.M. and SHI, Y. (1996)  
The galvanisation of biology: A growing appreciation for the roles of zinc  
SCIENCE, Vol.271, pp. 1081-1085, 23 February 1996
- (21) BIERI, O. and KIEFHABER, T. (1999)  
Elementary Steps in Protein Folding  
Biol. Chem. Vol. 380, 923-929; 1999
- (22) BIERI, O. et al. (1999)  
The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer  
PNAS 96, pp. 9597-9601, 1999
- (23) BLAKE II, R.C. et al (2003)  
Allosteric Binding Properties of a Monoclonal Antibody and its Fab Fragment  
Biochemistry 42, 497-508; 2003

- (24) BOHR, CHR., HASSELBALCH, K. und KROGH, A. (1904)  
Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt  
Centralblatte für Physiologie Heft 23, 402-412, 1904
- (25) BONAVENTURA, C. et al (1994)  
Acrylamide in Polyacrylamide Gels can Modify Proteins during Electrophoresis  
Analytical Biochemistry 222, 44-48; 1994
- (26) BRENOWITZ, M., BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. (1984)  
Self-Association and Oxygen-Binding Characteristics of the Isolated Subunits of *Limulus polyphemus* Hemocyanin  
Arch. of Biochem. and Biophysics Vol. 230, No. 1, April, pp. 238-249; 1984
- (27) BRIDGES, C.R. (1990)  
Purines and their Interaction with other Factors Controlling Haemocyanin Oxygen Affinity  
Invertebrate Dioxygen Carriers; Leuven University Presss, 1990
- (28) BRIDGES, C.R. and MORRIS, S. (1986)  
Modulation of Haemocyanin Oxygen Affinity by L-Lactate; - a Role for other Cofactors  
Invertebrate Oxygen Carriers; Ed. by Bernt Linzen; 341-352  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1986
- (29) BRIDGES; C.R., MORRIS and GRIESHABER, M.K. (1984)  
Modulation of Haemocyanin Oxygen Affinity in the intertidal Prawn *Palaemon elegans* (Rathke)  
Respiration Physiology 57, 189-200; Elsevier; 1984
- (30) BRIDGES, C.R., LE ROUX, J.M. and VAN AARDT, W.J. (1997)  
Ecophysiological Adaptations to Dry Thermal Environments Measured in two Unrestrained Namibian Scorpions, *Parabuthus villosus* (Buthidae) and *Opisthophthalmus flavescens* Scorpionidae)  
Physiol. Zool. 70(2): 244-256; 1997
- (31) BROUWER, M., BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. (1982)  
Heavy Metal Ion Interactions with *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Structural and Functional Changes Induced by a Variety of Heavy Metal  
Biochemistry 1982, 21, 2529-2538; 1982
- (32) BROUWER, M. et al (1989)  
Allosteric Control in *Limulus polyphemus* Hemocyanin: Functional Relevance of Interactions between Hexamers  
Biochemistry 28: 8819-8827; 1989
- (33) BROWN, A.C. and TERWILLIGER, N.B. (1998)  
Ontogeny of Hemocyanin Function in the Dungeness Crab *Cancer magister* : Hemolymph Modulation of Hemocyanin Oxygen-Binding  
J. of Exp. Biol. 201, 819-826, 1998
- (34) BRUNORI, M. (1999)  
Hemoglobin is an honorary enzyme  
TIBS 24, pp. 158-161

- (35) BUBACCO, L. et al (1995)  
Structural Characterization of Mononuclear Cu(II) and Its Nitrite Complex in the Active Site of *Carcinus maenas* Hemocyanin  
Biochemistry 34, 1524-1533;1995
- (36) BUCCI, E. and FRONTICELLI, C. (1981)  
Measurement of the Bohr Effect Dependence on the pH of Oxygen Affinity of Hemoglobin  
Methods in Enzymology, Vol 76 1981
- (37) BUCCI, E. et al (1996)  
Positive and Negative Cooperativities at Subsequent Steps of Oxygenation Regulate the Allosteric Behavior of Multistate Sebacylhemoglobin  
Biochemistry 35, 3418-3425, 1996
- (38) BUCCI, E., GRYCYNski, Z., RAZYNSKA, A.. and KWANSA, H. (1998)  
Entropy-Driven Intermediate Steps of Oxygenation may Regulate the Allosteric Behavior of Hemoglobin  
Biophysical Journal Vol.74, 2638-2648; May 1998
- (39) BUGGE, J. and WEBER, R.E. (1999)  
Oxygen binding and its allosteric control in Hb of the pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata*  
Am. Physiol. Soc., R347-R356; 1999
- (40) BURGER, J.W. and SMYTHE, C.McC. (1953)  
The General Form of Circulation in the Lobster Homarus  
J. of Cell. And Comp. Phys. Vol. 42, 369-381, 1953
- (41) BURMESTER, T. and SCHELLER, K. (1996)  
Common Origin of Arthropod Tyrosinase, Arthropod Hemocyanin, Insect Hexamerin, and Dipteran Arylphorin Receptor  
J. Mol. Evol. 42; 713-728; 1996
- (42) BURNETT, L. E. et al (1988)  
Temperature Sensivity of Molluscan and Arthropod Hemocyanins  
Biol.Bull.174: 153-162; April,1988
- (43) CAMERON, J. N.and BATTERTON, C. (1978)  
Temperature and blood acid-base status in the blue crab, *Callinectes sapidus*  
Respiration Physiology 35, pp. 101-110; 1978
- (44) CAMERON, J.N. (1983)  
Enviromental Adaptations of the Respiratory System: Ventilation, Circulation, and Oxygen Transport  
The Biology of Crustacea:  
Enviromental Adaptions  
Academic Press 8: 43-63; 1983
- (45) CAMPOS, E. et al (1986)  
Distribution of Lipids and Apolipoproteins in Human Plasma by Vertical Spin Ultracentrifugation  
Arch. of Biochem. and Biophysics 249(2): 455-463; 1986

- (46) CARLSON, J.W. et al (1997)  
Imaging and Manipulation of High-Density Lipoproteins  
Biophysical J. 73: 1184-1189; 1997
- (47) CHAIRES, J.B. (1997)  
Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates  
Biophysical Chemistry 64, pp. 15-23, 1997
- (48) CHAUSSON, F. et al (2001)  
Structural and functional properties of hemocyanin from *Cyanagraea praedator*, a deep-sea hydrothermal vent crab  
Proteins 45, 351-359; 2001
- (49) CHILDRESS, J.J. and SEIBEL, B.A. (1998)  
Life at stable low oxygen levels: Adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers  
J. Exp. Biol. 201, 1223-1232, 1998
- (50) CHOI, W.E. et al (1996)  
Spectroscopic Evidence for Preexisting T- and R-State Insulin Hexamer Conformations  
Proteins: Struct. Funct. Gen. 26: 377-390; 1996
- (51) COLIN, R.A., MC KILLOP, K.P. and SYKES, A.G. (1993)  
Kinetics of equilibration of O<sub>2</sub> with *Panulirus interruptus* hemocyanin subunits a, b, & c  
Bioch. Biophys. Acta 1162 105-104; 1993
- (52) CUNNINGHAM, M. et al. (1999)  
Lipid binding capacity of spider hemocyanin  
J. of Exp. Zool. 284, pp. 368-373, 1999
- (53) DAINESE, E. et al (1998)  
Subunits composition and allosteric control in *Carcinus aestuarii* hemocyanin  
Eur. J. Biochem. 256, 350-358; FEBS 1998
- (54) DECKER, H. and TERWILLIGER, N. (2000)  
Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins  
J. Exp. Biol. 203, 1777-1782; 2000
- (55) DECKER, H. and STERNER, R. (1990)  
Hirachien in der Struktur und Funktion von sauerstoffbindenden Proteinen  
Naturwissenschaften 77, 561-568 (1990)
- (56) DECKER, H. (1981)  
Zur Quatärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne *E. californicum*.  
Dissertation 1981
- (57) DECKER, H. (1991)  
Nested Allostery of Arthropod Hemocyanins  
Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers by S.N. Ninogradov and O.H. Kapp, eds Springer-Verlag, N.Y., Berlin Heidelberg 1991
- (58) DECKER, H. and STERNER, R. (1990)  
Nested Allostery of Arthropodan Hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The Role of Protons



