

“ Aktivierung von Hämocyanin zur Tyrosinase ”

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades

**"Doktor der
Naturwissenschaften"**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**Dorothea Nillius
geboren in Wiesbaden**

Mainz, März 2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Respiratorische Proteine	7
1.1.1	Arthropoden-Hämocyanin	8
1.1.2	Struktur des Hämocyanins der Spinne <i>Eurypelma californicum</i>	10
1.1.3	Struktur des Hämocyanins des Skorpions <i>Pandinus imperator</i>	10
1.1.4	Mollusken-Hämocyanin	11
1.2	Phenoloxidasen, Tyrosinasen und Catecholoxidasen	12
1.2.1	Struktur der Tyrosinasen und Catecholoxidasen	13
1.2.2	Mechanismus der Tyrosinase und Catecholoxidase	15
1.3	Funktion der Arthropoden-Phenoloxidasen	16
1.4	Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin	16
1.5	Immunsystem	18
1.5.1	Immunsystem der Invertebraten	18
1.5.1.1	Zelluläre Immunantwort	18
1.5.1.2	Humorale Immunantwort	18
1.5.2	Immunsystem der Cheliceraten	21
1.6	Ziele der Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODE	27
2.1	Abkürzungen	27
2.2	Chemikalien	28
2.3	Puffer und Lösungen	29
2.4	Mikroorganismen	29
2.5	Antikörper	30
2.6	Tiere und Tierhaltung	30
2.6.1	Skorpion	31
2.6.2	Vogelspinne	31
2.6.3	Pfeilschwanzkrebs	31
2.6.4	Heuschrecke	31
2.7	Gewinnung der Hämolymphe und Gelfiltration	31
2.8	Dissoziation und Dialyse	32
2.9	Proteinfällung	32
2.10	Konzentration von Proteinproben	33
2.11	Zentrifugation	33
2.11.1	Tischzentrifugen	33
2.11.2	Analytische Ultrazentrifuge	33

2.12	Spektroskopie	34
2.12.1	Absorptionsspektroskopie	34
2.12.2	Fluoreszenzspektroskopie	35
2.12.3	Circulardichroismusspektroskopie	35
2.12.4	Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie	36
2.13	Gelelektrophorese	36
2.13.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.13.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	38
2.13.3	Gradientengele	38
2.13.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	38
2.14	Immunelektrophorese	40
2.15	Western Blot	41
2.16	Anfärben von Proteinen nach Gelelektrophorese	42
2.16.1	Coomassie-Färbung	42
2.16.2	Silberfärbung	43
2.17	Nachweismethoden für Phenoloxidasen	44
2.17.1	Dopachrom-Assay	45
2.17.2	MBTH-Assay	45
2.17.3	Anfärben von Phenoloxidasen nach Gelelektrophorese	46
2.17.4	Dot Blot zum Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität	46
2.18	Hämocyanin-Aktivierung durch SDS	46
2.18.1	Stabilität von Hämocyanin gegenüber SDS	46
2.18.2	Aktivierung von Hämocyanin: Spektroskopische Messungen	48
2.19	Vesikelherstellung aus Liposomen	50
2.20	Dynamische Lichtstreuung	50
2.21	Nachweis der Lysozym-Aktivität	52
2.22	Azocoll-Assay zum Nachweis von Protease-Inhibitoren	52
2.23	Agglutinierung von Schaferythrocyten	53
2.24	Berechnung der kritischen micellären Konzentration (CMC)	53
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Physikochemische Charakterisierung von <i>Pandinus imperator</i>-Hämocyanin	55
3.1.1	Reinigung durch Größenausschlusschromatographie (SEC)	55
3.1.2	Elektronenmikroskopie und dynamische Lichtstreuung	57
3.1.3	Analytische Ultrazentrifugation	58
3.1.4	Gelchromatographie	59
3.1.5	Absorptionsspektroskopie	61
3.1.6	Fluoreszenzspektroskopie	62
3.1.7	Circulardichroismus	64
3.1.8	Einfluss von Magnesium- und Calcium-Ionen auf das Hämocyanin-Oligomer	66
3.2	Untereinheiten von <i>Pandinus imperator</i>-Hämocyanin	70
3.2.1	Dissoziation von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin	70
3.2.2	Trennung der Hämocyanin-Untereinheiten	71
3.2.3	Zweidimensionale Immunelektrophorese	77
3.3	Stabilität von Hämocyanin	81
3.3.1	Bestimmung der Thermostabilität	81
3.3.1.1	Bestimmung der Thermostabilität mittels Fluoreszenzspektroskopie	81

3.3.1.2	Bestimmung der Thermostabilität von Sekundärstrukturelementen	83
3.3.2	Stabilität gegenüber Detergenzien	84
3.3.2.1	Stabilität gegenüber SDS in geringen Konzentrationen	85
3.3.2.1.1	Stabilität von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin gegenüber SDS	85
3.3.2.1.2	Stabilität von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin gegenüber SDS mit MgCl ₂	87
3.3.2.1.3	Stabilität von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin gegenüber SDS mit CaCl ₂	89
3.3.2.1.4	Stabilität von <i>E. californicum</i> -Hämocyanin gegenüber SDS	90
3.3.2.1.5	Stabilität von <i>Pandinus imperator</i> -Dissoziat gegenüber SDS	91
3.3.2.1.6	Stabilität von <i>E. californicum</i> -Hämocyanin Dimer bc	92
3.3.2.2	Stabilität gegenüber SDS in höheren Konzentrationen	93
3.3.2.3	Stabilität gegenüber Guanidin	94
3.3.2.4	Stabilität in Borat-Puffer mit Harnstoff und Methanol	95
3.4	Enzymatische Aktivität von Hämocyanin	98
3.4.1	Phenoloxidase-Aktivität von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	100
3.4.2	Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität in der nativen PAGE	103
3.4.3	Aktivität der isolierten Untereinheiten	106
3.4.4	Geschwindigkeit der Farbentwicklung	108
3.4.5	Weitere Nachweismethoden für die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin	108
3.4.5.1	Spektroskopie	108
3.4.5.2	Dynamische Lichtstreuung	112
3.4.5.3	Visuelle Beurteilung	113
3.4.6	Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität bei anderen Hämocyaninen	113
3.4.7	Substrate für den Nachweis der Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin	116
3.4.7.1	Substratspezifität der Phenoloxidase von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	117
3.4.7.2	Substratspezifität der Phenoloxidase von <i>E. californicum</i> -Hämocyanin	119
3.5	Enzymatische Aktivität in verschiedenen Hämocyanin-Präparationen	122
3.5.1	Intensität der enzymatischen Aktivität	122
3.5.2	Beginn der enzymatischen Aktivität	124
3.6	Aktivierung der enzymatischen Aktivität	126
3.6.1	Aktivatoren der Phenoloxidase	126
3.6.1.1	Überprüfung verschiedener Aktivatoren	126
3.6.1.2	Untersuchungen mit dem Aktivator CPC	128
3.6.1.2.1	Gelelektrophoretische Untersuchungen mit dem Aktivator CPC	128
3.6.1.2.2	Photometrische Untersuchungen mit dem Aktivator CPC	129
3.6.1.3	Aktivierung durch Liposomenvesikel	131
3.6.2	Optimierung der Aktivierungsbedingungen	131
3.7	Stabilität des aktiven Zentrums – Überprüfung durch enzymatische Aktivität	134
3.7.1	Substratumsatz durch <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin	134
3.7.2	Substratumsatz durch <i>Eurypelma californicum</i> -Hämocyanin	136
3.8	Effektoren der enzymatischen Aktivität	140
3.8.1	Puffer	140
3.8.1.1	Vorversuche und elektrophoretische Untersuchungen	140
3.8.1.2	Photometrische Untersuchungen	142
3.8.1.2.1	<i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin	142
3.8.1.2.2	<i>Eurypelma californicum</i> -Hämocyanin	143
3.8.2	pH-Wert	144
3.8.3	Metallionen	147
3.8.3.1	Einfluss von Magnesium auf die Aktivität von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	148
3.8.3.2	Einfluss von Calcium auf die Aktivität von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	151
3.8.3.3	Einfluss von Natrium und Kalium auf <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	152
3.8.3.4	Phenoloxidase-Aktivität von <i>Limulus polyphemus</i> -Hämocyanin	154

3.8.3.5	Phenoloxidase-Aktivität von <i>Eurypelma californicum</i> -Hämocyanin	156
3.8.3.5.1	Magnesium bei der Phenoloxidase-Aktivität von <i>E. californicum</i>	156
3.8.3.5.2	Kalium und Natrium bei der Phenoloxidase-Aktivität von <i>E. californicum</i>	158
3.8.3.6	Diphenoloxidase-Aktivität von <i>P. imperator</i> -Untereinheiten	159
3.8.3.7	Diphenoloxidase-Aktivität von <i>E. californicum</i> -Untereinheiten	159
3.8.3.7.1	Hämocyanin-Dissoziat	159
3.8.3.7.2	Hämocyanin-Dimer <i>bc</i>	160
3.9	Regulation von Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität	163
3.9.1	Einfluss von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität	163
3.9.2	Gemeinsamer Tyramin- und Dopaminumsatz von Hämocyanin	165
3.9.2.1	<i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin	166
3.9.2.2	<i>Eurypelma californicum</i> -Hämocyanin	167
3.9.3	Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin	169
3.9.3.1	Tris-Phosphat-Switch von Hämocyanin	169
3.9.3.2	Regulation der Phenoloxidase durch Mg^{2+}	171
3.9.3.2.1	Regulation der Monophenolhydroxylase durch Zugabe von Mg^{2+}	172
3.9.3.2.2	Regulation der Monophenolhydroxylase durch Entfernen von Mg^{2+}	173
3.9.4	Phenoloxidase-Aktivität ohne Aktivator	174
3.9.4.1	Aktivierung der Phenoloxidase ohne SDS — mit Mg^{2+}	174
3.9.4.2	Aktivierung der Phenoloxidase ohne SDS — mit Ca^{2+}	175
3.9.5	Veränderungen am Hämocyanin zur Phenoloxidase-Aktivität	176
3.9.5.1	Absorption, Fluoreszenz und CD-Spektren von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin in verschiedenen Puffer-Medien	176
3.9.5.2	Absorption und Fluoreszenz beim Tyraminumsatz von Hämocyanin	179
3.10	Immunabwehr der Cheliceraten	182
3.10.1	Lysozym	182
3.10.2	Lektine	186
3.10.3	Protease-Inhibitoren	186
3.10.4	Antimikrobielle Fragmente aus Hämocyanin	189
3.10.5	Immunstimulation zum Nachweis antimikrobieller Peptide	191
3.10.5.1	Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen	192
3.10.5.2	Hämolymp- Proteine — Western Blot	193
3.10.5.3	Hämolymp- Proteine — Zweidimensionale Gelelektrophorese	194
4	DISKUSSION	197
4.1	Aufbau und physikochemische Charakterisierung von <i>Pandinus imperator</i>-Hämocyanin	197
4.1.1	Größe, Form und Dimension der Hämolymp- Proteine	197
4.1.1.1	Nichtrespiratorisches Protein	197
4.1.1.2	Hämocyanin	198
4.1.2	Spektroskopisches Verhalten	199
4.1.2.1	Absorptionsspektroskopie	199
4.1.2.2	Fluoreszenzspektroskopie	200
4.1.2.3	Circulardichismus	203
4.1.3	Aufbau des <i>P. imperator</i> -Hämocyanins aus Untereinheiten	203
4.1.3.1	Dissoziation des Hämocyanins	204
4.1.3.2	Trennung der Untereinheiten	204
4.1.3.3	Identifizierung der Untereinheiten mit verschiedenen elektrophoretischen Methoden	206

4.2	Enzymatische Aktivität von Hämocyanin	213
4.2.1	Enzymatische Aktivität in verschiedenen Hämocyanin-Präparationen	215
4.2.2	Enzymatisch aktive Untereinheiten	216
4.2.3	Aktivierung der enzymatischen Aktivität	219
4.2.3.1	Substrate der Phenoloxidase	219
4.2.3.2	Aktivatoren der Phenoloxidase	222
4.2.3.3	Optimierung der enzymatischen Aktivität	224
4.2.4	Effektoren der enzymatischen Aktivität	225
4.2.4.1	Einfluss von Puffer auf die enzymatische Aktivität	225
4.2.4.2	Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität	227
4.2.4.3	Einfluss von Ionen auf die enzymatische Aktivität	228
4.2.4.3.1	Ionen-Zusammensetzung der Hämolymphe	228
4.2.4.3.2	Einwertige Ionen – Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität	229
4.2.4.3.3	Zweiwertige Ionen – Diphenoloxidase-Aktivität	229
4.2.4.3.4	Zweiwertige Ionen – Monophenolhydroxylase-Aktivität	233
4.3	Stabilität	235
4.3.1	Thermostabilität	235
4.3.2	Stabilität gegenüber Detergenzien und enzymatische Kontrolle der Funktionalität	236
4.3.2.1	Stabilität und Funktionalität von nativem <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	237
4.3.2.2	Stabilität und Funktionalität von nativem <i>E. californicum</i> -Hämocyanin	240
4.3.2.3	Stabilität und Funktionalität von <i>P. imperator</i> -Dissoziat und <i>E. californicum</i> -Dimer bc	242
4.4	Regulation der Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität	245
4.4.1	Einfluss von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität	247
4.4.2	Gemeinsamer Umsatz der Substrate Tyramin und Dopamin	248
4.4.3	Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin	249
4.4.3.1	Regulation der Aktivität durch den Puffer	249
4.4.3.2	Regulation der Aktivität durch zweiwertige Kationen	250
4.4.3.3	Wirkung des Substrats	251
4.4.3.4	Veränderungen am Hämocyanin zur Aktivierung der Phenoloxidase	252
4.5	Immunabwehr der Cheliceraten	253
4.5.1	Lysozym	255
4.5.2	Lektin	255
4.5.3	Protease-Inhibitoren	257
4.5.4	Antimikrobielle Fragmente aus Hämocyanin	258
4.5.5	Immunstimulation zum Nachweis antimikrobieller Peptide	259
5	ZUSAMMENFASSUNG	263
6	LITERATUR	269
7	DANKSAGUNG	305
8	LEBENS LAUF	307

1 EINLEITUNG

Die Arthropoden stellen den arten- und erfolgreichsten Tierstamm dar, der fast alle Lebensräume zu Lande, zu Wasser und in der Luft besiedelt hat.

Eine wichtige physiologische Anpassung an diese unterschiedlichen Habitate stellt die Entwicklung eines Sauerstoff-Transportsystems dar. Ab einer gewissen Körpergröße kann eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung nicht mehr allein durch Diffusion gewährleistet werden. Zirkulierende Körperflüssigkeiten und respiratorische Proteine stellen eine schnelle Sauerstoffaufnahme und seine Verteilung im Organismus sicher.

Bei zahlreichen Proteinen in Flora und Fauna ist der Einbau von Metallatomen für die Funktion wichtig. Hier sind vor allem Eisen und Kupfer zu erwähnen, die aufgrund ihrer verschiedenen stabilen Oxidationszustände oftmals an Prozessen des Elektronenaustausches oder in der Katalyse des Elektronentransfers beteiligt sind. Bekannterweise sind beide Metalle auch essentiell am Sauerstofftransport und der Sauerstoffspeicherung beteiligt.

Neben einer ausreichenden Versorgung des Organismus mit Sauerstoff ist seine Verteidigung gegen Feinde und Krankheiten essentiell. Die Arthropoden schützen ihren Körper hierfür durch ein Exoskelett aus Protein und Chitin, das mechanischen Halt gibt, und bei den Crustaceen durch die Einlagerung von Kalk noch verstärkt wird. Gleichzeitig bildet das Exoskelett die erste Barriere gegenüber pathogenen Keimen.

1.1 Respiratorische Proteine

Bei den Sauerstoff-Transportmolekülen handelt es sich um Metalloproteine, die Sauerstoff reversibel an ein Metallatom binden, das im aktiven Zentrum des Proteins liegt. Die Oxygenierungszustände des Metallatoms verleihen dem respiratorischen Pigment in der Regel eine charakteristische Farbe.

Das bei den Vertebraten und zahlreichen Invertebraten vorherrschende Sauerstoff-Transportprotein ist das Hämoglobin. Es ist in Blutzellen eingeschlossen oder frei in der Transportflüssigkeit gelöst. Als Zentralatom besitzt es ein zweiwertiges Eisen, das in einem Porphyrinring eingeschlossen ist und mit diesem zusammen das aktive Zentrum, die sogenannte Häm-Gruppe, bildet.

Ein ebenfalls eisenhaltiges respiratorisches Protein ist das frei in der Transportflüssigkeit gelöste Hämythrin (einigen Brachiopoden, Priapuliden, Sipunculiden und Anneliden), bei dem zwei Eisen-Atome direkt über Histidinreste an die Polypeptidkette gebunden sind.

Auch das Chlorocruorin ist ein Hämprotein, dessen Eisen in einem Porphyrinring mit leicht veränderten Seitenketten gebunden ist und extrazellulär bei einigen Polychaeten vorkommt ^[1].

Die respiratorischen Proteine von vielen Mollusken und Arthropoden sind die Hämocyanine mit Kupfer als zentralem Metallatom. Sie sind frei in der Hämolymphe gelöst und bilden multimeren Proteinkomplexe mit Molekulargewichten zwischen 450 kDa und 10 MDa ^[2].

Bis auf diese Gemeinsamkeiten des aktiven Zentrums zeigen sich in der Sequenz und vor allem in den Quartärstrukturen der Hämocyanine von Mollusken und Arthropoden deutliche Unterschiede ^[3, 4]. Tatsächlich zeigen statistische Analysen signifikante Unterschiede in den Sequenzen der Hämocyanine beider Tierstämme ^[5]. Die Hämocyanine von Mollusken und Arthropoden sind, wenn überhaupt, nur sehr entfernt miteinander verwandt ^[6].

1.1.1 Arthropoden-Hämocyanin

Die Superfamilie der Arthropoden-Hämocyanine umfasst insgesamt fünf Protein-Klassen, die Sequenzähnlichkeiten aufweisen, sich in ihren Funktionen jedoch deutlich unterscheiden ^[4, 6, 7]. Außer den Sauerstoff-Transportproteinen ^[2, 8-10] gehören auch die nichtrespiratorischen Pseudo-Hämocyanine der Crustaceen ^[11, 12], die Hexamerine der Insekten, die Hexamerin-Rezeptoren und die Phenoloxidasen der Arthropoden zu dieser Familie ^[6].

Eine Arthropoden-Hämocyanin-Untereinheit (Abbildung 1a) hat eine Masse von circa 75 kDa. Diese nierenförmige Untereinheit ist durch drei Domänen mit unterschiedlichen Faltungsmotiven charakterisiert ^[2, 10, 13]. Die N-terminale Domäne I wird aus sechs bis sieben α -Helices gebildet ^[10, 14]. Domäne II besteht ebenfalls zum größten Teil aus α -Helices ^[10, 13] und enthält das aktive Typ 3-Kupferzentrum mit den beiden Metallatomen. Die C-terminale Domäne III wird aus einem siebensträngigen β -Barrel gebildet.

Das aktive Zentrum der Hämocyanine (Abbildung 1b) besteht aus zwei Kupfer-Atomen, zwischen denen ein Sauerstoffmolekül in einer $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Koordination reversibel gebunden werden kann ^[15]. Die Metallatome werden von sechs Histidinen koordiniert, die in einem Bündel aus zwei antiparallelen Paaren aus α -Helices verankert sind ^[13-15].

Dieser Sauerstoff-Kupfer-Komplex verleiht oxygeniertem Hämocyanin eine tiefblaue Farbe, während deoxygeniertes Hämocyanin farblos ist.

Die Hämocyanin-Untereinheiten lagern sich artspezifisch zu Hexameren oder Vielfachen davon zusammen. Es finden sich 6-mere, 12-mere, 24-mere und 48-mere, seltener finden sich bei den Myriapoden auch 36-mere ^[6, 10, 16]. Bei einigen Tierarten existiert nur eine bestimmte oligomere Form in der Hämolymphe, bei anderen Arten sind mehrere verschieden große Aggregate nachzuweisen. Die Anzahl der verschiedenen Untereinheiten nimmt mit der Größe der Hämocyanin-Aggregate zu ^[2, 10].

Diese Zusammenlagerung zahlreicher Sauerstoff-bindender Untereinheiten führt zu einer veränderten Affinität zu dem Liganden Sauerstoff ^[17, 18], denn die Bindungsstärke eines Liganden hängt davon ab, wie viele der restlichen Untereinheiten bereits einen Liganden tragen. Die Sauerstoffaffinität des respiratorischen Moleküls verändert sich während der

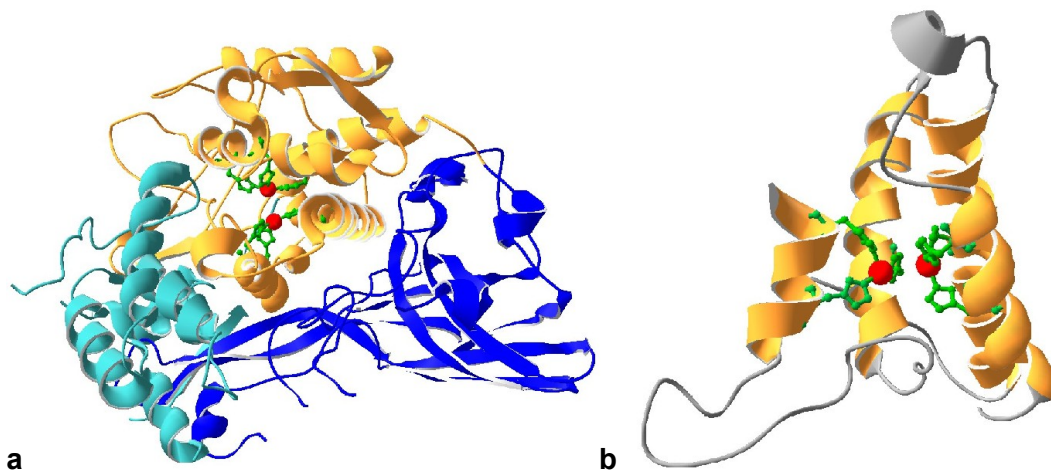


Abbildung 1: Struktur von Arthropoden-Hämocyanin.

a Tertiärstruktur einer Hämocyanin-Untereinheit des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Die N-terminale, erste Domäne (cyan) ist vorwiegend aus α -Helices aufgebaut. Die zweite Domäne (gelb), die ebenfalls hauptsächlich als α -Helices besteht, enthält das aktive Zentrum mit den beiden Kupfer-Atomen (rot). Die dritte Domäne (blau) besteht zum größten Teil aus Immunglobulin-ähnlichen β -Faltblättern.

b Das aktive Zentrum der Arthropoden-Hämocyanine ist ein Typ 3-Kupferzentrum: Zwei Kupfer-Atome (rot) werden von sechs Histidinen (grün) koordiniert, die zu einem „four α -Helix bundle“ (gelb) gehören. Dargestellt ist ein Zentrum des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* in der oxy-Form ^[15].

Bindung und führt zu einer gesteigerten Affinität der noch unbesetzten Bindungsstellen. Diese Wechselbeziehung zwischen Sauerstoffbeladung und Konformation existiert bei allen respiratorischen Pigmenten und wird als Kooperativität bezeichnet.

Zur Beschreibung der Kooperativität bei oligomeren Proteinen und Untersuchung ihres allosterischen Bindungsverhaltens existieren zwei unterschiedliche Modelle: das sequentielle KNF-Modell nach Koshland, Nemethy und Filmer ^[19-21] sowie das konzertierte MWC-Modell von Monod, Wyman und Changeux ^[22]. Zu den hinsichtlich der Kooperativität bestuntersuchtesten Hämocyaninen gehört das der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ^[23-26].

Bereits wenn die Untereinheiten des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* zum dodekameren Halbmolekül assoziiert sind, erfolgt die Sauerstoffbindung kooperativ. Die Sauerstoffbindung des *in vivo* vorliegenden 24-meren Moleküls zeigt eine deutlich höhere Kooperativität ^[17, 18, 27] und kann, ebenso wie beim Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator*, durch das Nesting Model beschrieben werden ^[23, 26, 28, 29]. Die Kooperativität kann durch Effektoren wie zum Beispiel Protonen (Bohr-Effekt) beeinflusst werden ^[23, 25, 30].

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die reversible Sauerstoffbindung nicht die einzige Funktion von Hämocyanin ist. Da Hämocyanin den bei weitem größten Teil an Proteinen in der Hämolymphe ausmacht ^[31], ist es zu über 50 % auch für die Pufferkapazität verantwortlich ^[32, 33]. Ähnlich wie die nichtrespiratorischen Pseudo-Hämocyanine ^[12], Cryptocyanine ^[11] der Crustaceen oder die verwandten Hexamerine der Insekten ^[6] kann Hämocyanin als Speicherprotein (zum Beispiel für Aminosäuren ^[34]) dienen. Weiterhin besitzt es eine Funktion als Transportprotein für Ecdyson ^[35] und kann Bestandteil der Kutikula sein ^[32, 36].

1.1.2 Struktur des Hämocyanins der Spinne *Eurypelma californicum*

Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ist ein aus vier Hexameren zusammengesetztes 24-mer. Sowohl der Aufbau der Quartärstruktur^[9, 37, 38] als auch die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten wurden bereits aufgeklärt^[8, 39-41].

Die sieben Untereinheiten des Spinnen-Hämocyanins werden mit den Buchstaben *a* bis *g* gekennzeichnet und liegen in einem genau festgelegten stöchiometrischen Verhältnis vor: Je zwei Hexamere bestehen aus den Untereinheiten *a*, *b*, *d*, *e*, *f* und *g*, die anderen beiden aus *a*, *c*, *d*, *e*, *f* und *g*^[8]. Jeweils ein Hexamer mit der Untereinheit *b* assoziiert mit einem Hexamer mit der Untereinheit *c* zu einem dodekameren Halb molekül. Wiederum über Kontakte zwischen *b* und *c* entsteht durch isologe Dimerisierung das native oligomere 24-mer (Abbildung 2a).

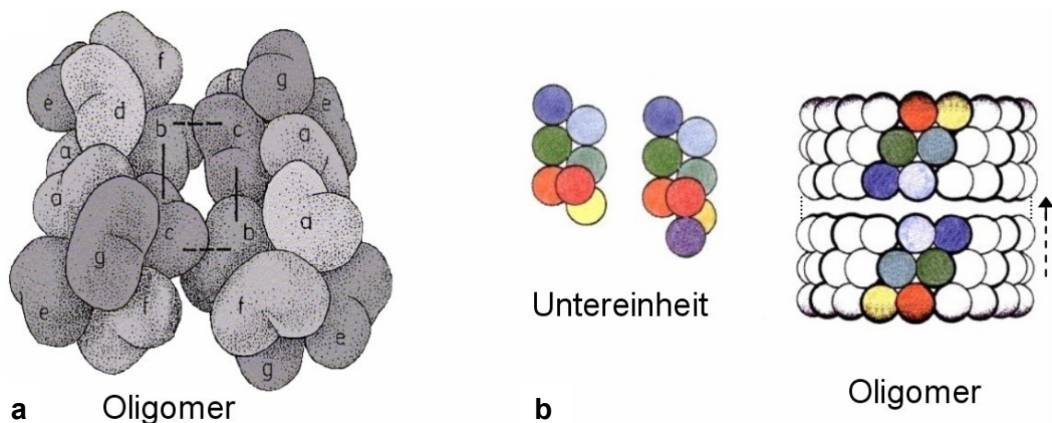


Abbildung 2: Quartärstruktur von Hämocyaninen.

a 24-meres Arthropoden-Hämocyanin, hier von der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (aus^[2]). Grundbaustein der Quartärstruktur ist die in Abbildung 1a dargestellte Untereinheit.

b Mollusken-Hämocyanin (aus^[42]). Jede Untereinheit besteht aus sieben oder acht funktionellen Einheiten. Sie lagern sich zu einem oligomeren Hohlzylinder zusammen. In Abhängigkeit der Spezies entstehen Dekamere oder Didekamere.

1.1.3 Struktur des Hämocyanins des Skorpions *Pandinus imperator*

Das Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* ist in seiner nativen Form ebenfalls ein 24-mer. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen Aufbau aus zwei eng assoziierten Hexameren, die zu Dodekameren dimerisieren und sich dann zum vollständigen 24-mer zusammenlagern (Abbildung 2a)^[43]. Damit entspricht es in seiner Quartärstruktur den ebenfalls 24-meren Hämocyaninen von *Androctonus australis*^[44] und *Buthus sindicus*^[45].

Die Anzahl der Untereinheiten im Skorpion-Hämocyanin wird in der Literatur mit sieben bis acht angegeben^[28, 43, 44]. Sie unterscheiden sich sowohl in Primärstruktur als auch im immunologischen Verhalten^[46, 47]. Wie bei der Spinne hat jede Untereinheit ihre bestimmte Position im Molekül einzunehmen, damit das native Oligomer aufgebaut werden kann. Unterein-

heiten, die dabei ähnlich wie bei *E. californicum* als Linker zwischen den Halbmolekülen fungieren, konnten bisher nicht identifiziert werden.

1.1.4 Mollusken-Hämocyanin

Die Sauerstoff-bindende funktionelle Einheit der Mollusken hat eine Masse von circa 50 kDa und ist aus zwei Domänen aufgebaut (Abbildung 3) ^[48, 49]: eine N-terminale Domäne aus α -Helices mit den beiden Kupfer-Atomen im aktiven Zentrum (entspricht der Domäne II bei Arthropoden) und eine C-terminale Domäne aus einem zusammengedrücktem β -Barrel (entspricht Domäne III der Arthropoden). Die aktiven Zentren von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin sind sich sehr ähnlich. Auf der Ebene der Tertiär- und Quartärstruktur unterscheiden sich die beiden respiratorischen Proteine jedoch deutlich: Sieben bis acht der funktionellen Einheiten sind kovalent zu einer größeren Untereinheit mit einem Molekulargewicht zwischen 350 kDa bis 450 kDa verknüpft; jede Untereinheit kann somit, abhängig von der Tierart, sieben bis acht Moleküle Sauerstoff binden ^[2, 50-53]. Zehn Untereinheiten bilden als Dekamer eine zylindrische Hohlstruktur mit fünf- oder zehnfacher Symmetrieachse. Abhängig von der Tierart verbleibt das Hämocyanin-Molekül als 10-mer oder ordnet sich in der Hämolymphe zu 20-meren an (Abbildung 2b) ^[2-4].

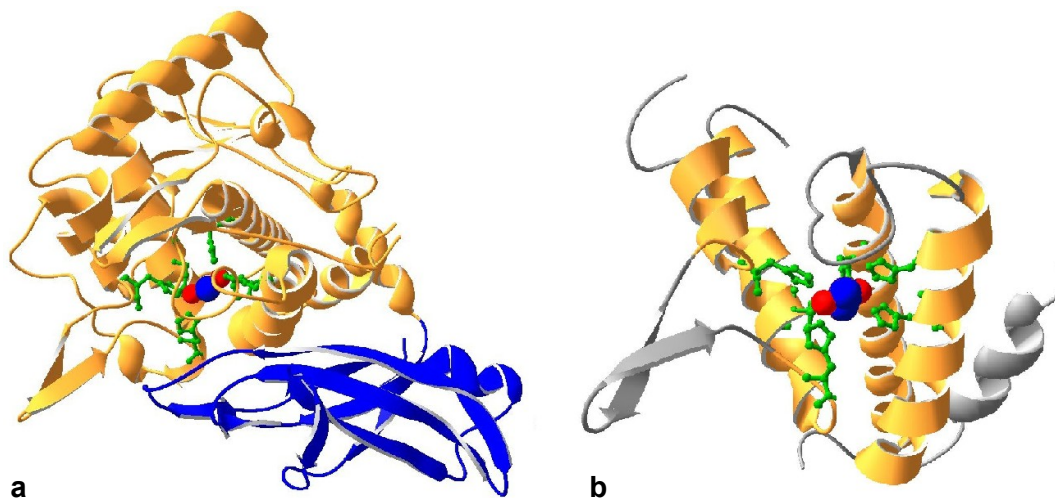


Abbildung 3: Struktur von Mollusken-Hämocyanin.

a Die N-terminale, erste Domäne (gelb) des *Octopus doffleini*-Hämocyanins ist vorwiegend aus α -Helices aufgebaut und enthält das aktive Zentrum mit den beiden Kupfer-Atomen (rot) mit Sauerstoff (blau). Die zweite Domäne (blau) besteht zum größten Teil aus Immunglobulin-ähnlichen β -Faltblättern ^[49].

b Das aktive Zentrum der Mollusken-Hämocyanine ist ein Typ 3-Kupferzentrum: Zwei Kupfer-Atome (rot) werden von sechs Histidinen (grün) koordiniert. Die aktiven Zentren von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin sind sich damit sehr ähnlich.

1.2 Phenoxidasen, Tyrosinasen und Catecholoxidasen

Die ebenfalls zu den Metalloproteinen gehörenden Phenoxidasen sind kupferhaltige Oxidasen, die Monooxygenase- und / oder Catecholoxidase-Aktivität besitzen. Ein Beispiel ist die Tyrosinase (Abbildung 4), die mittels Monophenol-Monooxygenase-Aktivität (EC 1.14.18.1) zum Beispiel Tyrosin zu L-Dopa (3,4-Dihydroxy-Phenylalanin) hydroxyliert und es anschließend mittels Catecholoxidase-Aktivität (EC 1.10.3.1) von L-Dopa zu Dopachinon oxidiert ^[54]. Diese beiden Katalysen laufen höchstwahrscheinlich in einem Reaktionsschritt ab ^[55]. Die gebildeten *o*-Chinone reagieren weiter zu einem polymeren Netzwerk, dem Melanin ^[56, 57]. Dies geschieht entweder nichtenzymatisch, zum Teil auch unter Beteiligung weiterer Enzyme wie „tyrosin-related protein“ TRP-1 / DHICA-Oxidase oder TRP-2 / Dopachrom-Tautomerase ^[56, 58, 59]. Die Farbe des Melanins liegt zwischen schwarz-braun (Eumelanin) und rot-braun (Phäomelanin). Letzteres zeichnet sich durch den Einbau von Cystein und einen geringeren Anteil an Carbonyl-Gruppen aus ^[57, 60]. Melanin wirkt sowohl fungistatisch als auch bakteriostatisch und besitzt zusätzlich noch antivirale Aktivität ^[61].

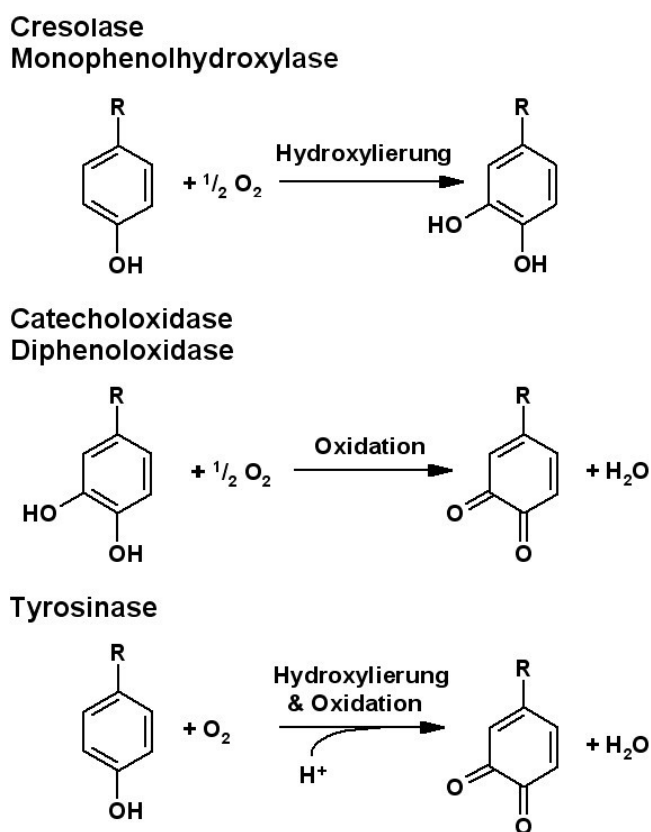


Abbildung 4: Reaktionen der Tyrosinase und Catecholoxidase.

Tyrosinasen katalysieren die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen (Monophenolhydroxylase- beziehungsweise Cresolase-Aktivität). Diese werden anschließend von demselben aktiven Zentrum zum *o*-Chinon oxidiert (Diphenoloxidase- beziehungsweise Catecholoxidase-Aktivität). Im Gegensatz dazu können Catecholoxidasen nur den zweiten Reaktionsteil, die Oxidation von *o*-Diphenolen katalysieren. Sowohl für die Hydroxylierung als auch für die Oxidation ist molekularer Sauerstoff als Kosubstrat beziehungsweise als Oxidationsmittel notwendig. Als Synonym für Tyrosinasen werden in der Literatur oft auch die Begriffe Phenoxidasen oder Polyphenoloxidasen verwendet.

Aufgrund der zahlreichen konjugierten Bindungen liegt das Absorptionsspektrum von Melanin im sichtbaren Bereich des Spektrums. Darüber hinaus findet Absorption im infraroten und im ultravioletten Bereich statt (λ_{Abs} 280 nm bis > 700 nm) ^[56, 62].

Phenoloxidasen sind bei allen Tieren, Pflanzen und Pilzen anzutreffen. Dort sind sie für die Initiierung der Melanin-Synthese verantwortlich, die für charakteristische Färbung von Haut, Fell oder Federn zur Tarnung und zum Schutz vor Strahlung sorgt ^[56] und essentiell für die Sklerotisierung des Exoskeletts der Arthropoden ist ^[63]. Die Sklerotisierung basiert auf der Quervernetzung der kutikulären Proteinmatrix durch von der Phenoloxidase gebildeten Chinonen ^[56, 63, 64].

Weiterhin sind Phenoloxidasen wichtig für den Wundverschluss und die Immunabwehr primitiver Organismen ^[65-67]. Melanin wird am Ort der Verwundung abgelagert und minimiert beziehungsweise verhindert den Verlust von Hämolymphe und das Eindringen von Pathogenen ^[67-69].

Nomenklatur

Die Bezeichnungen Phenoloxidase und Catecholoxidase werden in Veröffentlichungen häufig parallel und als Synonyme eingesetzt. Oftmals werden enzymatische Aktivitäten, die durch ihre Substratspezifität klar als Diphenoloxidase / Catecholoxidase zu erkennen sind, als Phenoloxidase beschrieben. Selbst der Chemical Abstract Service führte für Tyrosinasen und Catecholoxidasen eine Zeit lang dieselbe Identifikationsnummer.