- (59) DECKER, H. et al (1988)  
Nested Allosteric Interaction in Tarantula Hemocyanin Revealed through the Binding of Oxygen and Carbon Monoxide.  
Biochemistry, 27, 1988
- (60) DECKER, H. et al (1989)  
Allosteric Oxygen-Binding Properties of Reassembled Tarantula (*Eurypelma californicum*) Hemocyanin with Incorporated Apo- or Met-Subunits  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler  
Vol.370 pp.511-523, 1989
- (61) DECKER, H. et al (1991)  
Hitzestabilität des Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*
- (62) DECKER, H. et al (1996)  
Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin  
FEBS Letters 393, 226-230 1996
- (63) DECKER, H (1990)  
Nested allostery in scorpion hemocyanin (*Pandinus imperator*)  
Biophysical Chemistry, 37 257-263, 1990
- (64) DELA-CRUZ, J. and MORRIS, ST. (1997)  
Respiratory, Acid-Base, and Metabolic Responses of the Christmas Island Blue Crab, *Cardisoma hirtipes* (Dana), during Simulated Environmental Conditions  
Physiol. Zool. 70(1): 100-115; 1997
- (65) DEPLEDGE, M.H. and BJERREGAARD, P. (1989)  
Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans  
Helgoländer Meeresuntersuchungen  
Helgoländer Meeresunters. 43, 207-223, 1989
- (66) DEVESCOVI, M. and LUCU, C. (1996)  
Copper levels during osmotic stress in the shore crab *Carcinus aestuarii*  
Comp. Biochem. Physiol. 115C(3), pp. 195-200, 1996
- (67) DI CERA, E. et al (1989)  
Carbon Monoxide and Oxygen Binding to Human Hemoglobin Fo  
Biochemistry 28: 2631-2638; 1989
- (68) DI PRISCO, G. et al (1991)  
Oxygen transport in extreme environments  
TIBS 16, pp. 471-474; December 1991
- (69) DOLASHKA-ANGELOVA, P. et al. (2003)  
Oligomeric stability of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) and its structural subunits  
Biochim. Biophys. Acta 1646, 77-85; 2003
- (70) DOLASHKA-ANGELOVA, P. et al. (1999)  
Spectroscopic properties of *Carcinus aestuarii* hemocyanin and its structural subunits  
Spectrochimica Acta Part A 55, pp. 2927-2934, 1999
- (71) DOLMAN, D. & GILL, S.J. (1978)  
Membrane-Covered Thin-Layer Optical Cell for Gas-Reaction Studies of Hemoglobin  
Analytical Biochemistry 87, 127-134; 1978

- (72) DOYLE, M.L. et al (1989)  
Temperature- and pH-dependence of oxygen-binding reaction of human fetal hemoglobin  
Biochem. J., 260, 617-619; 1989
- (73) EATON, W.A. et al (1996)  
Fast events in protein folding  
Minireview; Structure 4: 1133-1139 October 1996
- (74) EDELSTEIN, ST.J. and EDSALL, J.T. (1986)  
Linkage between ligand binding and the dimer-tetramer equilibrium in the Monod-Wyman-Changeux model of hemoglobin  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 83, pp. 3796-3800, June 1986
- (75) ELLIS, B.A. and MORRIS, S. (1995)  
Effects of pH on the physiology of the australian `Yabby` Cherax destructor: Acute and chronic changes in hemolymph carbon dioxide, acid-base and ionic status  
J. of Exp. Biol. 198: 395-407; 1995
- (76) ELLIS, B.A. and MORRIS, S. (1995)  
Effects of pH on the physiology of the australian `Yabby` Cherax destructor: Acute and chronic changes in hemolymph oxygen levels, oxygen consumption & metabolite levels  
J. of Exp. Biol. 198: 409-418; 1995
- (77) ESCHRICH, J. et al (1992)  
Zur Kopplung des Bindungsverhaltens von Hämocyanin gegenüber Protonen und O<sub>2</sub>  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 85: 139; 1992
- (78) FAGO, A. et al. (1997)  
The anodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*  
Molecular basis for allosteric effects in a Root-Effect hemoglobins  
J. of Biol. Chem. 272(25), pp. 15628-15635, 1997
- (79) FAGO, A. et al. (1997)  
Temperature-dependent enthalpy of oxygenation in antarctic fish hemoglobins  
Comp. Biochem. Physiol. 118(2), pp. 319-326, 1997
- (80) FARRELLY, C.A. and GREENAWAY, P. (1994)  
Gas exchange through the lungs and gills in air-breathing crabs  
J. of Exp. Biol. 187: 113-130; 1994
- (81) FINGERMAN, M. (1997)  
Crustacean Endocrinology: A Retrospective, Prospective, and Introspective Analysis  
Physiol. Zool. 73(3): 257-269; 1997
- (82) FORGUE, J., MASSABUAU, J.-C. and TRUCHOT, J.-P. (1992)  
When are resting water-breathers lacking O<sub>2</sub>? Arterial PO<sub>2</sub> at the anaerobic threshold in crab  
Resp. Physiol. 88, 247-256; 1992
- (83) FÖLL, R. et al (1993)  
Der Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoffbindung und Stabilität von Arthropodenhämocyanin  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 86.1: 88; 1993

- (84) FÖRSTER, T. (1949)  
Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie  
Zeitschr. für Nat.forsch. 4a, 321-327; 1949
- (85) FRAGKIADAKIS,G. and STRATAKIS,E. (1995)  
Characterization of Hemolymph Lectins in The Prawn *Parapenaeus longirostris*  
J. of Invert. Pathology, 65, 111-117; 1995
- (86) GIARDINA, B. et al (1992)  
The interplay of temperature and protons in the modulation of oxygen binding by squid blood  
sBiochem. J., 281, 725-728; 1992
- (87) GILL, S.J. (1981)  
Measurement of Oxygen Binding by Means of a Thin-Layer Optical Cell  
Methods in Enzymology, Vol. 76, 427-439; 1981
- (88) GILL, ST.J. et al (1986)  
Cooperative Free Energies for Nested Allosteric Models as Applied to Human Hemoglobin  
Biophys. J. Vol. 50, 747-752; October 1986
- (89) GILL, ST.J., DOYLE, M.L. and SIMMONS, J.H. (1989)  
Stabilization of the T-State of Hemoglobin  
Bioch. and Biophys. Res. Com. Vol. 165, No. 1, Pages 226-233; 1989
- (90) GOMEZ, J., HILSER, V.J., XIE, D. and FREIRE, E. (1995)  
The Heat Capacity of Proteins  
Proteins: Structure, Function and Genetics 22: 404-412, 1995
- (91) GRAHAM, R.A., MANGUM, C.P., TERWILLIGER, R.C. and TERWILLIGER, N.B. (1983)  
The Effect of Organic Acids on Oxygen Binding of Hemocyanin from the Crab *Cancer magister*  
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 74A, No. 1, pp. 45 to 50, 1983
- (92) GREENAWAY, P. (1976)  
The Regulation of Hemolymph Calcium Concentration of the Crab *Carcinus maenas*  
J. exp. Biol. 64, 149-157; 1976
- (93) GRUBMÜLLER, H. et al (1996)  
Ligand Binding: Molecular Mechanics Calculation of the Streptavidin-Biotin Rupture Force  
SCIENCE, Vol.271, 16 February 1996
- (94) GRYCZYNSKI, Z., BERETTA, S.,LUBKOWSKI, J., RAZYNSKA, A., GRYCZYNSKI, I.and BUCCI, E. (1997)  
Time-resolved fluorescence of hemoglobin species  
Biophysical Chemistry 64, 81-91, 1997
- (95) GRYCZYNSKI, Z., GERING, H. and BUCCI, E. (1998)  
Temperature Titration: A new Approach to the Thermodynamics of Oxygen Binding to Hemoglobin  
Analytical Biochemistry 255, 176-182, 1998