Bei der mit Phenoloxidase-Aktivität bezeichneten Reaktion handelt es sich nicht im engeren Sinn um eine Oxidase, da der Sauerstoff zumindest bei der ersten Teilreaktion nicht als Elektronenakzeptor dient. In der zweiten Reaktion, bei der es sich in der Tat um eine Oxidation handelt, ist wiederum nicht ein Phenol, sondern ein Catechol das Substrat.

Aus historischen Gründen und der allgemeinen Gebräuchlichkeit entsprechend wird in dieser Arbeit der Begriff Phenoloxidase trotzdem verwendet. Er beschreibt beide in Abbildung 4 dargestellten Reaktionen. Ebenso werden die Bezeichnungen Diphenoloxidase und Catecholoxidase als Synonyme verwendet. Die Bezeichnung Monophenolhydroxylase oder Cresolase legt den Augenmerk vor allem auf den Umsatz von Monophenolen, dem sich dann eine Oxidation des Diphenols anschließt; hierbei handelt es sich streng genommen also auch um eine Tyrosinase.

1.2.1 Struktur der Tyrosinasen und Catecholoxidasen

Von allen Klassen der Typ 3-Kupferproteine sind Kristallstrukturen bekannt (Tabelle 1). Sie alle enthalten weitgehend identische Kupferzentren, die Sauerstoff reversibel binden können. So entsteht ein zweikerniger Cu^{II} -Komplex mit einem in side-on ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$) gebundenem Peroxyliganden ^[15, 49, 70].

Organismus	Struktur		Auflösung	Referenz	
<i>Rapana thomasiana</i>	Hämocyanin	deoxy oxy	3,4 Å	[48]	
<i>Palinurus interruptus</i>	Hämocyanin	deoxy	3,2 Å	[13, 14]	
<i>Limulus polyphemus</i>	Hämocyanin	deoxy	2,2 Å	[15, 71, 72]	
		oxy	2,4 Å		
		Nitratgebunden	2,4 Å		
<i>Octopus dofleini</i>	Hämocyanin	oxy	2,3 Å	[49]	
<i>Ipomoea batatas</i>	Catechol-oxidase	deoxy met Inhibitorgebunden	2,7 Å	[73]	
<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Tyrosinase	deoxy	} mit ORF378	1,6 Å	[70]
		oxy		1,8 Å	
		apo		1,5 Å	
		met I, II		1,5 Å	

Tabelle 1: Kristallstrukturen von Typ 3-Kupferproteinen.

Phenoxidasen können gemäß ihrer Sequenzähnlichkeit zu den Hämocyaninen, mit denen sie phylogenetisch verwandt sind, in zwei Gruppen eingeteilt werden. Ein Typ ähnelt stärker den Mollusken-Hämocyaninen, der andere stärker den Arthropoden-Hämocyaninen [4, 6, 74-76]. Die Sequenzen der Arthropoden-Phenoxidasen wiederum ähneln stärker den Hämocyaninen der Cheliceraten als denen der Crustaceen [11, 74, 77].

Über die native Struktur der Tyrosinase-Moleküle ist nur wenig bekannt. Beispielsweise liegen humane und Maus-Tyrosinase Membran-gebunden und vermutlich als Dimere vor, Arthropoden-Tyrosinasen dagegen bilden Strukturen zwischen Monomeren und Hexameren aus [75, 78-81].

Bekannte Strukturen von Tyrosinasen beschränken sich fast ausschließlich auf deren Sequenz. Sie weisen eine hohe Homologie zur Primärstruktur der Arthropoden-Hämocyanine auf [76, 82-84]. Kürzlich wurde die Kristallstruktur der Tyrosinase von *Streptomyces castaneoglobisporus* im Komplex mit ORF378 veröffentlicht. Das Enzym wurde als apo-Form mit dem für den Kupfertransport ins aktive Zentrum verantwortlichen ORF378 („caddie protein“) co-kristallisiert [70]. Die Struktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase ist vor allem helikal, ein „four α -helix bundle“ bildet auch hier das aktive Zentrum, in dem jedes Kupfer von je drei Histidinen koordiniert wird. Das Kupferzentrum befindet sich am Ende einer größeren Kavität, der angenommenen Substrat-Bindungs-Tasche, die durch hydrophobe Reste gebildet wird [70].

Die Aminosäuresequenz der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase hat nur 25,3 % Sequenzidentität zu der Primärstruktur von *Ipomoea batatas* [73] und nur 26 % zu der *odg*-Domäne von *Octopus dofleini*-Hämocyanin [49], trotzdem ist die Gesamtstruktur doch recht ähnlich [70].

Diese drei Proteine sind vor allem im Bereich der α -Helix-Bündel stark konserviert. Die *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase und Hämocyanine von *Palinurus interruptus* ^[14, 85] und *Limulus polyphemus* ^[15, 71, 72] dagegen zeigen kaum strukturelle Homologie oder Übereinstimmungen ^[70]. Dennoch können die aktiven Zentren dieser Proteine (*S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase, *I. batatas*-Catecholoxidase, Hämocyanin von *L. polyphemus* und *O. dofleini*) gut zur Deckung gebracht werden ^[55, 86]. Der Blick ins aktive Zentrum aller Proteine ähnelt sich, und damit wahrscheinlich auch der Aktivierungsmechanismus. Anhand der Substratorientierung kann ein Katalysemechanismus abgeleitet werden ^[55, 86, 87].

Die Superposition der unterschiedlichen Reaktionszentren belegt den Grad an strukturellen Übereinstimmungen. Obwohl die verschiedenen Hämocyanin-Untereinheiten von *Eurypelma californicum* und die Untereinheit II von *L. polyphemus* eine Sequenzidentität von 52 % bis 60 % haben ^[8], kann auch für diese Proteine und für die *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase trotzdem eine große Ähnlichkeit der aktiven Zentren aufgezeigt werden ^[55].

1.2.2 Mechanismus der Tyrosinase und Catecholoxidase

Hinsichtlich ihrer Sequenz und anderen Eigenschaften unterscheiden sich Catecholoxidasen von den echten Tyrosinasen nicht ^[5, 57, 88]. Die beiden Proteine differieren lediglich in ihrer enzymatischen Aktivität: Catecholoxidasen können nur die Oxidation von Diphenolen zu Chinonen katalysieren. Bei den Tyrosinasen treten Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität immer gemeinsam auf ^[89]. Die Monophenolhydroxylase-Aktivität als erster Schritt der Melanisierung zeigt eine charakteristische Lag-Periode, bevor die maximale Geschwindigkeit der Hydroxylierung erreicht wird ^[89]. Dies liegt daran, dass nur 2 % bis 30 % der Kupferzentren in der oxy-Form vorliegen ^[90] und katalytisch aktiv werden können. Oxidation von Diphenolen als zweiter Reaktionsschritt ermöglicht auch met-Kupferzentren, über die deoxy- in die oxy-Form überzugehen und enzymatisch aktiv zu werden. Katalytische Mengen von Diphenolen verkürzen die Lag-Periode von Tyrosinasen ^[57, 89, 91]. Bei Titration mit Wasserstoffperoxid bindet das H_2O_2 bei Phenoloxidasen an die met-Zentren und wandelt diese ebenfalls wieder in den oxygenierten Zustand um ^[92-94].

Erst im März 2006 wurde die erste Kristallstruktur einer Tyrosinase veröffentlicht ^[70]. Bis dahin wurden Einblicke in den Reaktionsmechanismus vor allem durch Vergleiche mit Hämocyaninen gewonnen ^[94, 95]. Sowohl die Hydroxylierung als auch die Oxidation finden am gleichen aktiven Zentrum statt ^[88]. Das monophenolische Substrat bindet axial an einem der Kupferzentren und wird in *ortho*-Stellung für die Hydroxylierung positioniert ^[55]. Es entsteht ein *o*-Diphenol, das zum Chinon oxidiert wird. Große Substituenten des Ringsystems reduzieren die Monophenolhydroxylase-, nicht aber die Diphenoloxidase-Aktivität ^[94]. Dies weist darauf hin, dass für diese zweite Teilreaktion kein Rearrangement des Substrats am Kupferzentrum notwendig ist ^[88].

1.3 Funktion der Arthropoden-Phenoloxidasen

Die Phenoloxidase liegt in der Hämolymphe vieler Invertebraten als inaktives Zymogen vor. Diese Prophenoloxidase der Crustaceen und Insekten wird in den Hämocyten synthetisiert^[96]. Das Proenzym hat eine Masse von 70 kDa bis 80 kDa und wird durch proteolytische Spaltung mit Entfernung eines *N*-terminalen Fragments aktiviert^[83, 96-98]. Die funktionelle Phenoloxidase hat ein Molekulargewicht von 60 kDa bis 70 kDa^[99]. Die Ähnlichkeit der Primärsequenz von Prophenoloxidasen von *Pacifastacus leniusculus*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta* und *Bombyx mori* liegt bei etwa 40 %, im Bereich der Sauerstoffbindungsstellen sogar zwischen 60 % und 70 %^[96]. Die Homologie der *B. mori*-Prophenoloxidase und Arthropoden-Hämocyanin liegt bei 29 % bis 39 %^[83].

Die Steuerung des Phenoloxidase-Systems wird von einer komplexen Kaskade von Serinproteasen kontrolliert^[67, 96]. Die aktivierende Protease konnte zum Beispiel bei *P. leniusculus*^[100], *D. melanogaster*^[98] und *B. mori*^[101] isoliert und mit einer Masse von circa 30 kDa beschrieben werden.

Auch die Aktivität der Serinproteasen muss vom Arthropoden-Organismus kontrolliert werden, um eine ständige Melaninbildung zu vermeiden. Diese Funktion übernehmen die bei Crustaceen und Insekten mehrfach in der Hämolymphe nachgewiesenen Serinprotease-Inhibitoren (Serpine)^[67, 102].

Die aktivierten Phenoloxidasen machen eingedrungene Pathogene durch zwei Mechanismen unschädlich: Zum einen wirken die gebildeten, hochreaktiven *o*-Chinone direkt zytotoxisch auf die Pathogene^[69], und zum anderen werden Pathogene, die zu groß für die Phagozytose sind, durch Melanin abgekapselt. Die Melaninkapsel stellt dabei eine mechanische Barriere dar, die die Entwicklung der Pathogene hemmt und den Schaden begrenzt, den diese im Organismus anrichten können^[69, 103-105].

1.4 Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin

Wie bereits beschrieben weisen die Arthropoden-Phenoloxidasen in ihrer Sequenz eine sehr große Ähnlichkeit mit den Hämocyaninen der Arthropoden auf^[5]. Besonders gut erhalten ist die Sequenz des aktiven Zentrums^[2, 4, 6, 82, 83]. Zwischen den Tyrosinasen und Catecholoxidasen der Pflanzen finden sich ebenfalls Ähnlichkeiten in der Sequenz, allerdings nur in der direkten Umgebung des aktiven Zentrums^[86]. Die Topologie dagegen entspricht mehr jener von Mollusken-Hämocyaninen^[52, 65, 86, 106].

Phenoloxidasen, die zur Bildung von Melanin und für Pathogene giftige Chinon-Intermediaten essentiell sind, konnten bisher weder bei Pfeilschwanzkrebsen noch bei Vogelspinnen eindeutig nachgewiesen werden^[65, 107, 108]. Allerdings ist es in den letzten Jahren gelungen, bei Hämocyanin von Arthropoden und Mollusken eine Phenoloxidase-Aktivität *in vitro* nachzuweisen^[5, 6, 65].

So zeigen zum Beispiel die Hämocyanine der Mollusken *Sepia officinalis* und *Helix pomatia* eine intrinsische, schwache Diphenoloxidase-Aktivität, die nach Proteolyse mit Subtilisin schwach und durch den Einsatz von SDS stark ansteigt ^[109, 110]. Bei *Octopus dofleini*-Hämocyanin kann ebenfalls eine Diphenoloxidase durch Konformationsänderung im sauren pH-Bereich induziert werden ^[111].

Obwohl Crustaceen Phenoloxidasen in ihren Hämocyten besitzen, kann auch ihr Hämocyanin zu einer Catecholoxidase aktiviert werden. Dies kann unter anderem durch Perchlorat, SDS, oder durch den Inhalt der Hämocyten geschehen ^[112-114].

Bei den Hämocyaninen der drei erdgeschichtlich alten Cheliceraten *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus* und *Eurypelma californicum* kann eine *o*-Diphenoloxidase-Aktivität durch geringe Konzentrationen von SDS induziert werden ^[65, 66, 107, 115]. Weiterhin kann das Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *L. polyphemus* zusätzlich mittels Cetylpyridiniumchlorid zu einer Diphenoloxidase aktiviert werden ^[115]. Das Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* zeigt eine Phenoloxidase-Aktivität auch nach Aktivierung durch begrenzte Proteolyse mit Trypsin oder Chymotrypsin ^[65].

Diese enzymatische Aktivität scheint auf nur einige der heterogenen Hämocyanin-Untereinheiten, nämlich Untereinheit *b* und Untereinheit *c* (*Eurypelma californicum*) beziehungsweise Untereinheit V, Untereinheit II und Untereinheit VI (*Limulus polyphemus*) beschränkt zu sein. Diese aktiven Untereinheiten haben bei den beiden Spezies ähnliche topologische Positionen in der Quartärstruktur des Moleküls, wo sie als Linker zwischen den vier Hexameren wirken ^[65].

Die α -Untereinheit des Hämocyanins von *T. tridentatus* kann außerdem durch sein Gerinnungsenzym (Abbildung 119) in einer 1:1-Stöchiometrie funktionell zu einer Diphenoloxidase aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt durch Komplexbildung ohne proteolytische Spaltung. Auch Bindung der antimikrobiellen Peptide Tachyplesin, Tachystatin, Tachycitin (gespeichert in den S-Granula) oder Big Defensin (in L- und S-Granula) an das α -Hämocyanin aktiviert die Catecholoxidase-Aktivität dosis-abhängig und nicht-proteolytisch ^[66, 107, 116].

Der Mechanismus, der der Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanine zugrunde liegt, ist bisher kaum bekannt. Die Aktivierung durch Proteolyse entspricht dem natürlichen Aktivierungsmechanismus der Arthropoden-Phenoloxidasen ^[96]. Das Detergens SDS dagegen, welches *in vitro* sehr häufig zur Aktivierung von Prophenoloxidasen genutzt wird, scheint eine Aktivierung durch Fettsäuren und lipophile Substanzen nachzuahmen ^[114, 117].

Die Hämocyanine und Phenoloxidasen gehören mit drei weiteren Protein-Klassen zu einer gemeinsamen Proteinfamilie, die sich alle aus den Phenoloxidasen entwickelt haben ^[2-5, 118]. Damit kann die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins als funktionelles Bindeglied und Beleg für die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Phenoloxidasen und Hämocyaninen angesehen werden ^[86].

1.5 Immunsystem

1.5.1 Immunsystem der Invertebraten

Das Immunsystem der Arthropoden muss in der Lage sein, schädliche Mikroorganismen zu erkennen und anschließend gezielt unschädlich zu machen. Invertebraten besitzen nur ein angeborenes Immunsystem, die phylogenetisch alte „Innate Immunity“ ^[119-121]. Die Erkennung der Mikroorganismen erfolgt durch Proteine des Immunsystems, die an charakteristische konservierte Oberflächenepitope von Pathogenen binden („pathogen-associated molecular patterns“, PAMP), und die bei höheren Eukaryoten nicht zu finden sind (Abbildung 5 und Abbildung 7). Die wichtigsten Epitope sind Mannane in der Zellwand von Hefen, formylierte Peptide bei Bakterien und Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren auf Bakterienoberflächen ^[96, 121, 122]. Nach Erkennung durch die „pattern recognition receptors“ (PRR) werden Immunreaktionen in Gang gesetzt, die letztendlich zur Inaktivierung der Pathogene führen.

1.5.1.1 Zelluläre Immunantwort

Als zelluläre Abwehrreaktionen stehen Phagozytose, Knötchenbildung und Einkapselung zur Verfügung: Kleinere Erreger wie Bakterien und Hefen werden von Phagocyten-ähnlichen Zellen aufgenommen und intrazellulär verdaut. Bei großer Bakterienanzahl werden diese in einem Koagulum aus Hämocyten und Hämolympfkomponenten aggregiert und unschädlich gemacht. Sind die eingedrungenen Erreger für die phagozytierenden Zellen zu groß (zum Beispiel parasitische Würmer oder Schlupfwespenlarven), werden sie eingekapselt. Sie werden zunächst von mehreren Schichten Hämocyten umschlossen, anschließend wird extrazelluläres Material aufgelagert. Der eingekapselte Fremdkörper verbleibt im Gewebe. Weiterhin können die Pathogene durch Melanin miteinander verklebt werden; die dazu benötigte Phenoloxidase stammt bei Insekten und Crustaceen in der Regel aus den Hämocyten ^[83, 96, 123], kann aber auch wie bei *Pacifastacus leniusculus* im Hepatopankreas synthetisiert werden ^[96].

1.5.1.2 Humorale Immunantwort

Neben den Zellen leisten in der Hämolymphe gelöste Faktoren (humorale Faktoren), die antimikrobiellen Peptide, einen Beitrag zur Immunantwort ^[116, 124-129].

Die antimikrobiellen Peptide sind in der Regel kurze, aus nur circa 12 bis 45 Aminosäuren bestehende Peptide, die durch Zusammenlagerung ihrer hydrophoben und kationischen Reste eine amphipathische Struktur ausbilden ^[130-132]. Sie zielen vor allem auf den fundamentalen Unterschied der Zellmembran eukaryotischer und prokaryotischer Organismen ab: Zellmembranen der meisten bakteriellen Pathogene bestehen vor allem aus Cardiolipin, Phosphatidylglycerinen und Phosphatidylserinen, die alle eine negative Nettoladung tragen

(Abbildung 5). Bilayer mit zwitterionischen Phospholipiden wie Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin haben eine neutrale Nettoladung und finden sich vor allem in den Zellmembranen von Säugern ^[132]. Weiterhin tragen Serine zur Unterscheidung der Membrantypen bei. Antimikrobielle Peptide mit vor allem antifungaler Wirkung sind reich an neutralen Aminosäuren und legen damit ebenfalls einen Erkennungsmechanismus bezüglich des Membranaufbaus nahe ^[133].

Die antimikrobiellen Peptide lagern sich gezielt an die negativ geladenen Phospholipidstrukturen in der äusseren Schicht der mikrobiellen Membran an. Ihre Aktivität erlangen die antimikrobiellen Peptide durch die Zerstörung der Membran beziehungsweise des Membranpotentials der Zielzelle. Dabei wird zwischen den Modellen des „Barrel Stave“-Mechanismus und des „Carpet“-Mechanismus unterschieden (Abbildung 6). Beiden Modellen ist gemein, dass die antimikrobiellen Peptide in wässriger Lösung oft ungefaltet vorliegen, und erst bei Membrankontakt ihre Konformation einnehmen. Beim „Carpet“-Mechanismus (vor allem elektrostatisch getrieben) binden die antimikrobiellen Peptide an die Membranoberfläche und bedecken sie wie einen Teppich. Die Peptide binden dabei an die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide. Es bildet sich eine Peptidschicht auf der Membranoberfläche, bei der die positiv geladenen antimikrobiellen Peptide mit den negativen Phospholipiden. Es kommt dann zu einer Rotation der antimikrobiellen Peptide, bei der sich ihre hydro-

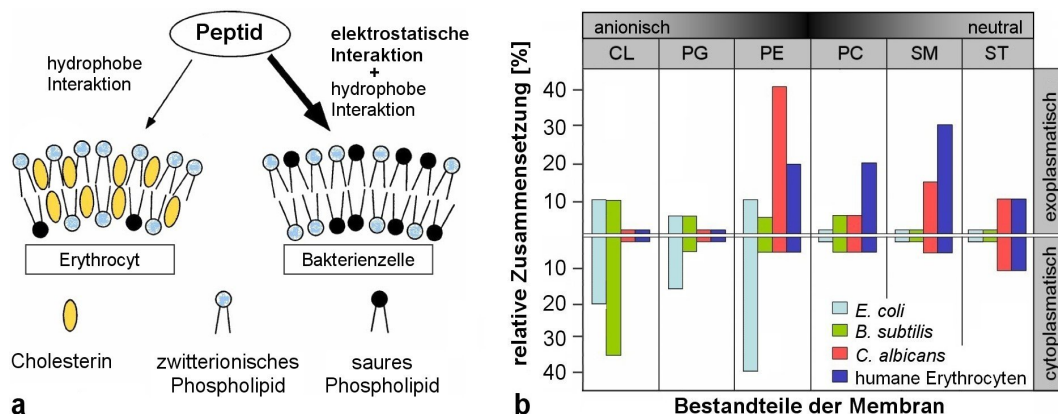


Abbildung 5: Molekulare Basis der Membranunterscheidung durch antimikrobielle Peptide.

a Kationische antimikrobielle Peptide binden bevorzugt an bakterielle Membranen, die vorwiegend aus sauren Phospholipiden (Cardiolipin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin) bestehen. Diese Wechselwirkung ist vor allem elektrostatisch getrieben. Die äussere Membran von Eukaryoten unterscheidet sich in ihrem Aufbau (Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) von der prokaryotischen Membran, unter anderem durch den Gehalt an Steroiden (verändert nach ^[130]).

b Vergleich der Architektur mikrobieller und humaner Cytoplasmamembranen. Zusätzlich zu dem unterschiedlichen Aufbau der pro- und eukaryotischen Membran existiert eine Asymmetrie bezüglich innerer und äusserer Lipidschicht. Diese Unterschiede in der Membranarchitektur sind auch für den Unterschied im elektrochemischen Gradienten bei prokaryotischen und eukaryotischen Membranen verantwortlich (verändert nach ^[132]).

Abkürzungen: CL: Cardiolipin, PG: Phosphatidylglycerin, PE: Phosphatidylethanolamin, PC: Phosphatidylcholin, SM: Sphingomyelin, ST: Sterine (Cholesterin und Ergosterol).

phoben Membranzentrum hinorientieren und damit die Membran durch Micellierung zerstören^[131].

Bei dem „Barrel Stave“-Mechanismus (vor allem hydrophob getrieben) kommt es bei der Anheftung der antimikrobiellen Peptide zur gegenseitigen Erkennung; es bilden sich Bündel aus antimikrobiellen Peptiden. Diese Bündel inserieren sich senkrecht in die Membran und

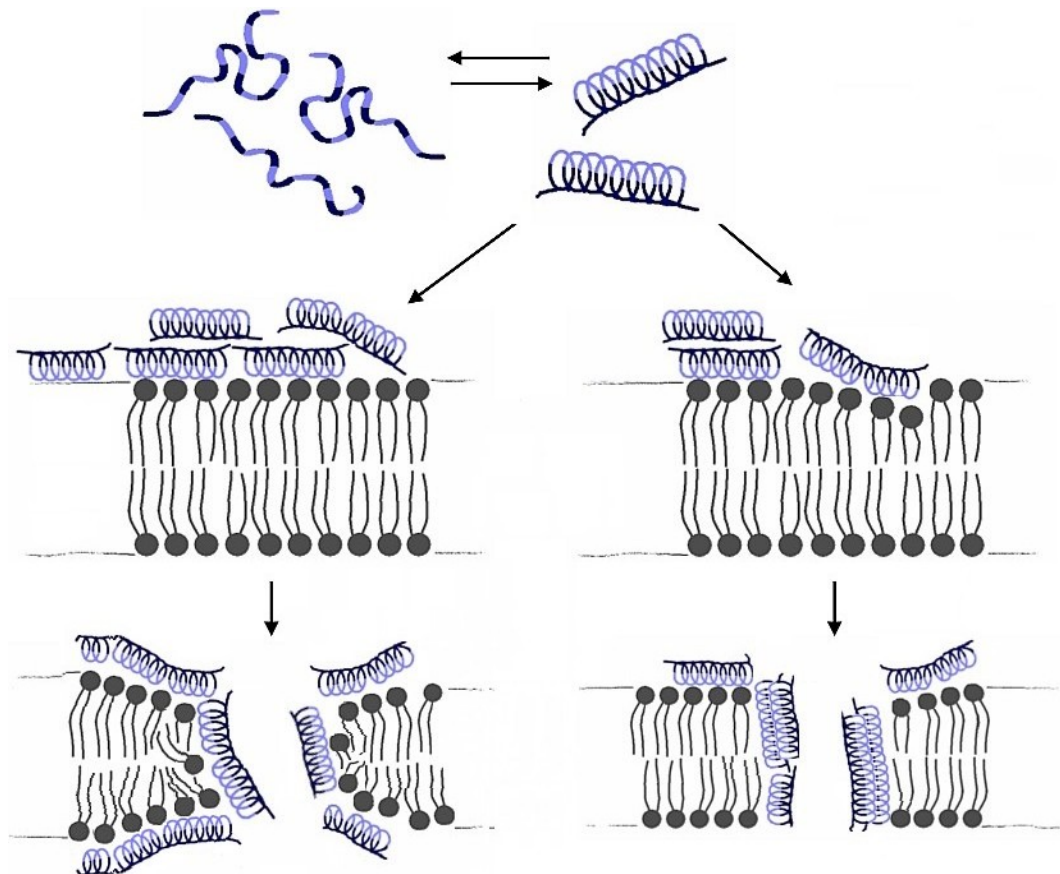


Abbildung 6: Wirkungsmechanismus der antimikrobiellen Peptide (verändert nach^[131]).

Die am häufigsten untersuchte Gruppe der antimikrobiellen Peptide sind die linearen, meist helikalen Peptide (Margainin, Dermaseptin, Cecropin). An ihrem Beispiel werden Modelle hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus dargestellt:

Die in wässriger Lösung ungefalteten antimikrobiellen nehmen erst bei Membrankontakt ihre Konformation ein und binden mit ihrer hydrophoben Oberfläche (hellblau) an die Membran, die hydrophile Seite (dunkelblau) ist zum Solvent orientiert.

Bei dem „Carpet“-Mechanismus (links) bedecken die antimikrobiellen Peptide die Membran-Oberfläche wie einen Teppich, wobei die positiv geladene Seite der antimikrobiellen Peptide an die negativen Phospholipide binden. Eine Rotation der Moleküle führt zu einer Reorientierung der hydrophoben Reste in Richtung des hydrophoben Kerns der Membran, zur Micellierung und zur Zerstörung der Membran.

Bei dem „Barrel Stave“-Mechanismus (rechts) erkennen einzelne Monomere andere bereits gebundene Peptide. Die Monomere lagern sich zu Bündeln zusammen, es folgen weitere Insertionen zu einer vollständigen Pore.

bilden dadurch eine durchlässige Pore ^[131], es kommt zur Depolarisierung und Permeabilisierung der Pathogenmembran.

Gegen antimikrobielle Peptide können pathogene Keime im Verlaufe der Evolution keine wesentlichen Resistenzen entwickeln, da die sich antimikrobiellen Peptide (AMP) gegen ein grundsätzliches Strukturelement der mikrobiellen Zelle, die Membran, richten. Aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung und Aufgaben kann diese nicht einfach verändert werden.

Die antimikrobiellen Peptide werden konstitutionell exprimiert oder nach Verwundung oder bei Infektion innerhalb weniger Stunden neu in verschiedenen Geweben (Fettkörper der Insekten, Hämocyten, Epidermis und Nervengewebe) synthetisiert. Interessanterweise scheinen Garnelen der Gattung *Penaeus* antifungale Peptide durch Abspaltung des Hämocyanin-Terminus zu generieren ^[134].

Das wohl bekannteste antibakterielle Protein ist das Lysozym, eine Acetylmuramyl-Hydrolase, die auch in der menschlichen Tränenflüssigkeit und im Hühnereiweiß vorkommt. Es löst die Zellwand von Bakterien auf und beeinträchtigt das Wachstum von Pilzen.

Antimikrobielle Proteine sind auch bei Cheliceraten, vornehmlich beim Pfeilschwanzkrebs, entdeckt worden ^[116, 135, 136]. Die Gliederung der antimikrobiellen Peptide, die bei Cheliceraten gefunden werden können, ist in Abbildung 120 zu sehen und wird in Kapitel 4.5.5 diskutiert.

1.5.2 Immunsystem der Cheliceraten

Bei den Cheliceraten sind die granulären Hämocyten der Hauptbestandteil des Immunsystems. Diese Hämatocyten (Granulocyten oder Amöbocyten als weitere alternative Bezeichnung) stellen 99 % aller Hämocyten in der Hämolymphe ^[120]. Bei den Pfeilschwanzkrebsen (Xiphosura, Limulidae) enthalten die Hämocyten zwei Typen von sekretorischen Granula, die nach ihrem Erscheinungsbild im Elektronenmikroskop anhand ihrer Dichte unterschieden werden in die wenig dichten, kleinen (small) S-Granula und die dichteren, größeren (large) L-Granula ^[116]. Diese Granula speichern Verteidigungsmoleküle wie zum Beispiel Lektine, antimikrobielle Peptide (unter anderem Tachyplesin und Tachystatin), Protease-Inhibitoren und Gerinnungsenzyme.

Vor allem die Gerinnungskaskade ist beim Pfeilschwanzkrebs sehr gut untersucht worden ^[116, 137-144]. Es handelt sich dabei wie bei der Aktivierung der Prophenoloxidase um eine Kaskade aus Serinproteasen, die sich autokatalytisch nach Kontakt mit β -1,3-Glucanen oder Lipopolysacchariden aktiviert. Beide Aktivierungssysteme (Hämolymp-Gerinnung und Phenoloxidase) reagieren sehr empfindlich auf die 'nicht-selbst'-Erkennung von Zellwandbestandteilen der Mikroorganismen ^[96, 116, 145]. Durch Exocytose der Hämocyten-Granula werden nicht nur Gerinnungsenzyme, sondern auch Abwehrmoleküle frei, die zur Agglutinierung und Vernichtung der Mikroorganismen führen ^[66]. Die Verschränkung von Hämolymp-Gerinnung und Immunsystem ist durch die gleichförmige Reaktion auf den Kontakt mit den

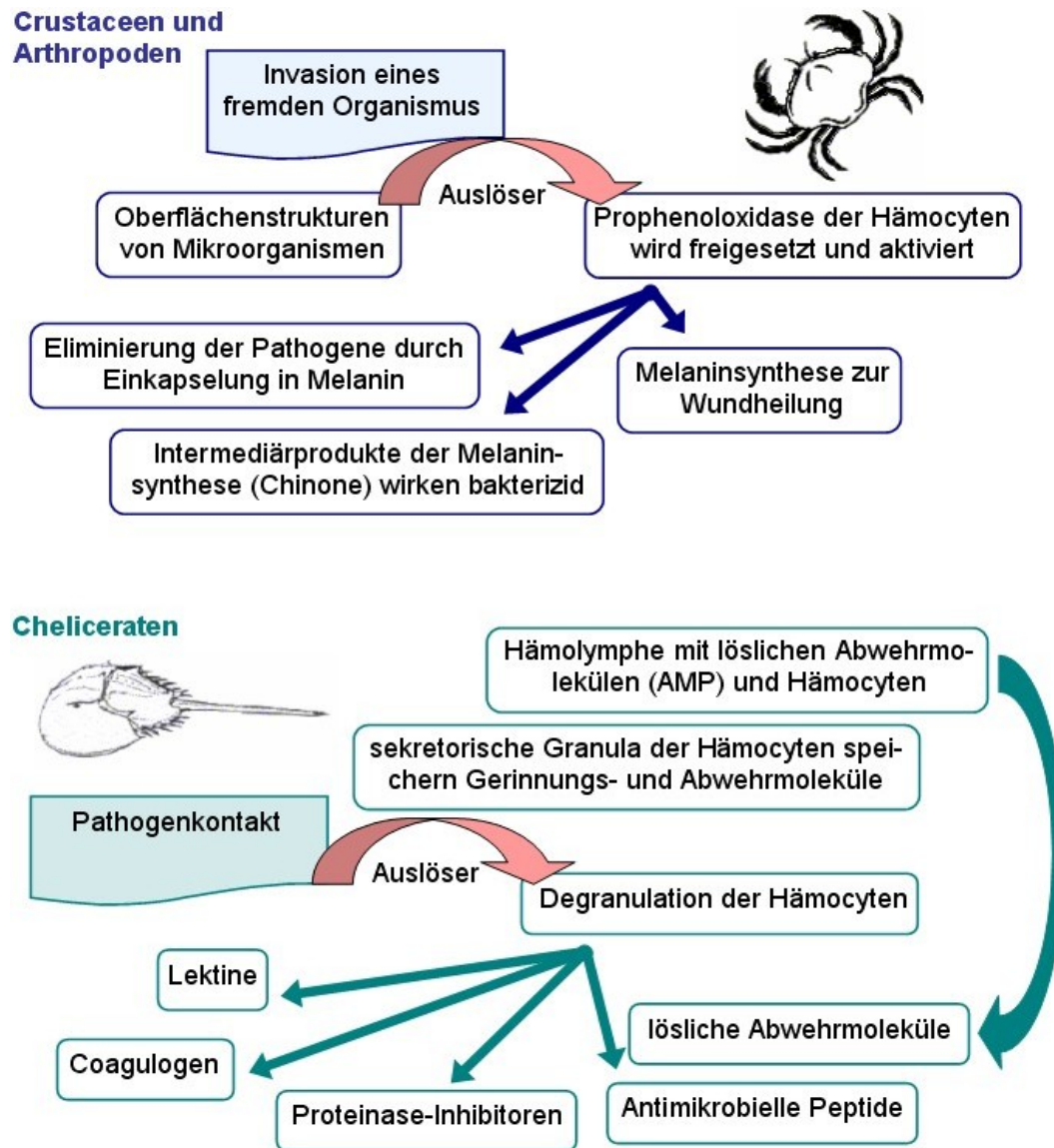


Abbildung 7: Immunsystem der Arthropoden [7, 69, 96, 107, 116, 145-149].

Das Immunsystem der Arthropoden wird durch eine 'nicht-selbst'-Erkennungskaskade aktiviert, Auslöser sind in der Regel Wandbestandteile der eindringenden Mikroorganismen. Bei den meisten Arthropoden ist das Prophenoloxidasen-System wichtiger Bestandteil der „Innate Immunity“. Eine Phenoloxidasen ist bei Cheliceraten nicht zu finden^[66, 106-108], allerdings kann beim Pfeilschwanzkrebs *Tachypleus tridentatus* das respiratorische Protein Hämocyanin durch einen Bestandteil der Gerinnungskaskade aktiviert werden und als Phenoloxidasen wirken^[107].

PAMP („pathogen-associated molecular patterns“) gegeben: Es kommt zur Gerinnung (durch Gerinnungsfaktoren, „Proclotting Enzyme“ und Coagulogen), Immobilisierung (durch Tachylektin, Limunectin oder Limulin) und Vernichtung der Pathogene durch zahlreiche antimikrobielle Substanzen wie Tachyplesin, Tachystatin, Tachycitin, Polyphemusin oder Big Defensin (Abbildung 7)^[116].

Besonders interessant ist die Möglichkeit der Verzahnung von Gerinnungs-Kaskade mit der Aktivierung einer Phenoloxidasen-Aktivität des Hämocyanins. Nagai und Kawabata^[107] be-

schrieben 2000 eine Aktivierung des Hämocyanins von *Tachypleus tridentatus* durch das „Clotting Enzyme“ zur Diphenoloxidase. Eine Tyrosinase ist bei Cheliceraten höchstwahrscheinlich nicht vorhanden ^[107, 108, 147]. Die Phenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin könnte diese wichtige Rolle im Immunsystem demzufolge übernehmen. Tatsächlich besitzen zahlreiche Hämocyanine zumindest eine Diphenoloxidase-Aktivität (Tabelle 23) ^[106, 107, 114 und andere]. Um ein vollständiger Ersatz für die fehlende Phenoloxidase zu sein, muss Hämocyanin allerdings auch eine Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzen. Diese konnte bisher nur an unserem Institut beim Hämocyanin von *Eurypelma californicum* nachgewiesen werden ^[106, 150].

1.6 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zwei große Ziele verfolgt. Anhand des *Pandinus imperator*-Hämocyanins konnte ich das erste Mal reproduzierbar zeigen, dass auch Skorpion-Hämocyanin eine Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzt und zwischen der Tyrosinase- und der Catecholoxidase-Aktivität im Hämocyanin umgeschaltet werden kann. Dazu wurde eine umfassende Charakterisierung des *P. imperator*-Hämocyanins vorgenommen: So wurde das respiratorische Pigment mit hydrodynamischen, elektrophoretischen und spektroskopischen Methoden eingehend untersucht. Der Untereinheiten-Aufbau des nativen Moleküls wurde erforscht, ebenso wie die Stabilität sowohl des 24-meren Moleküls als auch seiner Untereinheiten.

Schwerpunkt der Arbeit war die Beschreibung der enzymatischen Aktivität des Hämocyanins, die hinsichtlich verschiedener Enzymparameter wie Ionenstärke, Puffer-Medium, Salzkonzentration, Aktivatoren und Substratspezifität untersucht wurde. Weiterhin wurde versucht, die Bedingungen, unter denen Hämocyanin Diphenoloxidase- oder Monophenolhydroxylase-Aktivität zeigt, genau zu beschreiben und mögliche, dabei stattfindende Veränderungen im Protein aufzuzeigen.

Von Bedeutung war bei all diesen Untersuchungen vor allem das Hämocyanin der Vogelspinne *Euypelma californicum*, das stets zu vergleichenden Untersuchungen herangezogen wurde.

Die Stellung von Cheliceraten-Hämocyanin im Immunsystem wurde im zweiten Teil untersucht.

Die Bedeutung des Hämocyanins im Organismus sowie seine vielfältigen (möglichen) Aufgaben werden diskutiert.