- (96) HAGERMAN, L. and VISMANN, B. (2001)  
Modulators of haemocyanin oxygen affinity in the hypoxia- and sulphide-tolerant Baltic isopod *Saduria entomon* (L.)  
J. Comp. Physiol. B 171, 695-699; 2001
- (97) HAGNER-HOLLER, S. et al (2004)  
A respiratory hemocyanin from an insect  
PNAS vol. 101, no. 3, 871-4; 2004
- (98) HARRIS, J.R. and MARKL, J. (1994)  
Electron microscopy and biochemical characterization of a 350-kDa annular hemolymph protein from the keyhole limpet *Megathura crenulata*  
Eur. J. Biochem. 225, 521-528; FEBS 1994
- (99) HARRIS, J.R. et al. (1995)  
Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH): Purification of Intact KLH1 Through Selective Dissociation of KLH2  
Micron, Vol.26, No. 3, pp 201-212, 1995
- (100) HARRIS, J.R. et al. (1995)  
Keyhole Limpet Haemocyanin: Negative Staining in the Presence of Trehalose  
Micron, Vol, No.1, pp. 25-33, 1995
- (101) HARRIS, J.R. et al. (1997)  
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), I: Reassociation from Immucothel followed by Separation of KLH1 and KLH2  
Micron, Vol.28, No. 1, pp 31-41, 1997
- (102) HARRIS, J.R. et al. (1997)  
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), II: Characteristic Reassociation Properties of Purified KLH1 and KLH2  
Micron, Vol.28, No. 1, pp 43-56, 1997
- (103) HARTMANN, H. and DECKER, H. (2002)  
All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4x6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation  
Bioch. et Biophys. Acta 1601, 132-137; 2002
- (104) HENRY, E.R., JONES, C.M., HOFRICHTER, J. and EATON, A. (1997)  
Can a Two-State MWC Allosteric Model Explain Hemoglobin Kinetics ?  
Biochemistry 36, 6511-6528; 1997
- (105) HIRAYAMA, Y. et al (1990)  
Lipid transfer particle in locust hemolymph: purification and characterization  
J. of Lipid Res. 31: 793-799; 1990
- (106) HOCHACHKA, P.W. et al (1996)  
Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack  
Proc.Nat. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 9493-9498, Sept 1996
- (107) HORIE, K. et al (1984)  
A Highly Sensitive Photometric Method for Proton Release or Uptake: Difference Protometry  
Analytical Biochemistry 137, 80-87; 1984

- (108) HÜBLER, R. et al (1998)  
On the stability of the 24-meric hemocyanin from *Eurypelma californicum*  
*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1383: 327-339; 1998
- (109) HRISTOVA, R. et al. (1997)  
Spectroscopic properties and stability of hemocyanins  
*Spectrochimica Acta Part A* 53, pp. 471-478, 1997
- (110) JACOBY, E. et al (1993)  
Distinction of Structural Reorganisation and Ligand Binding in the T <--> R Transition of Insulin on the Basis of Allosteric Models  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler*; Vol.374, pp. 877-885, September 1993
- (111) JAENICKE, E., WALSH, P.J. and DECKER, H. (2003)  
Isolation and characterization of haemoporphin, an abundant haemolymph protein from *Aplysia californica*  
*Biochem. J.* 375, 681-8; 2003
- (112) JAENICKE, R. (1996)  
How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability  
*Naturwissenschaften* 83 (Review), 544-554; 1996
- (113) JEFFREY, P.D. and TREACY, G.B. (1980)  
Hemocyanin from the Australian Freshwater Crayfish *Cherax destructor*.  
Oxygen Binding Studies of Major Components  
*Biochemistry*, 19, 5428-5433; 1980
- (114) JEKEL, P.A. et al (1988)  
*Panulirus interruptus* hemocyanin: The amino acid sequence of subunit b and anomalous behaviour of subunits a and b on polyacrylamid gel electrophoresis in the presence of SDS  
*Eur. J. Biochem.* 178, 403-412; FEBS 1988
- (115) JENTSCH, S. (1996)  
When proteins receive deadly messages at birth  
*SCIENCE*, Vol.271, 16 February 1996
- (116) JI, X., KARAVITIS, M., RAZYNSKA, A., KWANSA, H., VASQUEZ, G., FRONTICELLI, C., BUCCI, E. and GILLILAND, G.L. (1998)  
 $\alpha$ -Subunit oxidation in T-state crystals of a sebacyl cross-linked human hemoglobin with unusual autoxidation properties  
*Biophysical Chemistry* 70, 21-34, 1998
- (117) JOHNSON, B.A., BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. (1988)  
Allostery in *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Cooperative Oxygen Binding and Interaction with L-Lactate, Calcium and Protons  
*Biochemistry* 27, 1995-2001, 1988
- (118) JOHNSON, C.R., ANGELETTI, M., PUCCIARELLI, S. and FREIRE, E. (1996)  
Oxygen binding to fallow-deer (*Dama dama*) hemoglobin: stepwise enthalpies at pH 7.4  
*Biophysical Chemistry* 59, 107-117, 1996
- (119) JOHNSON, C.R., OWNBY, D.W., GILL, ST. J. and PETERS, K.S. (1992)  
Oxygen Binding Constants and Stepwise Enthalpies for Human and Bovine Hemoglobin at pH 7.6  
*Biochemistry* 31, 10074-10082; 1992

- (120) JOHNSON, L.N. et al (1990)  
Glycogen Phosphorylase: The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins  
J. of Biol. Chem. 265(5): 2409-2412; 1990
- (121) JOHNSTON, W. & BARBER, A. A. (1969)  
Reconstitution of the functional Hc from Apo-Hc: The Hepatopancreas as copper donor  
Comp.Biochem.Physiol. Vol. 28, pp. 1259-1273; 1969
- (122) KATAGIRI, CH. et al (1987)  
Small-angle X-ray Scattering Study of Insect Lipophorin  
J. of Biol. Chem. 262(33): 15857-15861; 1987
- (123) KATAGIRI, CH. et al (1991)  
Structure of Colorado Potato Beetle Lipophorin: Differential Scanning Calorimetric and Small-Angle X-ray Scattering Studies  
Biochemistry 30(40): 9675-9681; 1991
- (124) KAWABATA, SH-ICH and IWANAGA, S. (1999)  
Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab  
Devl. Comp. Im. 23, 391-400; 1999
- (125) KAWOOYA J.K. et aln (1984)  
Insect Apolipophorin III: Purification and properties  
J. of Biol. Chem. 259(17): 10733-10737; 1984
- (126) KISTER, J. et al (1988)  
Functional properties of hemoglobin in human red cells: II. Determination of the Bohr effect  
Respiration Physiology (1988) 73, pp. 363-378
- (127) KUIPER, A. et al (1979)  
The replacement of Calcium by Terbium as an alosteric effector of Hemocyanins  
FEBS Letters Vol. 99 No.2; 317-320; March 1979
- (128) KUIPER, H.A. et al (1980)  
Root Effect of *Panulirus interruptus* Hemocyanin  
Bioch. Biophys. Acta 626 412-416; 1980
- (129) KURTZ, D.M. Jr. (1999)  
Oxygen-carrying proteins: three common solutions to a common problem  
Essay in Biochemistry volume 34, 1999
- (130) KUSCHE, K., RUHBERG, H. and BURMESTER, T. (2002)  
A hemocyanin from Onychophora and the emergence of respiratory proteins  
Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 99 no. 16, 10545-10548; 2002
- (131) LADBURY, J.E. and CHOWDHRY, B.Z. (1996)  
Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions  
Chemistry & Biology, 3:791-801; October 1996
- (132) LALEZARI, I. et al (1990)  
New Effectors of Human Hemoglobin: Structure and Function  
Biochemistry 29: 1515-1523; 1990

- (133) LALLIER, F. and TRUCHOT, J.P. (1989)  
Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*  
Respiration Physiology, 77, 323-336; Elsevier; 1989
- (134) LALLIER, F.H. and TRUCHOT, J.-P.(1997)  
Hemocyanin Oxygen-Binding Properties of a Deep-Sea Hydrothermal Vent Shrimp:  
Evidence for a Novel Cofactor  
J. of exp. Zool. 277: 357-364, 1997
- (135) LAMY, J. et al (1990)  
Topological Mapping of 13 Epitopes on a Subunit of *Androctonus australis* Hemocyanin  
J. of Structural Biol. 103, 64-74; 1990
- (136) LEE, B., KUROCHKINA, N. and KANG, S.K. (1996)  
Protein folding by a biased Monte Carlo procedure in the dihedral angle space  
The FASEB Journal Vol. 10, 119-125, 1996
- (137) LEE, S.Y., LEE, B.L. and SÖDERHÄLL, K. (2003)  
Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish  
*Pacifastacus leniusculus*  
J. Biol. Chem Vol. 278, 7927-7933; 2003
- (138) LEIDESCHER, T. et al (1990)  
Conformational changes of tarantula (*Eurypelma californicum*) haemocyanin detected  
with a fluorescent probe 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole  
Eur. J. Biochem. 187, 617-625; FEBS 1990
- (139) LIPPITZ, M. et al (2002)  
Two-photon excitation microscopy of tryptophan containing proteins  
Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 99 no. 5; 2772-2777; 2002
- (140) LIU, Y. and STURTEVANT, J.M. (1997)  
Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. III  
Biophysical Chemistry 64, pp. 121-126, 1997
- (141) LOEWE, R. (1978)  
Hemocyanins in spiders  
V. Fluorimetric Recording of Oxygen Binding Curves, and its Application to the Analysis  
of Allosteric Interactions in *Eurypelma californicum* Hemocyanin
- (142) LUBZENS, E. et al (1997)  
Isolation and Characterization of the High-Density Lipoproteins from the Hemolymph  
and Ovary of the Penaeid Shrimp *Penaeus semisulcatus* ( de Haan): Apoproteins and  
Lipids  
J. of Exp. Zoology 278: 339-348; 1997
- (143) MADDALUNO, J. and FAULL, K.F. (1999)  
Mass spectrometric characterization of *Limulus polyphemus* hemocyanin  
Biochem. and Biophys. Reas. Commu. 264, pp. 883-890, 1999
- (144) MAGLIOZZO, R.S. et al (1995)  
Cu(II) Coordination in Arthropod and Mollusc Green Half-Methemocyanins Analyzed by  
Electron Spin-Echo Envelope Modulation Spectroscopy  
Biochemistry 34, 1513-1523; 1995

- (145) MAKINO, N. (1985)  
An oxygenation-linked dye binding to *Limulus polyphemus* hemocyanin  
Eur. J. of Biochem. (FEBS) 146, 563-569; 1985
- (146) MAKINO, N. (1986)  
Analysis of oxygen binding to *Panulirus japonicus* hemocyanin  
The effect of divalent cations on the allosteric transition  
Eur. J. Biochem. (FEBS) 154, 49-55; 1986
- (147) MAKINO, N. and KIMURA, S. (1988)  
Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin  
1. Isolation and properties  
Eur. J. Biochem. (FEBS) 173, 423-430; 1988
- (148) MAKINO, N. and KIMURA, S. (1988)  
Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin  
2. Cooperativity of the homogeneous hexamers  
Eur. J. Biochem. (FEBS) 173, 431-435; 1988
- (149) MAKINO, N. (1989)  
Hemocyanin from *Tachypleus gigas*.  
I. Oxygen-Binding Properties  
J. Biochem. 106, 418-422; 1989
- (150) MAKINO, N. and OHNAKA, H. (1993)  
Role of oligomeric interactions in the cooperativity of crayfish hemocyanin  
Bioch. Biophys. Acta 1162 237-245; 1993
- (151) MANGUM, C.P. and WEILAND, A.L. (1975)  
The Function of Hemocyanin in Respiration of the Blue Crab *Callinectes sapidus*  
J. of Exp. Zool. 193: 257-264
- (152) MANGUM, CH. P. (1991)  
Precambrian Oxygen Levels, the Sulfide Biosystem, and the Origin of the Metazoa  
J. of Exp. Zool. 260: 33-42; 1991
- (153) MANGUM, CH. P. (1993)  
Hemocyanin Subunit Composition and Oxygen Binding in Two Species of the Lobster  
Genus *Homarus* and their Hybrids  
Biol. Bull. 184: 105-113; 1993
- (154) MANGUM, CH. P. and GREAVES, J. (1996)  
Hemocyanins of the genus *Uca*: structural polymorphisms and native oligomers  
J. Exp. Marine Biology and Ecology 199, pp. 1-15, 1996
- (155) MARDEN, M.C. et al (1990)  
Effectors of Hemoglobin. Separation of allosteric and affinity factors  
Biophys. J. 57: 397-403; 1990
- (156) MARKEZICH, A.L. (1992)  
Seasonal respiratory metabolism of two sympatric araneid spiders  
Comp. Biochem. Physiol. Vol.104A, No3, pp. 561-564, 1993