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 Abkürzungen

AK	Antikörper	MBTH	3-Methyl-2-Benzo- Thiazolinone-Hydrazon
AMP	antimikrobielle Peptide		
APS	Ammoniumpersulfat	MDa	Megadalton
Aqua dest.	destilliertes Wasser / Milli-Q-Wasser	mM	Millimolar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- phosphat- <i>p</i> -Toluidinsalz	NBT	<i>p</i> -Nitrobluetetrazolium
BP	Begleitprotein	nm	Nanometer
BPB	Bromphenolblau	OD	Optische Dichte
CMC	kritische micelläre Konzen- tration	p.a.	pro analysis
CPC	Cetylpyridiniumchlorid	Pi	<i>Pandinus imperator</i>
Da	Dalton	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	PAP	Prophenoxidase- aktivierendes Protein
ϵ	spezifischer Extinktions- koeffizient [mol·cm]	PPAE	Prophenoxidase- aktivierendes Enzym
Ec	<i>Eurypelma californicum</i>	rpm	rounds per minute
EDTA	Ethylendiaminotetra- essigsäure	S	Sedimentationskoeffizient [Svedberg]
Fa.	Firma	SDS	Natriumdodecylsulfat / Sodiumdodecylsulfat
Hc	Hämocyanin	% T	Gewichtsprozent Gesamt- menge Acrylamid
Hepes	Hydroxyethylpiperazin- Ethansulfonsäure	TBST	Tris-buffered Saline + Tween
Hct	Hämocyten	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- ethylendiamin
kDa	Kilodalton	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- aminomethan
λ	Wellenlänge [nm]	UV	Ultraviolettes Licht
Lp	<i>Limulus polyphemus</i>	V	Volt
LPS	Lipopolysaccharid	Vh	Voltstunden
M	Molar	Vis	sichtbares Licht
mA	Milliampère		

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.a.-Qualität und werden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Folgende Chemikalien werden von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen:

Antikörper IgG Anti-Rabbit	Natriumcarbonat
Azocoll	Natrium-Thiosulfat
2,4- <i>di-tert</i> -Butylphenol	Pepsin
Cetylpyridiniumchlorid	Phosphatidylcholin (aus Eigelb)
Dimethylformamid (DMF)	Phosphatidyletholamin (aus Eigelb)
L-Dopa	Phosphatidylserin (aus Rinderhirn)
Dopamin (Hydrochlorid)	Thermolysin
Lipopolysaccharid LPS (L-2630)	Trypsin Typ 2S (T-7409)
Lysozym	Trypsin Inhibitor
MBTH	Tyramin
Mercaptoethanol	Zymosan A

Weitere Chemikalien werden bezogen von:

Agarose M	(Pharmacia, Freiburg)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
4- <i>tert</i> -Butylphenol	(Fluka, Neu-Ulm)
Coomassie R 250	(Serva, Heidelberg)
Kaliumhexacyanoferrat (III)	(Riedel de Haen, Seelze)
Magermilchpulver	(Saliter, Obergrünzburg)
4-Methylphenol (<i>p</i> -Cresol)	(Supelco, USA)
Pepton	(Fluka, Neu-Ulm)
Phenylmethansulfonylfluorid	(Fluka, Neu-Ulm)
RapiGest	(Waters, Eschborn)
Schaferythrocyten	(Fiebig Nährstofftechnik, Idstein)
TEMED	(Fluka, Neu-Ulm)
Trichloressigsäure TCA	(Serva, Heidelberg)
Veronal (Natrium-Barbital)	(Merck, Darmstadt)

2.3 Puffer und Lösungen

Pandinus-Puffer

0,1 M Tris-HCl pH 7,8
10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂

Pandinus-Ringer

1 mM Na₂HPO₄ pH 7,8
190 mM NaCl
8 mM CaCl₂
8 mM MgCl₂
2 mM KCl

Eurypelma-Puffer

0,1 M Tris-HCl pH 7,8
5 mM CaCl₂
5 mM MgCl₂

Eurypelma-Ringer

1 mM Na₂HPO₄ pH 7,8
190 mM NaCl
4 mM CaCl₂
8 mM MgCl₂
2 mM KCl

Dissoziationspuffer

0,05 M Glycin pH 9,6
5 mM EDTA

Alle Puffer und Lösungen werden mit destilliertem Wasser (Milli-Q-Plus PF-Anlage, Fa. Millipore, Eschborn) angesetzt. Die pH-Werte werden mit konzentrierter Salzsäure beziehungsweise mit 0,5 M Natronlauge bei Raumtemperatur eingestellt.

Alle Lösungen, die für spektroskopische Messung benutzt werden, werden mittels einer Membran-Vakuumpumpe (Fa. Vacuubrand, Wertheim) durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Supor-200, Fa. Pall Gelman Laboratory, Dreieich) filtriert.

2.4 Mikroorganismen

Die Mikroorganismen *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) erworben.

Diese Mikroorganismen werden als Testorganismen und als Provokateure des Cheliceraten-Immunsystems eingesetzt. Außer lebenden Hefezellen kommen dabei auch Lipopolysaccharide als LPS-Lösung und Zymosan-Überstand zum Einsatz. Zymosan besteht aus leeren Hefezellen, sogenannten 'ghost cells'. Eine Zymosan-Lösung von 10 mg/ml wird 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand dann in die Tiere injiziert. Auch LPS wird in einer Konzentration von 2 mg/ml und Mengen von 70 µl bis 80 µl langsam seitlich in das Opisthosoma injiziert.

Nährmedium für Bakterien

5 g Pepton
3 g Fleischextrakt
1000 ml H₂O
pH 7,0

Medium für Agarplatten

5 g Pepton
3 g Fleischextrakt
15 g Agar
1000 ml H₂O
pH 7,0

Nährmedium für Hefe

3 g Hefeextrakt
3 g Malzextrakt
5 g Pepton
10 g Glucose
1000 ml H₂O

Medium für Agarplatten

3 g Hefeextrakt
3 g Malzextrakt
5 g Pepton
10 g Glucose
15 g Agar
1000 ml H₂O

Sterile Nährlösung wird mit den Mikroorganismen angeimpft. Unter Schütteln (Kreisschüttler Yellow Line OS 10 basic, Fa. IKA-Werke, Staufen) wachsen die Mikroorganismen bei Raumtemperatur. In der exponentiellen Wachstumsphase (nach etwa zwei Tagen) wird circa 50 µl Bakterien- beziehungsweise Hefelösung in das sterile, handwarme Agarplattenmedium überführt und in einer sterilen Petrischale zu einer circa 3 mm bis 4 mm dicken Schicht ausplattiert. In das abgekühlte Agar werden mit einer sterilen, abgeschnittenen Pipettenspitze Löcher gestanzt. Die Löcher werden mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt. Das Wachstum der Mikroorganismen beziehungsweise die Wachstums-Hemmung durch die Testlösung bei 30°C wird beobachtet.

2.5 Antikörper

Alle polyklonalen Antiseren gegen Hämocyanine stammen aus den Beständen unserer Arbeitsgruppe. Sie wurden in Kaninchen gezogen und sind zum Zeitpunkt der Versuche ein bis zehn Jahre alt.

2.6 Tiere und Tierhaltung

Die Tiere leben in 20 cm hohen rechteckigen (35 cm x 23 cm) Plastikwannen mit Deckel, deren Boden mit einer Schicht aus Sand und Torf bedeckt ist. Gehalten werden die Tiere bei 23°C, der Wechsel von Licht und Dunkel erfolgt in einem 12 Stunden-Rhythmus. Sie werden jede zweite Woche mit einem Heimchen gefüttert. Wasser steht nach Belieben zur Verfügung. Tierhaltung und Blutentnahme werden wie gesetzlich gefordert angezeigt und durchgeführt.

2.6.1 Skorpion

Die Skorpione der Art *Pandinus imperator* (Familie *Scorpionidae*) wurden von Tropenhaus T. Marxen (Hamburg) bezogen und im Institut gehalten.

2.6.2 Vogelspinne

Die Vogelspinnen der Art *Eurypelma californicum* (Familie *Aviculariidae* / *Theraphosidae*) wurden von der Firma North Carolina Biological Supply (Charlotte, USA) bezogen und werden unter den gleichen Bedingungen wie die Skorpione gehalten.

2.6.3 Pfeilschwanzkrebs

Hämolymphe vom Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Markl (Zoologisches Institut, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt.

2.6.4 Heuschrecke

Adulte Wanderheuschrecken der Art *Locusta migratoria* wurden von Fauna Exotica, Mainz, bezogen.

2.7 Gewinnung der Hämolymphe und Gelfiltration

Die Hämolymphe wird von erwachsenen Tieren entnommen. Nach Möglichkeit werden größere Tiere ausgewählt, die sich nicht gerade gehäutet haben; das Geschlecht wird nicht berücksichtigt.

Die Tiere werden circa 15 min bei 4°C gekühlt, danach wird die Hämolymphe von *Pandinus imperator* durch eine dorsale Punktion des Perikards im Opisthosoma mit einer Kanüle gewonnen. Austretende Hämolymphe wird mit einer Pasteurpipette aufgenommen und mit Pandinus-Puffer (Verhältnis 1:5) auf Eis gelagert.

Bei *Eurypelma californicum* wird die Hämolymphe ebenso gewonnen; auch sie wird in eisgekühltem Eurypelma-Puffer verdünnt.

Die Hämolymphe wird anschließend bei 4°C mit 10 280 g für 15 Minuten zentrifugiert (siehe Kapitel 2.11.1), um zelluläre Bestandteile und Verschmutzungen zu beseitigen.

Die weitere Reinigung der Cheliceraten-Hämolymphe findet auf einer Sephacryl S 300 Säule (HiPrep 16/60 oder 26/60, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einem Durchmesser von 16 mm beziehungsweise 26 mm und einer Länge von 60 cm statt, die an einen UV-Detektor und an einen Fraktionssammler (Modell 2128, Fa. Bio-Rad, München) angeschlossen ist.

Die Säule wird durch eine Biologic FPLC-Pumpe (Fa. Bio-Rad) betrieben und durch die mitgelieferte Software gesteuert. Etwa 4 ml des Hämolymp-Überstands wird auf die Säule gebracht und mit Pandinus- beziehungsweise Eurypelma-Puffer bei einer Flussrate von 0,25 cm/min drucklos eluiert. Die Fraktionen werden im Fraktionssammler aufgefangen und bei 4°C gelagert.

Alternativ kann die Hämolymphe auch direkt nach der Punktion in Ringer-Lösung gesammelt, gereinigt und aufbewahrt werden. Damit kommt das Hämocyanin nicht mit der Puffer-substanz Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) in Kontakt. Standardmäßig wurde bei Versuchen dieser Arbeit Hämocyanin in Tris-HCl-Puffer verwendet; kam Hämocyanin in Ringer-Lösung zum Einsatz, wird speziell darauf hingewiesen.

Analytische Chromatographien werden mit einer Superose 6 HR 10/30 Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Das Protein wird mit einer Flussrate von 0,38 cm/min eluiert. Zur Trennung der Untereinheiten wird eine Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule (26/15) mit einem Gradienten im Elutionsmittel (Dissoziationspuffer) aus KCl durchgeführt (Tabelle 15).

2.8 Dissoziation und Dialyse

Zur Dissoziation des Hämocyanins in seine Untereinheiten wird entweder eine Dialyse durchgeführt oder das Hämocyanin direkt mit dem mindestens 15-fachen Volumen an Dissoziationspuffer (Hämocyanin-Endkonzentration maximal 1 mg/ml) versetzt. Nach zwei Tagen bei 4°C ist das Hämocyanin in seine Untereinheiten zerfallen.

Für Dialysen werden „Visking“ Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet (Fa. Roth, Karlsruhe). Die Dialysen erfolgen bei 4°C unter ständigem Rühren für zwei Tage gegen ein mindestens 1000-faches Puffervolumen bei einer maximalen Hämocyanin-Konzentration von 1 mg/ml. Nach drei Stunden wird der Puffer zum ersten Mal, nach einem Tag zum zweiten Mal ausgetauscht.

2.9 Proteinfällung

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kapitel 2.13.4) werden die Hämolymp-Proteine in Trichloressigsäure und Aceton nach folgendem Protokoll gefällt:

- maximal 50 µl LPS (10 mg/ml) pro Spinne injizieren
- nach 24 h Hämolymphe entnehmen, 10 mM EDTA dazugeben (10 % des Volumens)
- zentrifugieren (19 000 g) für 5 min bei Raumtemperatur
- Überstand in neues Cap überführen, je 100 µl mit 260 µl 100 % Aceton vortexen
- je 360 µl mit 40 µl 100 % Trichloressigsäure vortexen
- bei -20°C für 10 min inkubieren

- zentrifugieren (19 000 g) für 10 min bei 4°C
 - Überstand verwerfen, Pellet zerkleinern
 - mit 500 µl 100 % Aceton vortexen
 - bei -20°C für 10 min inkubieren
 - zentrifugieren (19 000 g) für 10 min bei 4°C
 - Überstand verwerfen, Pellet zerkleinern
 - in 0,5 ml bis 1 ml 8 M Harnstoff aufnehmen und kräftig vortexen
 - bei Raumtemperatur für circa 2 h schütteln
 - zentrifugieren (19 000 g) für 20 min bei 20°C
 - Überstand in neues Cap überführen
 - Lagerung bei -20°C
- } Zentrifugation, Waschen und Vortexen einmal wiederholen

2.10 Konzentration von Proteinproben

Proteinproben im nativen Zustand werden mit Zentrifugalfiltern der Firma Millipore (Biomax 30K, Fa. Millipore, Eschborn) bei 4 000 g in der Kühlzentrifuge konzentriert. Die Filtermembran der Zentrifugalfilter konzentriert nur Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 30 kDa. Flüssigkeiten und kleinere Proteine passieren die Membran ungehindert.

2.11 Zentrifugation

2.11.1 Tischzentrifugen

Für die Abpelletierung von Partikeln und Aufkonzentrierung von Proben werden temperierbare Tischzentrifugen benutzt. Bei dieser Zentrifugation wird je nach Probenvolumen und notwendiger Beschleunigung eine Kühlzentrifuge Universal 16R mit Rotor 1614 (max. 15 000 rpm) und Rotor 1624 (max. 4 000 rpm), Universal 32R mit Rotor 1617 (max. 5 000 rpm) (beide Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) oder Z 233 MK-2 (max. 22 000 rpm) (Fa. Hermle Labortechnik, Wehingen) verwendet.

2.11.2 Analytische Ultrazentrifuge

Durch die analytische Ultrazentrifugation kann eine Aussage über die Reinheit der Probe und deren Qualität (Protein in nativer Form oder dissoziiert) getroffen sowie der Aggregationszustand und das Molekulargewicht einer Probe bestimmt werden ^[151]. Moleküle mit unterschiedlicher Größe sedimentieren im Schwerfeld unterschiedlich schnell, was im Sedimentationsdiagramm (Interferenzdiagramm) verfolgt werden kann.

Für die Sedimentationsläufe wird eine analytische Ultrazentrifuge (Optima XL-I Analytical Ultrazentrifuge, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) mit Interferenz- und Absorptionsoptik verwendet. Eingesetzt wird der Rotor AN 50 Ti (Fa. Beckman Coulter). Die Läufe wurden im Vaku-

um durchgeführt. Temperatur, Rotorgeschwindigkeit und Dauer der Zentrifugation werden im Ergebnisteil angegeben.

Die Zellen für einen Sedimentationslauf bestehen aus zwei Kammern für den Referenzpuffer links (420 µl) und die Probe rechts (400 µl). Durch den Füllunterschied kann der Meniskus der Probe genau festgelegt werden.

Im Sedimentationslauf wird das Protein hohen Zentrifugalkräften ausgesetzt, wodurch es sedimentiert. Die Sedimentationsfront wird in kurzen Zeitabständen bestimmt.

Die Auswertung der Sedimentationsläufe erfolgt mit der Software „UltraScan“ (Version 6.0) ^[151-153] auf Basis der Empfehlung der Software-Hersteller. Die Dichte der Lösungen wird hinsichtlich der einzelnen Pufferkomponenten korrigiert. Mit den „enhanced Van Holde-Weischet“-Analysen ^[151] werden die Sedimentationskurven in einzelne Fraktionen unterteilt und für jeder dieser Fraktionen ein eigener apparenter Sedimentationskoeffizient errechnet:

$$S_b = \ln \left(\frac{r_b(t)}{r_a(t_0)} \right) \cdot (\omega^2 \cdot (t - t_0))^{-1}$$

S_b = apparenter Sedimentationskoeffizient
 t = Zeit
 r_b = Radius der Fraktion
 r_m = Radius des Meniskus
 ω = Winkelgeschwindigkeit

Die apparenten Sedimentationskoeffizienten der Fraktionen können bei Extrapolation nach van Holde-Weischet linear gefittet (Zeit gegen unendlich) und damit eine Korrektur der Sedimentationskoeffizienten gegen die Diffusion vorgenommen werden. Das Ergebnis ist ein korrigierter Sedimentationskoeffizient.

2.12 Spektroskopie

2.12.1 Absorptionsspektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren werden an einem Zweistrahl-Absorptionspektrometer (Cary 300, Fa. Varian, Palo Alto, USA) aufgenommen. Hierfür werden Quarzküvetten (Suprasil, Fa. Hellma, Müllheim) mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet. Die Probe wird vor der Messung so in Puffer verdünnt, dass die maximale Extinktion kleiner als 1 wird. Das Spektrometer ist mit einem thermostatisierten Küvettenhalter ausgestattet.

Zur Konzentrationsbestimmung werden UV-Absorptionsspektren für Wellenlängen von 250 nm bis 400 nm aufgenommen. Der Hämocyanin-Gehalt einer Probe wird mittels Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280nm}) ermittelt. Durch den bekannten spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ kann die Hämocyaninkonzentration der jeweiligen Probe ermittelt werden.

Für das Hämocyanin von *E. californicum* wird der Extinktionskoeffizient aus Loewe und Linzen 1973 ^[154] mit $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,10 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ verwendet, bei *P. imperator* wird aufgrund des unbekannten Extinktionskoeffizienten von einem Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,0 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ ausgegangen.

Bei Arthropoden-Hämocyanin können zur Beurteilung der Probe die Extinktionsverhältnisse $^{250\text{ nm}}/_{280\text{ nm}}$ und $^{340\text{ nm}}/_{280\text{ nm}}$ herangezogen werden. Das Verhältnis $^{250\text{ nm}}/_{280\text{ nm}}$ ist bei intaktem *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin etwas kleiner als 0,5; größere Werte entstehen durch hohen Streulichtanteil, der durch denaturierte und aggregierte Hämocyanin-Moleküle bedingt ist. Das Extinktions-Verhältnis $^{340\text{ nm}}/_{280\text{ nm}}$ liegt bei oxygeniertem *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin bei Werten zwischen 0,26 und 0,24. Kleinere Werte werden durch Verschmutzungen oder Verlust des aktiven Zentrums verursacht.

2.12.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren werden an einem Fluoreszenz-Spektrometer (F-4500, Fa. Hitachi, Tokyo, Japan) aufgenommen. Das Gerät ist mit einem thermostatisierten Küvettenhalter ausgestattet. Die Fluoreszenz wird im rechten Winkel zum einfallenden Anregungslicht gemessen. Es werden Halbmikro-Quarzküvetten (Fa. Hellma, Müllheim) mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet. Bei Fluoreszenzspektren sollte die Protein-Konzentration nicht zu hoch gewählt werden, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch den „Inner Filter“-Effekt zu vermeiden.

Um Fluoreszenz- und Absorptionsspektren von deoxygeniertem Hämocyanin aufnehmen zu können, werden die Hämocyanin-Lösungen auf Uhrgläsern ausgebreitet und für 90 min in einem Atmosbag (Fa. Sigma, Deisenhofen) unter N_2 -Atmosphäre inkubiert. Ein Sauerstoffgehalt von 0,2 % (circa 200 Pa O_2) wird für zwei Stunden aufrechterhalten, danach werden die Lösungen in Küvetten mit Schraubverschluß überführt. Das Fehlen der Absorptionsbande bei 340 nm zeigt die erfolgte Deoxygenierung an.

2.12.3 Circulardichroismusspektroskopie

Messungen des Circular dichroismus werden mit einem CD-Spektrophotometer (CD 6, Fa. Jobin Yvon) bei 20°C durchgeführt. Die Spektren werden in 0,5 nm Schritten zwischen 180 nm und 260 nm aufgenommen. Die Integrationszeit pro Datenpunkt beträgt eine Sekunde, die Bandbreite des Doppelmonochromators 2 nm. Für die Messungen werden Quarzküvetten mit 0,1 cm Kantenlänge (Fa. Hellma, Müllheim) benutzt. Die Konzentration des oligomeren Hämocyanins beträgt 0,2 mg/ml. Sämtliche Spektren werden jeweils um den Pufferwert korrigiert.