- (157) MARKEZICH, A.L. (1992)  
Water loss and its relationship to respiratory metabolism in two sympatric araneid spiders *Argiope aurantia* and *Argiope trifasciata*  
Comp. Biochem. Physiol. Vol.104A, No.3, pp. 475-478, 1994
- (158) MARKL, J and DECKER, H. (1992)  
Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins  
Advances in Comparative and Environmental Physiology 13:
- (159) MARKL, J. (1980)  
Hemocyanins in Spiders  
XI. The Quaternary Structure of *Cupiennius* Hemocyanin  
J. Comp. Physiol. 140: 199-207; 1980
- (160) MARKL, J. et al (1981)  
Subunit Heterogeneity in Crustacean Hemocyanins as Deduced by Two-Dimensional Immunoelectrophoresis  
J. Comp. Physiol. 141: 495-502; 1981
- (161) MARKL, J. et al (1986)  
Evolution and Function of Structurally Diverse Subunits in the Respiratory Protein Hemocyanin from Arthropods  
Biol. Bull. 171: 90-115; 1986
- (162) MARTIN, J.L. et al (1990)  
Comparison of the Binding of Glucose 1-Phosphat Derivatives to T-State Glycogen Phosphorylase b  
Biochemistry 29: 10745-10757; 1990
- (163) McMAHON, B.R. (2001)  
Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans  
Resp. Physiol. 128, 349-364; 2001
- (164) MEISSNER, U. et al (2003)  
Quaternary Structure of the European Spiny Lobster (*Panulirus elephas*) 1x6-mer Hemocyanin from cryoEM and Amino Acid Sequence Data  
J. Mol. Biol. 325, 99-109; 2003
- (165) MEYER, D.F. et al (1995)  
Characterisation of the structure of polydisperse human low-density lipoprotein by neutron scattering  
Biochem. J. 310: 407-415; 1995
- (166) MEYER, D.F. et al (1996)  
Time-Course studies by synchrotron x-ray solution scattering of the structure of human low-density lipoprotein during Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation in relation to changes in lipid composition  
Biochem. J. 319: 217-227; 1996
- (167) MIKLAVC, A. (1996)  
Temperature-Nearly-Independent Binding Constant in Several Biochemical Systems  
The underlying entropy-driven binding mechanism and its practical significance  
Biochemical Pharmacology 51, pp. 723-729, 1996

- (168) MILLER, K. (1985)  
Oxygen Equilibria of *Octopus dofleini* Hemocyanin  
Biochemistry 24(17): 4582-4586; 1985
- (169) MOLON, A. et al (2000)  
Molecular heterogeneity of the hemocyanin isolated from the king crab *Paralithodes camtschaticae*  
Eur. J. Biochem. 267, 7046-7057; FEBS 2000
- (170) MORIMOTO, K. & KEGELES, G. (1971)  
Subunit interactions of lobster Hc  
I. Ultracentrifuge studies  
Archives of Biochemistry and Biophysics 142, pp. 247-257; 1971
- (171) MORRIS, S. (1988)  
Short Communication: Effects of Freezing on the function and Association State of Crustacean Hemocyanins  
J. exp. Biol. 138, 535-539, 1988
- (172) MORRIS, S. (1990)  
Organic Ions as Modulators of Respiratory pigment Function during Stress  
Physiological Zoology 63(2): 253-287, 1990
- (173) MORRIS, S. et al (1987)  
Response of haemolymph oxygen affinity to simultaneous salinity and oxygen stress in the intertidal prawn, *Palaemon elegans* (Rathke)  
Comp. Biochem. Physiol. Vol.90A, No.1, pp. 31-39, 1988
- (174) MORRIS, S. et al (1996)  
Air Breathing by the Purple Shore Crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). IV. Aquatic Hypoxia as an Impetus for Emersion? Oxygen Uptake, Respiratory Gas Transport, and Acid-Base State  
Physiol. Zoology 69(4): 864-886; 1996
- (175) MORRIS, S. et al (1996)  
Air Breathing by the Purple Shore Crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). III. Haemocyanin Function in Respiratory Gas Transport, and Acid-Base State  
Physiol. Zoology 69(4): 839-863; 1996
- (176) MOUCHE, F. et al. (1999)  
Structural comparison of Cephalopod hemocyanins: Phylogenetic Significance  
J. of Structural Biol. 127, pp. 199-212, 1999
- (177) NELSON, K. et al (1987)  
Photoperiod-induced changes in hemolymph vitellogenins in female Lobsters (*Homarus americanus*)  
Comp. Biochem. Physiol., Vol.90B, No.4, pp. 809-821, 1988
- (178) NGUYEN, N.Y. et al (1986)  
The Amino Acid Sequence of *Limulus* C-reactive Protein  
J. of Biol. Chem. Vol. 261, No.22, pp. 10456-10465; August 1986

- (179) NIES, A., ZEIS, B., BRIDGES, C.R. and GRIESHABER, M.K. (1992)  
Allosteric Modulation of Haemocyanin Oxygen-Affinity by L-Lactate and Urate  
in the Lobster *Homarus vulgaris*  
II. Characterization of Specific Effector Binding Sites  
J. Exp. Biol. 168, 111-124, 1992
- (180) NORFELD, P-I.P. et al (1981)  
Isolation and Partial Characterization of the Lipoprotein Families A and A-I from High-Density Lipoproteins of Human Serum  
Eur. J. Biochem. 118: 1-8; 1981
- (181) RYAN, R. (1994)  
The structures of insect lipoproteins  
Current Opinion in Structural Biology, 4: 499-506; 1994
- (182) PARODY-MORRALE, A., ROBERT, C.H., BISHOP, G.A. and GILL, S.J. (1986)  
Calorimetric Analysis of Oxygen Binding to Lobster Hemocyanin.  
Invertebrate Oxygen Carriers; Ed. by Bernt Linzen; 389-393  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1986
- (183) PATERAKI, L.E. and STRATAKIS, E. (1997)  
Characterization of Vitellogenin and Vitellin from Land Crab *Potamon potamios*.  
Identification of a Precursor in the Molecule  
The Journal of Exp. Zoology 279: 597-608; 1997
- (184) PATTEN, PH.A. et al (1996)  
The immunological evolution of catalysis  
SCIENCE, Vol.271; pp. 1086-1091, 23 February 1996
- (185) PAUL, R.J. et al (1994)  
Gas transport in the haemolymph of Arachnids  
I. Oxygen transport and the physiological role of haemocyanin  
J. of Exp. Biol. 188: 25-46; 1994
- (186) PELLEGRINI, M. et al (1999)  
Low-temperature sensitivity and enhanced Bohr effect in red deer (*Cervus elaphus*) Hb:  
a molecular adaptive strategy to life at high altitude and low temperature  
Eur. J. Biochem. 260, 667-671; FEBS 1999
- (187) PERBRANDT, M. et al (2003)  
The structure of a functional unit from the Wall of a gastropod hemocyanin offers a  
possible mechanism for cooperativity  
Biochemistry 42, 6341-6; 2003
- (188) PERLMANN, G.E. (1971)  
Potentiometric Titrations and Conformational Change  
Methods in Enzymology XXVI, pp. 413-423; 1971
- (189) PERTON, F.G. et al. (1997)  
Influence of antibody binding on oxygen binding behavior of *Panulirus interruptus* Hc  
FEBS Letters 408, pp. 124-126, 1997

- (190) PERTON, F.G. et al. (1996)  
Comparison of the three methods for competitive binding of monoclonal antibodies  
The localization of antigenic sites for monoclonal antibodies on *Panulirus interruptus* Hc  
J. Immunological Methods 190, pp. 117-125, 1996
- (191) PHILLIPS, J.W., MCKINNEY, R.J.W., HIRD, F.J.R. and MACMILLAN, D.L. (1977)  
Lactic Acid Formation in Crustaceans and the Liver Function of the Midgut Gland  
Questioned  
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 56B, pp. 427 to 433, 1977
- (192) PHILO, J.S. and LARY, J.W. (1990)  
Kinetic Investigations of the Quaternary Enhancement Effect and a/b Differences in  
Binding the Last Oxygen to Hemoglobin Tetramers and Dimers  
J. of Biol. Chem. 265(1): 139-143; 1990
- (193) POWERS, L.W. & BLISS, D.E. (1983)  
The Biology of Crustacea:  
Terrestrial Adaptations  
Environmental Adaptions  
Academic Press 8: 271-307; 1983
- (194) PRASSL, R. et al (1995)  
A Comparison of Structure and Thermal Behavior in Human Plasma Lipoprotein (a) and  
Low-Density Lipoprotein. Calorimetry and Small-Angle X-ray Scattering  
Biochemistry 34(11): 3795-3801; 1995
- (195) PRENDERGAST, F. G. (1991)  
Time-resolved fluorescence techniques: Methods and application in biology  
Current Opinion in Structural Biology 1991, 1: 1054-1059
- (196) PUPPIONE, D.L. (1986)  
Physicochemical study of rock crab lipoproteins  
Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 875: 563-568; 1986
- (197) RICARD, J. and CORNISH-BOWDEN (1986)  
Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on  
Eur. J. Biochem. 166, 255-272, 1987
- (198) RICCHELLI, F. et al (1980)  
Conformational Changes of *Carcinus maenas* Hemocyanin induced by Urea  
Arch. of Biochem. and Biophys. 202(1): 277-288; 1980
- (199) RICHELLI, F. et al (1993)  
Fluorescence properties of hemocyanin from tarantula (*Eurypelma californicum*): a  
comparison between the whole molecule and isolated subunits  
J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 17; 145-153; 1993
- (200) RICHEY, B., DECKER, H. and GILL, ST.J. (1985)  
Binding of Oxygen and Carbon Monoxide to Arthropod Hemocyanin: An Allosteric  
Analysis  
Biochemistry 24: 109-117; 1985
- (201) RIGGS, A.F. (1998)  
Self-Association, Cooperativity and Supercooperativity of Oxygen Binding by  
Hemoglobins  
J. of Exp. Biol. 201, 1073-1084, 1998

- (202) RIISTAMA, S. et al (1996)  
Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme  
Bioch. Biophys. Acta 1275 1-4; 1996
- (203) ROBERT, Ch.H. et al (1987)  
Nesting: Hierachies of allosteric interactions  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol. 84, pp1891-1895, April 1987
- (204) ROCHU, D. and FINE, J.M. (1984)  
The Molecular Weights of Arthropod Hemocyanin Subunits: Influence of Tris Buffer in SDS-Page Estimations  
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 79B. No. 1, pp. 41 - 45, 1984
- (205) ROCHU, D., LAMBIN, P., GHIDALIA, W. and FINE, J.M. (1978)  
Hemocyanin Subunits and their Polymeric Forms in Some Decapod Crustacea  
Biochem. Physiol., 1978. 59B, 117 to 122
- (206) ROGALA, A.. and GONDKO, R. (1981)  
Some Physico-Chemical Properties of *Astacus astacus* Hemocyanin  
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 68B. pp. 603 to 606, 1981
- (207) ROYER, W.E. Jr. et al. (2000)  
Structural hierachy in erythrocrucorin, the giant respiratory assemblage of annelids  
PNAS 97(13), pp. 7107-7111, 2000
- (208) RUSTENBECK, I. and LENZEN, S. (1996)  
A plug-in minielectrode for measurements in stirred photometric cuvettes  
J. Biochem. Biophys. Methods 31, pp. 105-112; 1996
- (209) RYAN, R.O. (1996)  
Structural studies of lipoproteins and their apolipoprotein components  
Biochemistry and Cell Biologie, 74(2), 155-169; 1996
- (210) RYAN, R.O. et al (1990)  
Studies of the morphology and structure of the plasma lipid transfer particle from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*  
J. of Lipid Res. 31: 871-879; 1990
- (211) SALVATO, B. et al (1989)  
The Oxidation of *Octopus vulgaris* Hemocyanin by Nitrogen Oxides  
Biochemistry 28, 680-684; 1989
- (212) SALVATO, B. et al (1998)  
The Enzymatic Properties of *Octopus vulgaris* Hemocyanin: o-Diphenol Oxidase Activity  
Biochemistry 37, 14065-14077; 1998
- (213) SANCHEZ, D. et al (1998)  
Molecular Characterization and Phylogenetic Relationships of a Protein with Potential Oxygen-Binding Capabilities in the Grasshopper Embryo. A Hemocyanin in Insects?  
Mol. Biol. Evol. 15(4): 415-426; 1998
- (214) SANDERS, N.K., ARP A.J. and CHILDRESS, J.J (1988)  
Oxygen binding characteristics of the hemocyanins of two deep-sea hydrothermal vent crustaceans  
Resp. Physiol. 71, 57-68; 1988

- (215) SANDERS, N.K. and CHILDRESS, J.J. (1990)  
Adaptation to the deep-sea oxygen minimum layer: Oxygen binding by the hemocyanin of the bathypelagic mysid, *Gnathophausia ingens* dohrn  
Biol. Bull. 178: 286-294, June 1990
- (216) SANDERS, N.K. et al (1991)  
Effects of ammonia, trimethylamine, L-lactate and CO<sub>2</sub> on some decapod crustacean Haemocyanins  
Comp. Biochem. Physiol. Vol.104A, No.3, pp.511-516, 1992
- (217) SANDERS, N.K. and CHILDRESS, J.J. (1992)  
Specific effects of thiosulphate and L-lactate on hemocyanin-O<sub>2</sub> affinity in a brachyuran hydrothermal vent crab  
Marine Biologie 113, 175-180; 1992
- (218) SCHARTAU, W. and LEIDESCHER, T. (1983)  
Composition of the hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*  
J. Comp Physiol. 152: 73-77; 1983
- (219) SCHELLMAN, J.A. (1997)  
Temperature, Stability, and the Hydrophobic Interaction  
Biophysical J. 73: 2960-2964; 1997
- (220) SCHINDLER, T. et al (1996)  
Thermodynamic Properties of an Extremely Rapid Protein Folding Reaction  
Biochemistry 35: 16833-16842; 1996
- (221) SCHWEITZER-STENNER, R. and DREYBRODT, W. (1989)  
An extended Monod-Wyman-Changeux-model expressed in terms of the Herzfeld-Stanley formalism applied to oxygen and carbonmonoxide binding curves of hemoglobin trout IV  
Biophys. J. Vol. 55 March, 691-701;1989
- (222) SELLOS, D. et al. (1997)  
Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects  
FEBS Letters 407, pp. 153-158, 1997
- (223) SENKBEIL, E.G. et al (1980)  
Catabolism of Hemocyanin in the american lobster, *Homarus americanus*  
Comp. Biochem. Physiol. Vol.69B, pp.781-790, 1981
- (224) SHAPIRO J.P. et al (1984)  
Structural Studies on Lipophorin, an Insect Lipoprotein  
J. of Biol. Chem. 259(6): 3680-3685; 1984
- (225) SHARP, K.A. (1991)  
The hydrophobic effect  
Current structural Biology, 1: 171-174; 1991
- (226) SICKHOLD, S. (1997)  
Lipophorin und Phasenpolymorphismus bei der Wüstenheuschrecke *Schistocera gregaria* (biochemische und elektronenmikroskopische Analysen)  
Dissertation