Die Auswertung erfolgt mit dem Freeware-Programm „CDPro 2004“. Dabei wird das in ΔA aufgenommene Spektrum des Proteins in $\Delta \epsilon$ umgerechnet und auf Molekulargewicht und

Aminosäurezahl normiert. Nach eventueller Korrektur des Abszissen-Abstandes wird dieses Spektrum mit einem Set aus 56 Proteinen bekannter Sekundärstruktur verglichen und die relativen Anteilen (f) der reinen Spektren (α -Helix, β -Faltblatt und random coil) im gemessenen Spektrum mit drei verschiedenen Algorithmen (Selcon3, Contin und CDSSTR) bestimmt:

$$\theta_{\text{Protein}}(\lambda) = f_{\alpha}\theta_{\alpha}(\lambda) + f_{\beta}\theta_{\beta}(\lambda) + f_{\text{rc}}\theta_{\text{rc}}(\lambda).$$

Bei der mehrfachen Auswertung des gleichen Datensatzes weichen die Ergebnisse von Contin, Selcon3 und CDSSTR im Durchschnitt 0,6 %, maximal 1,5 % voneinander ab.

2.12.4 Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie wird zur Bestimmung von metallischen Elementen eingesetzt. Das Prinzip der Atomabsorption beruht darauf, dass Atome, die aus Salzen in einer Flamme erzeugt werden, in der Lage sind Licht zu absorbieren. Die Absorption findet auf der gleichen Wellenlänge statt, auf der diese Atome Licht auch emittieren.

Die Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie an einem 5100 ZL (Fa. Perkin Elmer, USA) wurde freundlicherweise am Institut für Analytische Chemie und Anorganische Chemie (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

Untersucht wird die Hämolymphe von vier Skorpionen, die bei 4°C mit 10 280 g für 15 Minuten zentrifugiert und mit Aqua dest. verdünnt wurde.

2.13 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung. Sie kann sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt werden. Der Elektrophorese liegt zugrunde, dass Teilchen, die eine Nettoladung besitzen, im elektrischen Feld wandern. Die Beweglichkeit der Teilchen ist abhängig von Teilchenform und -größe, der Temperatur sowie dem Widerstand, der den Teilchen durch das Trennmedium entgegengesetzt wird ^[155].

Das wichtigste Trennmedium für die Elektrophorese von Proteinen ist Polyacrylamidgel. Zur Charakterisierung des Gels wird die Gesamtmenge an Acrylamid in Prozent angegeben. Je höher die Prozentigkeit des Gels, desto geringer ist seine Porengröße, und desto besser eignet es sich zur Auftrennung kleinerer Moleküle.

Es wird unterschieden zwischen Sammelgel, das der Probenkonzentrierung dient, und dem Trenngel, in dem die eigentliche Separierung der Moleküle von statten geht. Das Trenngel kann eine gleichförmige Zusammensetzung haben (homogenes Gel), oder einen Porengradienten besitzen (Gradientengel).

2.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert, indem es stöchiometrisch an das Polypeptid-„Rückgrat“ bindet, Wasserstoffbindungen zerstört, hydrophobe Wechselwirkungen blockiert und für eine partielle Entfaltung des Proteins sorgt. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, in denen die Menge an gebundenem SDS und damit auch die zusätzliche negative Ladung proportional zum Molekulargewicht des Proteins sind. Durch β -Mercaptoethanol werden Schwefelbrücken zerstört, Erhitzen der Probe in Gegenwart von SDS vervollständigt die Denaturierung und Beladung der Probe mit dem Detergenz ^[156].

Gelelektrophorese-Lösungen	SDS-PAGE	native PAGE
Sammelgel (3 %)		
Rotiphorese (Gel 30)	1 ml	1 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Aqua dest.	6,15 ml	6,35 ml
10 % SDS	200 μ l	
TEMED	40 μ l	40 μ l
APS	300 μ l	300 μ l
Trenngel (7,5 %)		
Rotiphorese (Gel 30)	3,5 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml
Aqua dest.	6,51 ml	6,79 ml
10 % SDS	280 μ l	
TEMED	28 μ l	28 μ l
APS	420 μ l	420 μ l

Tabelle 2: Lösungen und Pipettierschrift für Gelelektrophorese.

Mengen jeweils für zwei Minigele mit 7,5 % Acrylamid).

Die SDS-PAGE basiert auf dem System von Laemmli ^[157] modifiziert nach See und Jackowski ^[158]. Der Sammelgelpuffer enthält 0,5 M Tris (pH 6,8), der Trenngelpuffer 1,5 M Tris (in der Regel pH 8,8, optional auch 7,5). Der Laufpuffer besteht aus 20 mM Tris und 150 mM Glycin. Bei Trenn- und Sammelgel werden homogene Acrylamidkonzentrationen benutzt; erstere enthalten 7,5 % T (Gewichtsprozent Gesamtmenge Acrylamid), letztere 3 % T (Pipettierschema Tabelle 2).

Pro Sammelgeltasche werden beim Minigel circa 30 μ l Probe aufgetragen, die 1:1 mit Denaturierungspuffer (25 % Sammelgelpuffer, 40 % SDS-Lösung (10 %), 20 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert wurde.

Der Laufpuffer besteht aus 20 mM Tris mit 150 mM Glycin und 0,08 % SDS. Bei diesen Minigelen wird die Elektrophorese bei Raumtemperatur und einer Spannung von 100 V durchgeführt.

2.13.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die native PAGE basiert ebenfalls auf dem 1970 von Laemmli eingeführt System ^[157] ohne SDS nach See und Jackowski ^[158], wobei allerdings in Sammelgel, Trenngel und Laufpuffer das SDS weggelassen wird (Pipettierschema Tabelle 2).

Die Proben werden nicht durch Hitze und Detergenzien denaturiert, sondern 1:4 mit Probenpuffer aus 50 % Glycin und 1 % Bromphenolblau in Aqua dest. versetzt. Die Elektrophorese wird bei diesen Minigelen bei einer Temperatur von 4°C und einer Spannung von 100 V durchgeführt.

2.13.3 Gradientengele

Im Gegensatz zu den Minigelen mit homogenen Acrylamidkonzentrationen werden bei Gradientengelen diskontinuierliche Acrylamidkonzentrationen verwendet. Dabei wird das System von Laemmli ^[157] nach Hames ^[159] modifiziert.

Die Gradientengele haben eine Größe von circa 14 cm x 16 cm bei einer Dicke von 1 mm. Die gleichen Puffer und Lösungen wie bei den Minigelen werden verwendet.

Der lineare Gradient entsteht durch ein Zwei-Kammer-Mischsystem mit einer Pumpe: Das Trenngel mit der niedrigeren Konzentration wird als erstes von unten in die Gelkammer gepumpt. Durch Öffnen des Ventils zwischen den beiden Kammern des Gradientengelmischers entsteht durch die Mischung der beiden Acrylamidlösungen mit unterschiedlicher Prozentigkeit ein ansteigender Gradient.

Die Elektrophorese von Gradientengelen wird bei einer Spannung von 100 V für das Einlaufen ins Sammelgel und mit 180 V bei der Trennung im Trenngel durchgeführt.

2.13.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verknüpft. So können komplexe Proteingemische durch die Kombination der beiden orthogonal zueinander ausgeführten Trenntechniken besonders hochauflösend analysiert werden.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (Abteilung Angewandte Entomologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt.

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die zu untersuchenden Proteine auf der Basis ihres relativen Gehalts saurer und basischer Aminosäurereste aufgetrennt. Sie wurde durchgeführt mit Ettan IPGphor II und einer Ettan DALTsix Electrophoresis Unit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Dazu werden IPG-Stripes mit einem nicht-linearen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 11 verwendet. Sie quellen mit 2 µl IPG-Puffer und 450 µl Probe (circa 1 mg Protein, mit 8 M Harnstoff auffüllen) und überschichtet mit Cover-Fluid über Nacht. Die Fokussierung erfolgt in mehreren Schritten (Tabelle 3).

IEF	Spannung	Dauer
1) Schritt	500 V	1 h
2) Gradient	500 V - 1000 V	8 h- 12 h
3) Gradient	1000 V - 8000 V	3 h
4) Schritt	8000 V	4 h
5) Schritt	100 V	1 h

Tabelle 3: Isoelektrische Fokussierung.

2. Dimension: Tris-Tricin-PAGE

Nachdem die Stripes zwei Mal für je 10 min in Äquilibrator-Puffer (50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 2 % SDS, 30 % Glycerin, pH 8,0) inkubiert worden sind, werden die Gelstreifen mit den isoelektrisch aufgetrennten Proteinen auf die Kante eines SDS-Polyacrylamidgels gelegt und die Proteine senkrecht zur ersten Dimension nach ihrer Größe getrennt.

Der Laufpuffer besteht aus 0,1 M Tris (pH 8,3), 100 mM Tricin und 0,1 % SDS in der oberen und 0,2 M Tris (pH 8,9) in der unteren Pufferkammer. Das Tris-Tricin-Gel (Pipettierschema Tabelle 4) läuft bei 20°C und einer Spannung von 120 V über Nacht.

Lösungen	Menge
Acrylamid 30 %	230 ml
Gelpuffer (3M Tris, 0,3 % SDS, pH 8,5)	150 ml
Glycerin 86 %	40 ml
Aqua dest.	30 ml
TEMED	2,5 ml
APS	0,5 ml

Tabelle 4: Lösungen und Pipettierschema für Tris-Tricin-PAGE.

Mengen jeweils für sechs Gele.

2.14 Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese zur Bestimmung von Verwandtschaftsbeziehungen der Hämocyane wird nach der Methode von Weeke durchgeführt ^[160]. Für die Gelzubereitung wird in der ersten Dimension eine 1 % (w/v) Agarose-Lösung in 120 mM Veronalpuffer (pH 8,6) verwendet. Für die zweite Dimension werden zu der gleichen Gellösung verschiedene Mengen Antiserum zugegeben. Als Trägermaterial für die Agarosegele wird „Gelbond Film“ (Fa. FMC BioProducts, Maine, USA) verwendet. Durchgeführt wird die Elektrophorese in einer LKB 2117 Multiphor-Apparatur (Fa. Pharmacia LKB, Freiburg).

Immunelektrophorese-Lösungen	Zusammensetzung
Veronalstammlösung	103 g Na-Veronal in 2 l H ₂ O lösen; dann 20 g Veronal einwiegen, unter Erhitzen in 2 l H ₂ O lösen und auf 5 l auffüllen
Agaroselösung (1%)	2 g Agarose M 40 ml Veronalstammlösung 160 ml H ₂ O kochen bis die Lösung klar ist
Laufpuffer	1:5-Verdünnung der Veronalstammlösung mit H ₂ O
Kochhsalz-Waschlösung	0,6 % NaCl (6 g/l) in H ₂ O
Färbelösung	0,5 % Coomassie G 250 (5 g/l) 40 % Methanol 10 % Eisessig
Entfärbelösung	40 % Isopropanol 10 % Eisessig

Tabelle 5: Lösungen für Immunelektrophorese.

Färbeschritt	Dauer
pressen und trocknen mit Papiertüchern	5 min
waschen	10 min
pressen und trocknen mit Papiertüchern	5 min
trocknen mit einem Fön	15 min
färben in der Färbelösung	5 min
waschen mit H ₂ O	1 min
entfärben in Entfärbelösung	bis Hintergrund entfärbt ist
waschen mit H ₂ O	5 min
trocknen mit einem Fön	15 min

Tabelle 6: Färbvorschrift für die Immunelektrophorese.

2.15 Western Blot

Bei dieser Blotting-Technik handelt es sich um eine elektrophoretische Technik, bei der die Laufrichtung orthogonal zur Gelebene steht. Beim Blottingverfahren wird das nachzuweisende Molekül an der Oberfläche des Trägers (hier: Nitrocellulosemembran) adsorbiert und ist damit mechanisch relativ stabil und für Reaktionspartner in Lösung leicht zugänglich.

Beim Blotten nach dem Semi-Dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson wird mit einem Transferpufferreservoir aus angefeuchtetem Filterpapier und relativ geringen Stromstärken gearbeitet ^[155].

Western-Blot-Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	39 mM Glycin pH circa 8,7 48 mM Tris 0,037 % SDS 20 % Methanol
Ponceaurot S	3 % Trichloressigsäure 3 % Sulfosalicylsäure 0,2 % Ponceau S
TBS (Tris-buffered Saline)	10 mM Tris pH 7,4 140 mM NaCl
TBST (TBS + Tween)	0,3 % Tween 20 in TBS
Magermilchlösung	10 g Magermilchpulver in 200 ml TBST
Entwicklungspuffer	100 mM Tris pH 9,5 1M NaCl 50 mM MgCl ₂
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	50 mg/ml BCIP in DMF
NBT (<i>p</i> -Nitrobluetetrazolium)	50 mg/ml <i>p</i> -NBT in 70 % (v/v) DMF
Entwicklerlösung	1 ml Entwicklungspuffer 33 µl BCIP 66 µl NBT 9 ml Aqua dest.

Tabelle 7: Lösungen für Western Blot.

Ein wie in Kapitel 2.13.1 beschriebenes SDS-Gel wird direkt nach dem Lauf für 30 min in Transferpuffer inkubiert; die Nitrocellulosemembran (Protran, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) wird ebenfalls 30 min in Transferpuffer eingeweicht. In der Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Fa. Bio-Rad) werden zehn in Transferpuffer

getränkte Filterpapiere (Fa. Schleicher und Schuell) in Gelgröße, darauf die Nitrocellulosemembran, das Gel und wiederum zehn Lagen Filterpapier zwischen Anode und Kathode platziert. Die für 2 h angelegte Stromstärke (Power Supply 200/2.0, Fa. Bio-Rad) hängt von der Größe des Gels ab: Man verwendet 0,8 mA pro Quadratzentimeter Gel.

Nach dem Transfer erfolgt durch eine Minute Inkubation eine Anfärbung aller Proteine mit Ponceaurot S-Lösung. Die Membran wird danach kurz in TBST gewaschen. Die noch freien Proteinbindungsstellen des Nitrocelluloseträgers werden 1 h bis 2 h mit einer Magermilchlösung geblockt.

Es folgt eine mindestens zweistündige Inkubation mit dem primären Antikörper (Blocklösung und Antikörper in 1 000:1-Verdünnung aus 10 ml Blocklösung und 10 µl Antiserum); die ungebundenen Antikörper werden danach vier Mal je zehn Minuten wieder in TBST abgewaschen. Zum Nachweis erfolgt eine zweistündige Inkubation mit sekundärem Antikörper (Blocklösung und Anti-Kaninchen-Antikörper in 10 000:1-Verdünnung aus 20 ml Blocklösung und 2 µl Antiserum), der ebenfalls abgewaschen wird. Sichtbar gemacht werden die Banden in Entwicklerlösung mit dem sekundären Antikörper.

Der zweite Antikörper (Antikörper IgG Anti-Rabbit, A-3687, Fa. Sigma, Steinheim) ist gegen den Primär-Antikörper gerichtet und mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert. Bei der Inkubation mit NBT und BCIP bilden die Farbstoffe ein Substrat für die alkalische Phosphatase. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten und durch die alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag; gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettcs Präzipitat. Die zunächst nur schwach gelbe Entwicklerlösung führt überall dort, wo alkalische Phosphatase an die Proteine gebunden ist, zu einer blauviolettcs Färbung.

Die Adsorptionsmenge und -festigkeit der Proteine an die Oberfläche der Nitrocellulosemembran ist abhängig von der Art des Proteins und lässt daher nur eine semiquantitative Auswertung zu.

2.16 Anfärben von Proteinen nach Gelelektrophorese

2.16.1 Coomassie-Färbung

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele für mindestens eine Stunde in Coomassie-Lösung (5 g/l Coomassie G 250 in Aqua dest., 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Die Proteine werden durch das Methanol denaturiert und im Gel fixiert, und bilden mit dem Farbstoff einen stabilen Komplex. Beim Waschen in wässriger Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) wird überflüssiger Farbstoff wieder entfernt, bis die blauen Banden deutlich auf dem entfärbten Gel zutage treten.

Über diese Methode kann circa ein Mikrogramm eines Proteins pro Bande nachgewiesen werden.

2.16.2 Silberfärbung

Die Anfärbung von Protein-Gelen mit Silber ist empfindlicher als die Färbung mit Coomassie; hier ist eine um das zehn- bis hundertfach geringere Proteinmenge ausreichend.

Bei der Silberfärbung nach Blum, Beier und Gross^[161] werden die Proteine durch eine 50 % wässrige Methanol-Lösung im Gel fixiert. Das Methanol wird danach wieder mit einer 5 % Methanol-Lösung und Wasser ausgewaschen. Nach kurzer Inkubation in Enhancer-Lösung (Tabelle 8) wird das Gel in frischer Färbe-Lösung gefärbt. Anschließendes Waschen verhindert eine zu starke Hintergrundfärbung. Danach wird das Silbernitrat, das sich vor allem an die Proteine gebunden hat, in Entwickler-Lösung zu elementarem Silber reduziert und fällt aus. Die Reaktion wird mit der Stop-Lösung beendet.

Lösungen	Zusammensetzung	Inkubationsdauer	
		Minigel	großes Gel
50 % Methanol-Lösung	50 % Methanol 10 % Essigsäure	mindestens 1 h	mindestens 1 h
5 % Methanol-Lösung	5 % Methanol 7 % Essigsäure	20 min	30 min
Enhancer-Lösung	1 mM Natrium-Thiosulfat	20 min	30 min
Aqua dest.		3 mal 20 s	3 mal 1 min
Färbe-Lösung	2 g/l Silbernitrat 0,075 % Formaldehyd	20 min	30 min
Aqua dest.		3 mal 20 s	3 mal 1 min
Entwickler-Lösung	566 mM Na ₂ CO ₃ 160 mM Na-Thiosulfat 0,05 % Formaldehyd	Gel beobachten	Gel beobachten
Stop-Lösung	2 M Zitronensäure	Gel beobachten	Gel beobachten
Farmer'sche Abschwäch-Lösung	5 g/l Kaliumhexacyanoferrat (III) 8 g/l Na-Thiosulfat	völlige Entfärbung	völlige Entfärbung

Tabelle 8: Lösungen und Arbeitsschema für die Gelfärbung mit Silber.

Nach der Methode von Blum, Beier und Gross^[161].

Wenn das Gel überfärbt wurde, kann es mit der Farmer'schen Abschwächlösung wieder entfärbt werden. Die gelbe Lösung muss danach gut abgewaschen werden, dann kann ab dem Schritt mit Enhancer-Lösung neu gefärbt werden.

Die Färbezeiten für Minigele und größere Gradientengele sind unterschiedlich lang.

Auch mit Coomassie gefärbte Gele können mit Silber überfärbt werden; der erste Schritt besteht dann in dreimaliger 30 min Inkubation in 50 % Methanol-Lösung.

2.17 Nachweismethoden für Phenoloxidasen

Zum Nachweis von Phenoloxidase-Aktivität werden zwei unterschiedliche Assays verwendet: der „Dopachrom“-Assay und der „MBTH“-Assay (siehe Kapitel 2.17.1 und 2.17.2).