- (227) SIDELL, B.D. (1998)  
Intracellular Oxygen Diffusion: The Roles of Myoglobin and Lipid at Cold Body Temperature  
J. of Exp. Biol. 201, 1118-1127, 1998
- (228) SOULAGES, J.L. and WELLS, M.A. (1995)  
Lipophorin : The Structure of an Insect Lipoprotein and its Role in Lipid Transport in Insects  
Review, pp. 371-415
- (229) SOULAGES, J.L. et al (1991)  
Study on the composition-structure relationship of lipophorins  
J. of Lipid Res. 32: 407-415; 1991
- (230) SOULAGES, J.L. et al (1996)  
Role of Diacylglycerol and Apolipophorin-III in Regulation of the Physicochemical Properties of the Lipophorin Surface: Metabolic Implications  
Biochemistry 35(16): 5191-5198; 1996
- (231) SPICER, J.I. and Mc MAHON, B.R. (1990)  
Haemocyanin oxygen binding and the physiological ecology of range of talitroidean amphipods (Crustacea)  
II. Effect of freezing, inorganic ions, and urate on O<sub>2</sub> binding in vitro  
J. Comp. Physiol. B. 161: 217-223; 1991
- (232) STEDMAN, E. & STEDMAN, E. (1926)  
Part II: The influence of Hydrogen ion concentration on the Dissociation curve of the Oxyhaemocyanin from the blood of the common lobster (*Homarus vulgaris*)  
July 1926
- (233) STERNER, R & DECKER, H. (1994)  
Inversion of the Bohr effect upon oxygen binding to 24-meric tarantula haemocyanin (allostery/conformational transitions)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol.91: 4835-4839; 1994
- (234) STERNER, R. (1991)  
Allosterie bei Arthropoden-Hämocyaninen:  
Analyse der Bindung von O<sub>2</sub> und H<sup>+</sup>, sowie Nachweis von Konformationsübergängen  
Dissertation (August, 1991)
- (235) STERNER, R. et al (1991)  
Protonenfreisetzung bei der Sauerstoffbindung an Arthropoden- Hämocyanine:  
Kontinuierliche Messung des Haldane-Effektes und Verfolgung von Konformationsübergängen  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 84: 429-430 (1991)
- (236) STERNER, R. et al (1994)  
Tris: an allosteric effector of tarantula haemocyanin  
FEBS Letters 339: 37-39; 1994
- (237) STERNER, R. et al (1995)  
Extreme thermostability of tarantula haemocyanin  
FEBS Letters 364: 9-12 (1995)

- (238) STÖCKER, W. et al (1988)  
The quaternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits  
J. Comp. Physiol B 158: 271-289; 1988
- (239) STRATAKIS, E. and LINZEN, B. (1984)  
Carbonate Dehydratase (Carbonic Anhydrase) in a spider. Association with the hemolymph lipoprotein  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd.365; pp. 1187-1197, October 1984
- (240) STRATAKIS, E. et al (1992)  
Isolation and Characterization of a Non Sex-Specific Lipoprotein from Hemolymph of Fresh Water Crab *Potamon potamios*.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 373, pp. 665-677, August 1992
- (241) STRATAKIS, E. et al (1993)  
Purification and Properties of the Fatty Acid-Binding VHDL from the Hemolymph of the Spider *Eurypelma californicum*  
The J. of Exp. Zoology, 267: 483-492; 1993
- (242) STUART W.D. et al (1992)  
Structure and Stability of Apolipoprotein J-Containing High-Density Lipoproteins  
Biochemistry 31(36): 8552-8559; 1992
- (243) SULLIVAN, B., BONAVENTURA, J. and BONAVENTURA, C. (1974)  
Functional Differences in the Multiple Hemocyanins of the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus* L.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 71, No. 6, pp. 2558-2562, June 1974
- (244) SWERDLOW, R.D. et al (1996)  
Keyhole Limpet Hemocyanin: Structural and Functional Characterization of two Different Subunits and Multimers  
Cmp. Biochem. Physiol. 113B(3): 537-548; 1996
- (245) TAI, M. and KEGELES, G. (1975)  
Mechanism of the Hexamer-Dodecamer reaction of lobster Hc  
Biophysical Chemistry 3, pp. 307-315; 1975
- (246) TAMBURRINI, M. et al. (1998)  
The hemoglobins of the antarctic fishes *Artedidraco orianae* and *Pogonophryne*  
Amino acid sequence, lack of cooperativity, and ligand binding properties  
J. Biol. Chem. 273 (49), pp. 32452-32459, 1998
- (247) TAME, J.R. (1999)  
What is the true structure of liganded haemoglobin?  
TIBS 24, pp. 372-377, 1999
- (248) TERWILLIGER, N.B., DANGOTT, L. and RYAN, M. (1999)  
Cryptocyanin, a crustacean molting protein: Evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 2013-2018, March (Biochemistry); 1999
- (249) TERWILLIGER, N.B. (1998)  
Functional adaptations of oxygen-Transport Proteins  
J. Exp. Biol. 201, 1085-1098, 1998



- (250) TOPHAM, R. et al (1999)  
Disulfide Bond reduction: A powerful, chemical probe for the study of structure function relationships in the hemocyanins  
Arch. of Biochem. and Biophysics 261(2), pp. 261-266; 1999
- (251) TOPHAM, R.W. et al (1988)  
Active-Site Heterogeneity in *Limulus* Hemocyanin as Revealed by Reaction with Peroxides  
Arch. of Biochem. and Biophysics Vol. 261, No. 2, March, pp. 299-311; 1988
- (252) TOPHAM, R.W. et al (1998)  
Active-Site Disruption in Native *Limulus* Hemocyanin and Its Subunits by Disulfide-Bond Reductants: A Chemical Probe for the Study of Structure-Function Relationships in the Hemocyanins  
Arch. of Biochem. and Biophysics Vol. 352, No. 1, April, pp. 103-113; 1998
- (253) TRUCHOT, J.-P. (1975)  
Blood Acid-Base Changes During Experimental Emersion and Reimmersion of the Intertidal Crab *Carcinus maenas*  
Respiration Physiol. 23, 351-360, 1975
- (254) TRUCHOT, J.-P. (1980)  
Lactate Increases the Oxygen Affinity of Crab Hemocyanin  
J. of Exp. Zool. 214: 205-208, 1980
- (255) TRUCHOT, J.P.(1975)  
Factors Controlling the in Vitro and in Vivo Oxygen Affinity of the Hemocyanin in the Crab *Carcinus maenas* (L.)  
Respiration Physiology 24, 173-189  
North-Holland Publishing Company, Amsterdam; 1975
- (256) URICH (1990)  
Plasma- und Dotterproteine, metallbindende Proteine  
Vergleichende Biochemie der Tiere, Springer Verlag, S.163-194; 1990
- (257) VAN HOLDE, K.E., MILLER, K.I. and VAN OLDEN, E. (2000)  
Allostery in very large molecular assemblies  
Biophys. Chem. 86, 165-172; 2000
- (258) VAN HOLDE, K.E. et al (1985)  
Association-Dissociation Equilibria of *Octopus* Hemocyanin  
Biochemistry 24(17): 4577-4582; 1985
- (259) VERNBERG, F.J. (1983)  
The Biology of Crustacea:  
Respiratory Adaptations  
Environmental Adaptions  
Academic Press 8: 1-41; 1983
- (260) VERNBERG, W. B. et al (1983)  
The Biology of Crustacea:  
Freshwater Adaptations  
Environmental Adaptions  
Academic Press 8: 335-349; 1983