Unter dem Einfluss der natürlich vorkommenden Phenoloxidasen wird Tyrosin zu Dopa hydroxyliert und dann zu Dopachinon oxidiert. Danach zyklisiert es zum Teil autokatalytisch, zum Teil unter Beteiligung weiterer Enzyme (Tyrosin-related protein TRP-1 / DHICA-Oxidase und TRP-2 / Dopachrom-Tautomerase) zu Dopachrom und Indol-5,6-Chinon und polymerisiert schließlich nach weiteren Intermediärprodukten zu Melanin ^[56, 58].

Beim Nachweis von Phenoloxidasen wird aufgrund ihrer sehr guten Löslichkeit in der Regel Tyramin als Substrat für Monophenolhydroxylase-Aktivität und Dopamin als Substrat für Diphenoloxidase-Aktivität verwendet. Weitere verwendete Substrate sind Tyrosin, L-Dopa, 4-Methylphenol (*p*-Cresol), 4-*tert*-Butylphenol und 2,4-*di-tert*-Butylphenol.

Diphenole wie Dopamin reagieren in neutraler Lösung mit Sauerstoff spontan und ohne die Notwendigkeit von Katalyse durch Metallionen (Abbildung 8). Dabei entstehen stöchiometrische Mengen H_2O_2 und Dopaminochrom, das unter Sauerstoffverbrauch weiter zu Melanin reagiert. Die Autooxidation kann, wenn keine Metallionen wie Fe^{3+} oder Cu^{2+} vorhanden sind, durch Ansäuerung des Mediums verhindert werden ^[162].

Die starke Autooxidation von Dopamin und L-Dopa macht bei spektroskopischen Untersuchungen die Messung eines Leerwerts zur Feststellung der Autooxidation notwendig.

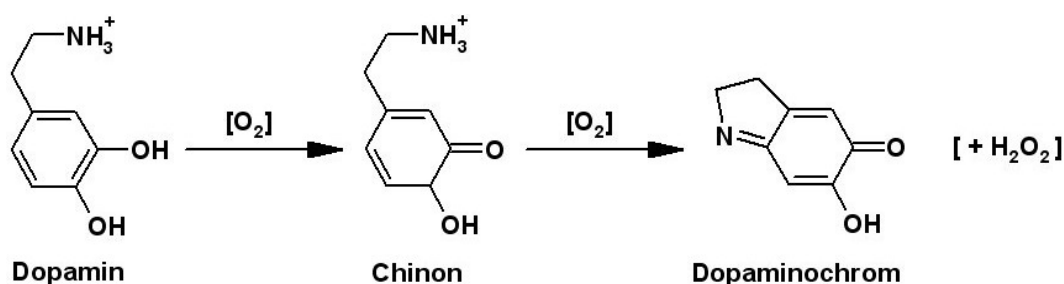


Abbildung 8: Autooxidation von Dopamin (nach ^[162]).

2.17.1 Dopachrom-Assay

Eine oft benutzte Methode zum Nachweis von Diphenoloxidasen ist der Dopachrom-Assay ^[163, 164]. Dabei wird spektroskopisch die Bildung des rötlichen Dopachroms bei 475 nm als Maß für die Enzym-Aktivität verfolgt (molarer Absorptionskoeffizient $\epsilon_{475 \text{ nm}} = 3\,700 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$). Der Vorteil dieses Assays ist, dass keine weiteren Reagenzien für die Nachweisreaktion benötigt werden (Abbildung 9 links).

Dopachrom ist in wässriger Lösung jedoch instabil und reagiert nichtenzymatisch weiter zu Melanin ^[162], das zum spektroskopischen Nachweis nur bedingt geeignet ist, da es kein distinktes Absorptionsmaximum besitzt, sondern in einem weiten Wellenlängenbereich absorbiert ^[56].

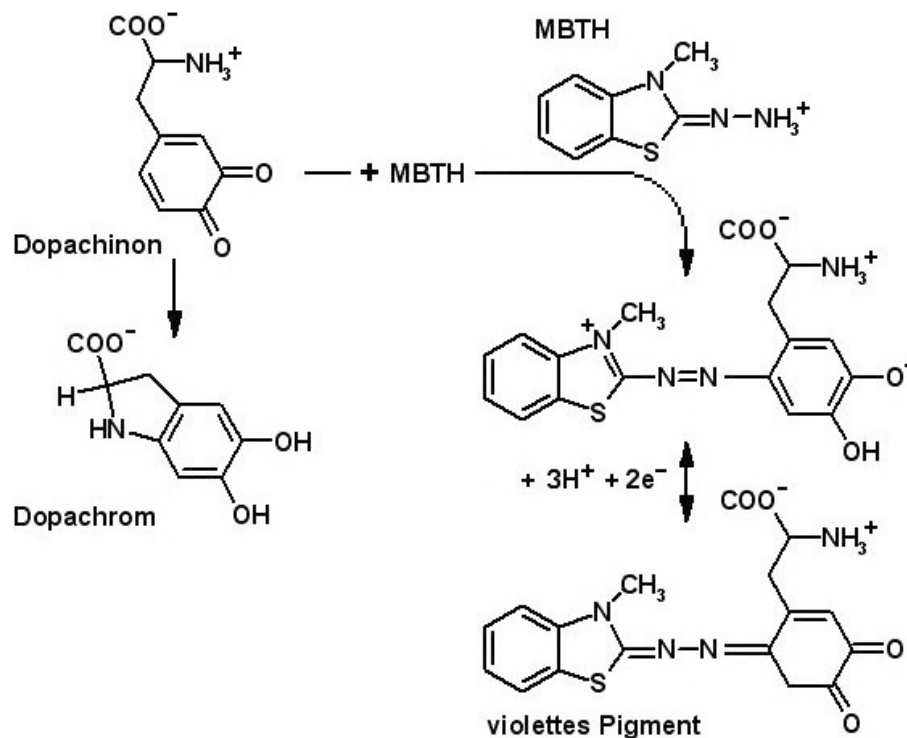


Abbildung 9: Farbreaktionen des Dopachrom- und MBTH-Assays.

2.17.2 MBTH-Assay

Mit MBTH (3-Methyl-2-Benzo-Thiazoenone-Hydrazone) reagiert Dopachinon zu einem violetten Pigment, das eine weitere Oxidation des Dopachinons zu Melanin verhindert. Bei dieser Michael-Addition bildet sich ein violetter Komplex (Abbildung 9 rechts), der auch im extrem sauren Milieu (pH 1) über eine Stunde stabil ist und die Zyklisierung zum Dopachrom und Weiterreaktion zu Melanin verhindert. Er bietet mit seinem hohen Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{505 \text{ nm}} = 29\,000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ ein sieben Mal empfindlicheres Testverfahren als der Dopachrom-Assay ^[165].

2.17.3 Anfärben von Phenoloxidasen nach Gelelektrophorese

Die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin kann nach Nellaiappan und Vinayakam ^[165] im Gel sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Gel nach der Elektrophorese für 10 min bis 15 min in 0,1 M Phosphat-Puffer (62 mM Na₂HPO₄, 38 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) inkubiert, um den alkalischen Elektrophoresepuffer (pH 8,8) zu ersetzen. Durch den neutralen Puffer wird bei Diphenolen eine starke Hintergrundfärbung durch Autooxidation im Elektrophoresepuffer vermieden. Danach wird das Gel in einer Färbelösung aus Puffer, 3,3 mM Substrat und Aktivator (0,1 mM SDS) inkubiert. In der Regel zeigen sich erste Ergebnisse, abhängig von der Aktivität des Enzyms, bereits nach circa 30 min.

Eventuell kann auch noch MBTH (0,3 % in Ethanol) zugegeben werden; es verstärkt die Färbung, kann sie aber auch vollständig unterdrücken ^[166].

Im Zuge dieser Arbeit werden neben dem in der Literatur vorgeschriebenen Phosphat-Puffer weitere Puffer-Medien mit verschiedenen Salz-Konzentrationen verwendet, so zum Beispiel 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) oder Eurypelma-Puffer.

2.17.4 Dot Blot zum Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität

Zur Überprüfung der Phenoloxidase-Aktivität in den verschiedenen Hämocyanin-Proben oder in der Hämolymphe kann ein Dot Blot angewendet werden. Diese Methode lehnt sich an den Nachweis von Phenoloxidasen von Winder ^[163, 164] und Nellaiappan und Vinayakam ^[165] an (Dopachrom- und MBTH-Assay, Kapitel 2.17.1 und 2.17.2) und ermöglicht auf eine schnelle und unkomplizierte Art die qualitative Untersuchung einer Vielzahl von Proben.

Auf einer PVDF Membran (Sequi-Blot PVDF Membrane, Fa. Bio-Rad) werden 2 µl einer Färbelösung (500 µl Aktivator, 500 µl MBTH (0,3 % in Ethanol, optional) und 3,3 mM Substrat in 0,1 M Puffer) mit 2 µl Probensubstanz versetzt.

In verschiedenen Blots kann durch Auswahl eines geeigneten Aktivators und Substrats die Phenoloxidase im Hämocyanine aktiviert werden. Diese enzymatische Aktivität führt in der Probe zur Entstehung von Melanin oder des violetten Farbkomplexes aus Dopachinon und MBTH und damit zur Anfärbung der Blots.

2.18 Hämocyanin-Aktivierung durch SDS

2.18.1 Stabilität von Hämocyanin gegenüber SDS

Bei der Aktivierung von Hämocyanin mit SDS ist es wichtig zu wissen, bei welchen SDS-Konzentrationen das Protein denaturiert wird.

Das Hämocyanin soll so weit aufgefoldet werden, dass der Zugang zum aktiven Zentrum in Domäne II frei wird, das Protein aber sonst noch möglichst vollständig in seiner Struktur er-

halten bleibt. Es gilt hier, bei diesen parallel verlaufenden Prozessen einen Mittelweg zwischen Denaturierung und Aktivierung und damit einen Bereich optimaler SDS-Konzentration zu finden.

Getestet werden das Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* und der Spinne *Eurypelma californicum* in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) und verschiedenen Salz- und SDS-Konzentrationen. Die Hämocyanin-Konzentration bleibt konstant, in der Regel bei einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml.

Bei einer konstanten Temperatur von 25°C wird die Hämocyanin-Probe über einen Zeitraum von mehreren Stunden inkubiert. Von dem Hämocyanin werden entweder alle 5 min Spektren von 260 nm bis 400 nm aufgenommen oder native Gele angefertigt.

Auswertung der Absorptionsquotienten

Der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ dient als Maß für die Oxygenierung beziehungsweise die relative Stabilität des Hämocyanins gegenüber dem denaturierenden Agens: Die Protein-Konzentration (gemessen bei 280 nm) bleibt konstant, während die Absorption des aktiven Zentrums (340 nm), des empfindlichsten Teils des Proteins, als Sensor für die Strukturveränderung dient. Leichte, durch Streuung verursachte Absorptionzunahme wird dabei vernachlässigt. Das Absorptionsverhältnis $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ zu Versuchsbeginn beziehungsweise der Mittelwert aller gemessenen Hämocyanine (Tabelle 12) dient als Ausgangswert und 100 % Stabilität.

Die zeitabhängige Stabilität des aktiven Zentrums gegenüber SDS wird anhand der Oxygenierung folgendermaßen untersucht: Aus dem Absorptionswert bei 280 nm zum Versuchsbeginn (t_0) und den nachfolgenden Messwerten bei 340 nm kann mit dem Quotienten $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ die relative Stabilität in Prozent errechnet werden. Dabei dient das Absorptionsverhältnis $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ zum Versuchsbeginn (t_0) beziehungsweise die empirisch erhobenen Werte von intaktem Hämocyanin als Ausgangswert mit 100 %.

Durch Absorptionsuntersuchungen von deoxygeniertem Hämocyanin kann das Verhältnis $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ bei 0 % Sauerstoffbeladung festgestellt werden (Tabelle 19).

Als Relativwert ausgedrückt ist Hämocyanin bei einem Absorptionsquotienten von 100 % voll oxygeniert, bei noch etwa 15 % (*P. imperator*) beziehungsweise etwa 8 % (*E. californicum*) des Quotienten maximal deoxygeniert.

Zur Vereinfachung wird bei weiteren Auswertungen der Absorptionsquotient von 15 % beziehungsweise 8 % in einen Oxygenierungsgrad von 0 % umgerechnet.

Der Absorptionsquotient kann sich natürlich auch aufgrund anderer Vorgänge ändern: Denaturierung (greift vor allem am aktiven Zentrum an und verringert den Quotienten); Streuung (durch Denaturierung) oder Verschmutzung zeichnen sich besonders in den niedrigen Wellenlängenbereichen ab und lassen den Wert von $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ steigen. Daher wird der Wert dieses Absorptionsquotienten zu Versuchsbeginn ebenfalls als repräsentativer Wert für 0 %

Streuung und die Änderung der Absorption bei 250 nm beziehungsweise die Veränderung von $\frac{250\text{ nm}}{280\text{ nm}}$ als Maß für die Streuung und Denaturierung aufgezeichnet.

2.18.2 Aktivierung von Hämocyanin: Spektroskopische Messungen

Die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin kann außer im Gel, in dem der Nachweis eher qualitativ erfolgt, auch spektroskopisch und damit quantitativ bestimmt werden. Die starke Autooxidation von Dopamin und L-Dopa macht vor der eigentlichen Untersuchung die Aufnahme eines Leerwerts zur Feststellung der Autooxidation notwendig, der dann vom eigentlichen Messwert abgezogen wird. Tyramin und andere Monophenole autooxidiert nicht.

Der Zusatz von MBTH im Ansatz macht den Test erheblich empfindlicher, allerdings auch die Autooxidation besser sichtbar.

Bei spektroskopischen Messungen wird bei einer konstanten Temperatur die Absorption wie in der Literatur angegeben ^[163-165] bei $\lambda = 475\text{ nm}$ für Versuche ohne MBTH, bei $\lambda = 505\text{ nm}$ für Versuche mit MBTH verfolgt.

Iterative Spektren zur Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin zeigen mehrere Absorptionsmaxima. Die Substrate Tyramin, Tyrosin, L-Dopa und Dopamin absorbieren Catechol-typisch in einem Bereich von 274 nm bis 280 nm. Die enzymatische Oxidation von L-Dopa beispielsweise verläuft laut Mason ^[167] in drei chromogenen Phasen, die durch ihre Absorptionsmaxima charakterisiert werden: In der ersten Phase entsteht aus Dopachinon (Chinon $\lambda_{\text{Abs}} = 305\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Abs}} = 395\text{ nm}$ bis 400 nm ^[168, 169]) Dopachrom, das bei 305 nm und 475 nm absorbiert. In der zweiten Phase ist die Absorption bei 300 nm und 540 nm maximal, die letzte Phase zeichnet sich durch generelle Absorptionszunahme (Melaninbildung, λ_{Abs} 280 nm bis $> 700\text{ nm}$ ^[56, 62]) aus.

Absorption bei Wellenlängen größer als 500 nm ist charakteristisch für Michael-Additionen ^[168, 170], wie sie durch das MBTH verursacht werden.

Bei den Versuchen in dieser Arbeit liegen die Absorptionsmaxima nicht genau bei den in der Literatur angegebenen Wellenlängen. Weder die Tyrosinase-Aktivität einer echten Tyrosinase (Mushroom-Tyrosinase) noch die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin stimmt unter den gewählten Versuchsbedingungen (Kapitel 3.4.5.1, Tabelle 24) in ihren maximalen Absorptionswerten mit den Literaturwerten überein. Iterative Spektren zeigen Absorptionen bei reproduzierbaren Wellenlängen (beispielsweise: Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin bei 300 nm und 460 nm bis 475 nm, Mushroom-Tyrosinase bei 300 nm und 465 nm bis 480 nm, Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin mit MBTH bei 492 nm bis 513 nm, Mushroom-Tyrosinase mit MBTH bei 460 nm bis 513 nm).

Trotzdem wurden, da kinetische Untersuchungen eine feste Wellenlänge erfordern, die Literaturwerte gewählt und bei 475 nm beziehungsweise bei 505 nm gemessen.

Auswertung der Aktivierungskinetiken von Hämocyanin

Für die Bestimmung von optimalen Effektorkonzentrationen zur maximalen Aktivierung der Phenoloxidase existieren verschiedene Möglichkeiten. So kann beispielsweise der Endwert der Absorption, also der Endwert der Färbung nach einer definierten Inkubationszeit als Maß für die Aktivität benutzt werden. Diese Methode ist für den Dopachrom-Assay ungeeignet, da die spektroskopische Bildung des rötlichen Dopachroms bei 475 nm als Maß für die Enzym-Aktivität zwar gut verfolgt werden kann, Dopachrom in wässriger Lösung jedoch instabil ist, nichtenzymatisch weiter zu Melanin reagiert und sich damit der Detektion wieder entzieht.

Die schlichte Messung eines Maximalwertes kommt der kinetischen, also der zeitlichen Beobachtung des Reaktionsablaufes nicht entgegen. Ebenso fallen Abweichungen in der Konzentration von Enzym (Hämocyanin) oder Substrat deutlich ins Gewicht. Im Gegensatz dazu fallen bei der Messung der maximalen Steigung als Indikator für die enzymatische Aktivität diese Konzentrationsabweichungen nur wenig auf.

Aus den Ausgangsdaten der Graphen für die Kinetik wird die Steigung m für Intervalle von 3 s berechnet; der Zeitpunkt der maximalen Steigung als Wert für die enzymatische Aktivität bei einer bestimmten Effektorkonzentration wird bestimmt. Um lokale Unregelmäßigkeiten auszugleichen, wird an den Teil des Graphen, der aus den Messwerten von 30 s vor dem Zeitpunkt maximaler Steigung bis zu 30 s danach besteht, eine lineare Trendlinie angelegt. Die Steigung dieser Trendlinie stellt das Maß für die maximale Aktivität dar.

Gegebenenfalls wurde die Steigung für abweichende Zeitintervalle berechnet; dies wird dann explizit angegeben.

Jeder Ansatz wurde mehrfach untersucht (zwei- bis sechsmal). Daher liegen für jede Effektorkonzentration bis zu sechs Werte für die stärkste Aktivität vor, aus denen ein Mittelwert gebildet werden kann.

Der Standardfehler σ des Mittelwertes kann aus der Standardabweichung dividiert durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfangs errechnet werden. Trägt man den Standardfehler zu beiden Seiten des Mittelwertes auf, liegt mit etwa 67%-iger Wahrscheinlichkeit der Mittelwert der Grundgesamtheit in diesem Intervall.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{N_x^2}}$$

mit σ = Fehler für den Mittelwert
 $\bar{x}$ = Mittelwert
 x_i = Einzelwerte
 N_x = Stichprobenumfang

2.19 Vesikelherstellung aus Liposomen

Alle Lipide werden in Chloroform gelöst in Glasgefäßen, mit Argon überschichtet, bei -24°C gelagert. Zur Vesikelherstellung werden die Lipide (Gesamtlipidkonzentration 2 mg/ml) mit einer Hamilton-Spritze in einen 25 ml-Flask mit Chloroform gegeben. Die Lösung wird unter einem sehr schwachen Stickstoffstrom getrocknet; der trockene Lipidfilm wird unter erhöhtem Stickstofffluss eine weitere halbe Stunde getrocknet.

Nach dem Trocknen wird der Lipidfilm in 1 ml Tris-Puffer (0,1 M, pH 7,8) durch circa 45 min Vortexen gelöst. Es bilden sich GMV (gigant multilamellar vesicles). Zur Herstellung kleinerer Vesikel wird die GMV-Lösung fünfzehnmal durch einen Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Fa. Alabaster, Alabama) mit 100 nm Filter gepresst.

Die Liposomengröße wird durch dynamischen Lichtstreuung (Kapitel 2.20) überprüft.