- (261) VORGER, P. (1999)  
Thermodynamic studies on oxygen binding by human red blood cells  
Comp. Biochem. Physiol. Part A 123, 329-336, 1999
- (262) WAHLER, W. u. BARNIKOL, W.K.R. (1975)  
Vergleichende Untersuchungen zwischen dem modifizierten Mikroverfahren nach Niesel und Thews u. der van Slyke-Methode zur Messung von O<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurven  
Pneumologie 152, 243-247; 1975
- (263) WALLACE, R.A. et al (1967)  
Crustacean Lipovitellin. Isolation and Characterization of the Major High-Density Lipoprotein from Eggs of Decapods  
Biochemistry 6(6): 1582-1590; 1967
- (264) WEERS, P.M.M. et al (1992)  
Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein  
J. of Lipid Res. 33: 485-491; 1992
- (265) WEILAND, A.L. and MANGUM, C.P. (1975)  
The Influence of Environmental Salinity on Hemocyanin Function in the Blue Crab, *Callinectes sapidus*  
J. of Exp. Zool. 193: 265-274; 1975
- (266) WEISS, J.N. (1997)  
The Hill equation revisited: uses and misuses  
FASEB J. 11: 835-841; 1997
- (267) WHITELEY, N.M. et al (2001)  
Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature  
Comp. Biochem. Physiol. Part A 128, 595-606; 2001
- (268) WILKENS, J.L., DAVIDSON, G.W. and CAVEY, M.J. (1997)  
Vascular peripheral resistance and compliance in the lobster *Homarus americanus*  
J. Exp. Biol. 200, 477-485, 1997
- (269) WITHERS, P.C. and SMITH, G.T. (1993)  
Effect of temperature on the metabolic rate and evaporative water loss of the scorpion *Urodacus armatus*  
J. therm. Biol. Vol. 18, No.1, pp 13-18, 1993
- (270) ZATTA, P. (1980)  
Protein-Lipid Interactions in *Carcinus maenas* (Crustaceae) Hemocyanin  
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 69B, pp 731-735, 1981
- (271) ZEIS, B., NIES, A., BRIDGES, C.R. and GRIESHABER, M. K. (1992)  
Allosteric Modulation of Haemocyanin Oxygen-Affinity by L-Lactate and Urate in the Lobster *Homarus vulgaris*  
J. Exp. Biol. 168, 93-110, 1992
- (272) ZEISS, B. (1994)  
Einfluss von Urat auf die funktionellen Eigenschaften von Hämocyanin  
Shaker Verlag (Diss.), ISBN 3-8265-0251-5, 1994

## 6 LITERATUR

---

- (273) ZHOU, G., HO, P.S. and VAN HOLDE, K.E. (1989)  
An analytic solution to the Monod-Wyman-Changeux model and all parameters in this model  
Biophys. J. Vol. 55, 275-280, 1989
- (274) ZIELINSKI, S., SATORIS, F.J. and PÖRTNER, H.O. (2001)  
Temperature Effects on Hemocyanin Oxygen Binding in an Antarctic Cephalopod  
BIO. Bull. 200, 67-76; 2001
- (275) ZOLLA, L., COLETE, M., DI CERA, E., GIARDINA, B. and KUIPER, H. (1986)  
Discrimination of tertiary and quaternary Bohr Effect in the O<sub>2</sub> Binding of *Helix pomatia*  
β-Hemocyanin  
Biophysical Chemistry 24, 319-325, 1986
- (276) ZORN, U. et al (1998)  
Kapillarelektrophoretische Differenzierung von Lipoproteinen  
Evaluation cholesterin- und triglyceridspezifischer Derivatisierungsverfahren für die  
Lipoproteindiagnostik  
Diagnostik Digest 22-26; 1998

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstroem
AST	<i>Astacus astacus</i>
CAL	<i>Calappa granulata</i>
Da	Dalton
DSC	Differential-Scanning_Calorimetry
$E_{278}$ ( $\epsilon_{278}$ )	spez. Extinktionskoeffizient bei 278nm
EM	Elektronen-Mikroskop(ie)
ESR	Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie
EURY	<i>Eurypelma californicum</i>
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
HC	Hämocyanin
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hämolymphe
$k_1$	Bindungskonstante für das <u>erste</u> Molekül
$k_N$	Bindungskonstante für das <u>letzte</u> Molekül
kDa	Kilo Dalton
KNF-Modell	Modell von Koshland, Némethy & Filmer
L	Gleichgewichtskonstante im MWC-Modell
MWC-Modell	Modell von Monod, Wyman & Changeux
$M_r$	Molekulargewicht
$N_{Hill}$	Hill-Koeffizient
NRP	Nicht-Respiratorisches-Protein
OD	Optische Dichte
$p_{50}$	Partialdruck bei Halbsättigung
$pO_2$	Sauerstoff-Partialdruck
PAGE	Poly-Acylamid-Gel-Elektrophorese
PAN	<i>Panulirus interruptus</i>
PARA	<i>Paralithodes Camtschatica</i>
POT	<i>Potamon potamios</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SEC	Size-Exclusion-Chromatography
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
Torr	1Torr=133,322 Pa
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultra-Violett
VHDL	Very High Density Lipoprotein
VIS	sichtbares Licht

## 8 Lebenslauf

### Zur Person

Werner Conze  
geb. am 26.04.1964 in Paderborn  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Wohnort: 73765 Neuhausen auf den Fildern  
verheiratet, 2 Kinder

### Ausbildung/Dienste

#### Schulbildung

1970 - 1974	Grundschule in Kassel
1974 - 1981	Realschule in Kassel <i>Abschluss:</i> Mittlere Reife
1981 - 1985	Gymnasium in Kassel <i>Abschluss:</i> Allg. Hochschulreife

#### Wehrdienst

1985 – 1986	in Weingarten (Internationale Fernspähschule), Altenstadt (Luftlande- und Transportschule ) und Fritzlar (Fernspähkompanie)
-------------	---

#### Berufsausbildung

1986 - 1988	Höhere Berufsfachschule für Technische Assistenten in Olsberg (NRW) <i>Abschluss:</i> Biologisch Technischer Assistent
-------------	--

#### Hochschulstudium

1988 - 1995	Biologie an der Universität Mainz Prüfungsfächer: Biochemie, Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie, Geographie Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Chemie; Abt. Biogeochemie bei Prof. Dr. Jürgen Kesselmeier <i>Abschluss:</i> Diplom-Biologe
seit Juni 1995	Promotion am Institut für Molekulare Biophysik der Universität Mainz bei Prof. Dr. Heinz Decker Schwerpunkt: Struktur-Funktionsbeziehungen großer Proteine

### Berufstätigkeit

BIOSCIENTIA GmbH, Ingelheim 17.07.89 – 30.09.91	Laborassistent im RIA-Labor
DAHEIM GmbH, Mainz 17.06.93 – 30.06.95	Zeitschriften Lieferservice
MPI für Chemie, Mainz 01.01.94 – 28.02.95	wiss. Mitarbeiter Abt. Biogeochemie
UNIVERSITÄT MAINZ 01.06.1995 – 31.03.2000	wiss. Mitarbeiter Institut für Molekulare Biophysik
TOSOH BIOSCIENCE GmbH, Stuttgart seit dem 15.09.2000	techn./wiss. Kundendienst, QM