Die Lagerung der Vesikel erfolgt im Kühlraum bei 4°C, ihre Größe bleibt circa eine Woche konstant.

Bestimmung der Phospholipid-Konzentration

Zur Bestimmung der Phospholipid-Konzentration dient der Stewart-Assay nach Torchilin ^[171, 172]: Phospholipide bilden mit Ammoniumferrothiocyanat einen farbigen Komplex, der bei 485 nm photometrisch detektiert werden kann.

Mittels einer Kalibrierungsgerade lässt sich die Phospholipid-Konzentration einer Liposomenlösung bestimmen. Da der Extinktionskoeffizient des Phospholipid-Ammoniumferrothiocyanat-Komplexes von den verwendeten Phospholipiden abhängt, muss für jede verwendete Lipidkomposition eine Kalibrierungsgerade erstellt werden.

Die Probe der Vesikel wird in Chloroform 20-fach verdünnt; ebenso verschiedene Konzentrationen der Eichlösung. Diese Lösung wird mit derselben Menge Ammoniumferrothiocyanat (0,1 M) überschichtet, 1 min gevortext und dann 5 min mit 300 g zentrifugiert. Aus der organischen Phase wird die Lösung in eine Quarzküvette überführt und die Absorption bei 485 nm gemessen.

Aus den Absorptionswerten der verschiedenen Konzentration der Eichlösung wird eine Kalibrierungsgerade erstellt, an der die Lipidkonzentration der Liposomenprobe abgelesen werden kann.

2.20 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als quasielastische Lichtstreuung oder Photonen-Korrelationsspektroskopie bezeichnet, ist eine gute Methode zur Partikelgrößenbestimmung.

Beim Durchstrahlen einer Probe mit Licht wird dieses nicht nur durch Absorption abgeschwächt, sondern auch durch Streuung. Die Ursache liegt bei verschiedenen physikali-

schen Phänomenen wie Brechung, Beugung und Reflexion, die eine Ablenkung des Lichtstrahls von seinem ursprünglichen Weg bewirken.

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung kleinste Schwankungen der Intensität des gestreuten Lichtes registriert. Diese Schwankungen werden durch die Brown'sche Molekularbewegung der Moleküle in Lösung verursacht, wobei die Beweglichkeit kleinerer Moleküle höher ist als die von großen Molekülen oder Teilchen. Gemessen wird die zeitliche Schwankung der Streulichtintensität, die mit den Fluktuationen der Anzahldichte der Teilchen im Streuvolumen zusammenhängt. Dadurch kann man Informationen über den Diffusionskoeffizienten beziehungsweise die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen und Partikelgrößenverteilungen erhalten. Dieser Zusammenhang wird beschrieben durch die Einstein-Stokes-Gleichung ^[173]:

$$D = \frac{\kappa \cdot T}{3\pi \cdot \eta d} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{ll} D &= \text{Diffusionskonstante} \\ \kappa &= \text{Boltzmannkonstante} \\ T &= \text{Temperatur} \\ \eta &= \text{Viskosität des Mediums} \\ d &= \text{hydrodynamischer Teilchendurchmesser} \end{array}$$

Die bei der dynamischen Lichtstreuung gemessene Streulichtintensität wird anhand einer Autokorrelation analysiert, die durch eine Exponentialfunktion beschrieben wird:

$$g = I + \xi \cdot e^{-2DK^2 \tau} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{ll} g &= \text{Autokorrelation des Signals} \\ I &= \text{Streulichtintensität} \\ \xi &= \text{Gerätekonstante} \\ D &= \text{Diffusionskonstante} \\ K &= \text{Wellenvektor des Streulichts} \\ \tau &= \text{Zeit} \end{array}$$

Da sich kleine Partikel schneller bewegen als große Partikel, nimmt g bei kleinen Molekülen schneller ab. Aus dieser Autokorrelation kann dann d, der Teilchendurchmesser, berechnet werden ^[173].

Zur Aufnahme und Verarbeitung der Messdaten wird ein Zetasizer Nano der Firma Malvern und die Software „DTS-Nano 3.00“ benutzt. Wenn nicht anders beschrieben, werden bei jeder Messung circa 60 µl unverdünnter Probe eingesetzt. Zur Bestimmung der Liposomenvesikelgröße wird die Probe zehnfach verdünnt. Für die Messungen wird der Typ „Size“ oder „Volume“ zur Ermittlung der Teilchengröße bei konstanter Temperatur (25°C oder 20°C) mit zehn Messdurchgängen von je 10 s Dauer verwendet.

2.21 Nachweis der Lysozym-Aktivität

Lysozym (Muramidase, Mucopolysaccharid-Glucohydrolase, *N*-Acetylmuramyl-Hydrolase) spaltet die β -(1,4)-glykosidische Bindung zwischen *N*-Acetylmuraminsäure (MNAc) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts der Zellwand Gram-positiven Bakterien. Zum Nachweis der Lysozym-Aktivität wird ein Testverfahren der Firma Sigma, Steinheim, benutzt. Dazu wird in 66 mM K_2HPO_4 -Puffer (pH 6,24) eine Suspension aus *Micrococcus luteus* (früher: *M. lysodeikticus* (M-3770, Fa. Sigma)) mit einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,7 bei 450 nm hergestellt. Zu dieser Bakterien-Lösung wird die zu untersuchende Probe beziehungsweise Lysozym (Positivkontrolle mit einer Aktivität von 348 U/ml) zupipettiert. Die Hydrolase-Aktivität des Lysozyms wird turbidimetrisch beziehungsweise photometrisch anhand der Absorptionsabnahme (eigentlich: Abnahme der Trübung aufgrund Zerstörung der Bakterien) bei 450 nm bei Raumtemperatur verfolgt.

2.22 Azocoll-Assay zum Nachweis von Protease-Inhibitoren

Zum Nachweis von Protease-Inhibitoren wird der Azocoll-Assay eingesetzt ^[174]. Azocoll ist ein unlösliches Kollagen, an das ein roter Farbstoff gekoppelt ist. Wird das Azocoll hydrolysiert, so nimmt die Absorption bei Wellenlängen zwischen 415 nm und 515 nm zu.

Azocoll wird in einer Konzentration von 15 mg/ml in einem Puffer aus 50 mM Tris (pH 7,5) und 1 mM $CaCl_2$ gelöst und eine Stunde lang unter Rühren gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 10 000 g wird das Kollagen im gleichen Volumen mit frischem Puffer erneut gerührt. Nach einer zweiten Zentrifugation und erneuter Resuspension muss die Lösung klar und farblos sein.

Die Proteasen Thermolysin und Trypsin liegen in einer Konzentration von 5 μ g/ml vor, die Inhibitoren EDTA (inhibiert die Metalloprotease Thermolysin) und Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, inhibiert Trypsin) in Ethanol in Konzentrationen von 10 mM und 1 mM.

Für den Testansatz werden in einer Mikrotiterplatte 20 μ l, 2 μ l oder 0,2 μ l Hämolymphe, 60 μ l Protease und 60 μ l Azocoll zusammenpipettiert (Gesamtvolumen 180 μ l). Bei der Kontrolle wird Hämolymphe durch die Protease-Inhibitoren ersetzt.

Die Platte wird bei 35°C circa 50 min inkubiert und die Absorption der Überstände wird bei 520 nm gemessen. Je höher die Extinktion des Ansatzes ist, desto besser konnte Azocoll durch die Proteasen gespalten werden, und umso schwächer ist die inhibitorische Aktivität in der Hämolymphe.

Der Azocoll-Assay wurde am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (Abteilung Angewandte Entomologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt.

2.23 Agglutinierung von Schaferythrocyten

Für diesen Versuch wird eine Schaferythrocyten-Suspension der Firma Fiebig Nährstofftechnik (Idstein) verwendet. Circa 30 mg Erythrocyten werden in einem Puffer aus 10 mM Tris (pH 7,4) und 150 mM NaCl suspendiert und zentrifugiert (10 min, 4°C, 300 g), bis der Puffer Hämoglobin-frei ist.

In ein Gesamtvolumen von 1 ml werden dann 130 µl Schaferythrocyten und verschiedene Volumina an Hämolymphe gegeben und unter langsamem Schütteln für 30 min inkubiert.

2.24 Berechnung der kritischen micellären Konzentration (CMC)

Die Werte der kritischen micellären Konzentration (CMC) von SDS sind von der Elektrolyt-Konzentration abhängig. Für die Salze NaCl, KCl, NaF, NaClO₄, NH₄ClO₄ und Mg(ClO₄)₂ berechneten Dutkiewicz und Jakubowska ^[175] aus empirischen Daten eine Gleichung, mit der die CMC von SDS bei unterschiedlichen Elektrolyt-Konzentrationen bestimmt werden kann (Tabelle 9).

Salz	NaCl, NaF, NaClO ₄	KCl	NH ₄ ClO ₄	Mg(ClO ₄) ₂
Faktor a	0,0078	0,0079	0,0078	0,0078
Faktor b	0,0537	-0,258	0,0466	1,7441
Faktor c	72	82,34	95,45	2088

Tabelle 9: Berechnung der kritischen micellären Konzentration (CMC) von SDS in Abhängigkeit der Elektrolyt-Konzentration (nach ^[175]).

Empirisch aufgenommene CMC-Werte in Abhängigkeit der Salz-Konzentration stellen einen Graphen dar, der durch die Gleichung $y = (a + bx) / (1 + cx)$ beschrieben wird. Dabei stellt x die Salz-Konzentration in mol/l und y die CMC dar.

3 ERGEBNISSE

3.1 Physikochemische Charakterisierung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Strukturelle Daten zu Skorpion-Hämocyanin sind von *Androctonus australis* und *Buthus indicus* bekannt ^[44, 45, 176]; über das 24-mere Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* dagegen gibt es nur wenige Informationen. Es werden zunächst einige physikochemische Eigenschaften des Skorpion-Hämocyanins vorgestellt; zum Vergleich wird das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* herangezogen.

3.1.1 Reinigung durch Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Hämolymphe von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* wird auf einer Sephacryl S-300 Säule 26/60 gereinigt. Dabei wird immer die gepoolte Hämolymphe von fünf bis sechs Tieren verwendet. Die photometrische Detektion der Proteine im Säuleneluat erfolgt bei 280 nm und 340 nm (Abbildung 10).

Bei beiden Spezies besteht die Hämolymphe zum größten Teil aus Hämocyanin (knapp 85 % des Gesamtproteingehalts) (Tabelle 10). Weiterhin findet sich in der Hämolymphe ein nichtrespiratorisches Protein (NRP), dessen Funktion weitgehend unbekannt ist ^[177].

Das Elutionsprofil beider Cheliceraten-Spezies zeigt mehrere Proteinfractionen, von denen der jeweils erste mit der höchsten Absorption das Hämocyanin enthält. Dies wird belegt durch die Absorption bei 340 nm, die nur bei diesem Peak auftritt und für oxygenierte Kupferkomplexe, wie das Hämocyanin sie enthält, charakteristisch ist.

Im Elutionsprofil von *Eurypelma californicum*-Hämolymphe folgt dem Hämocyanin ein zweiter niedriger Peak, der durch das bisher noch nicht genauer untersuchte Begleitprotein (auch bezeichnet als nichtrespiratorisches Protein, NRP) hervorgerufen wird. Diesem Begleitprotein fehlt bei der Messung eines Absorptionsspektrums das für Hämocyanin charakteristische

	Hämocyanin	nichtrespiratorisches Protein	
<i>Pandinus imperator</i>	85 %	15 %	* 11 % und 4 %
<i>Eurypelma californicum</i>	86 %	14 %	

Tabelle 10: Anteile der Hämolymphe-Proteine bei Größenausschlusschromatographie über S-300 Sephadex.

Mittelwerte von zwei Hämolymphe-Isolierungen.

* Nichtrespiratorisches Protein 1 und 2 kann nur bei guter Auflösungs- und Trennleistung der Säule detektiert werden; ansonsten ergibt sich für beide Proteine nur ein Absorptionspeak.

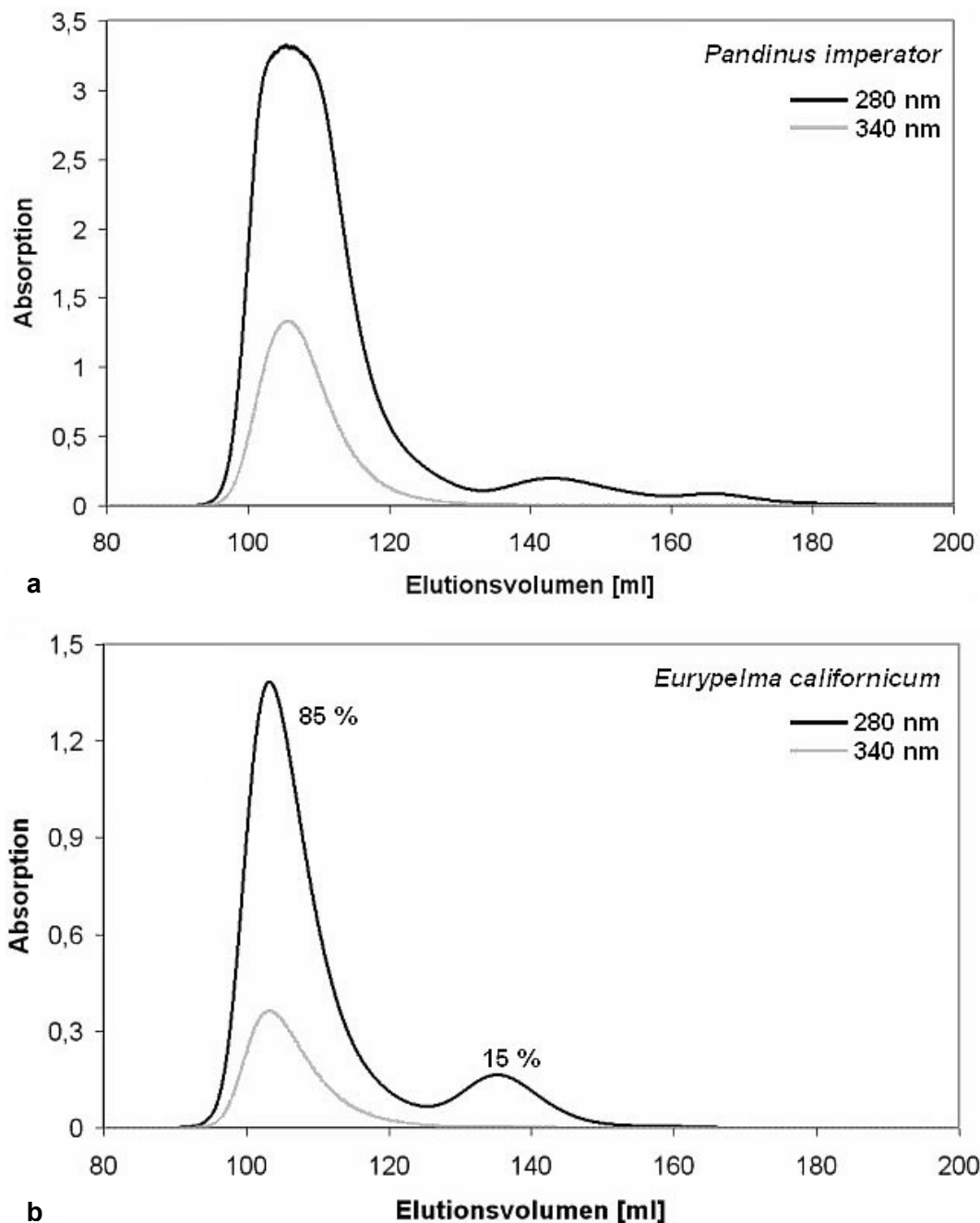


Abbildung 10: Gelfiltration von Cheliceraten-Hämolymphe über eine S-300 Sepacryl (26/60) Säule.

Die Proteine wurden mit *Pandinus*-Puffer (0,1 M Tris, 10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , pH 7,8) beziehungsweise *Eurypelma*-Puffer (0,1 M Tris, 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7,8) und einer Flussrate von 0,25 cm/min eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm und 340 nm (charakteristisch für oxygenierte Typ 3-Kupferzentren) aufgenommen.

a Hämolymphe von *Pandinus imperator*. Die Kurve ist im Gipfelbereich deformiert. Ab einer Absorption von circa 2 werden die Daten unzuverlässig, da hier weniger als 1 % des eingestrahlen Lichtes die Probe durchdringen kann. Daher kann kein prozentualer Anteil des Hämocyanins am Gesamtprotein der Hämolymphe berechnet werden.

b Hämolymphe von *Eurypelma californicum*; mit prozentualen Anteilen am eluierten Protein.

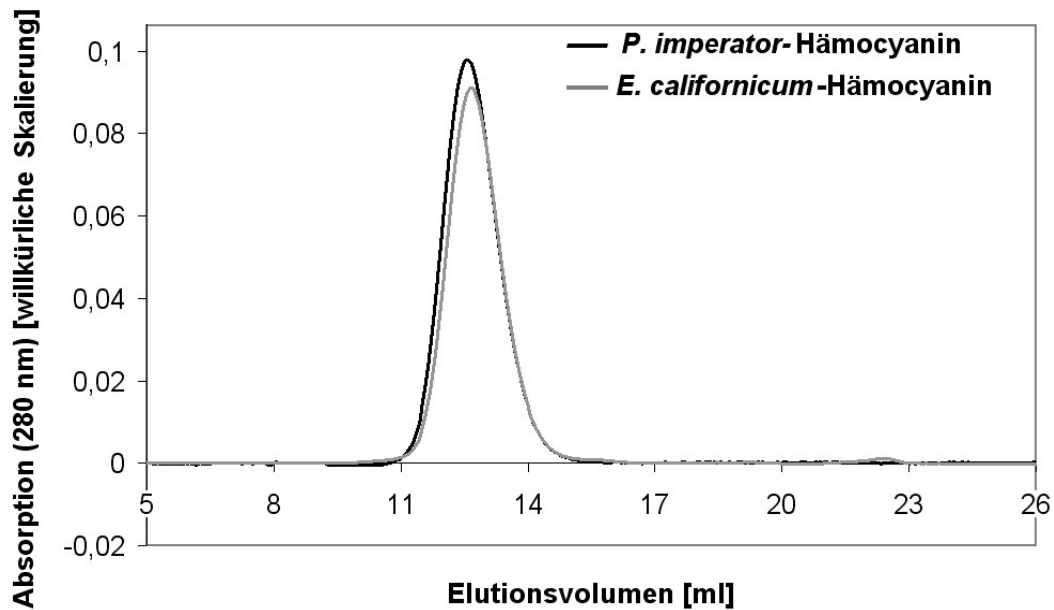


Abbildung 11: Elutionsprofile von gereinigtem Hämocyanin von *P. imperator* und *E. californicum* auf einer 6 HR 10/30 Säule.

Das gereinigte Protein wurde mit einer Flussrate von 0,38 cm/min eluiert. Bei beiden Proteinen sind Elutionsprofil und damit auch die äußere Dimension des Hämocyanins identisch.

Absorptionsmaximum bei 340 nm. Bei der Vogelspinne *E. californicum* dient das Begleitprotein wahrscheinlich als Carrier für eine Carbon-Anhydrase ^[178].

Im Elutionsprofil von *Pandinus imperator*-Hämolymphe eluiert das nichtrespiratorische Protein in zwei Peaks; der erste Peak enthält NRP 1, der zweite NRP 2. Das zweite Begleitprotein NRP 2 kann nur bei guter Auflösungs- und Trennleistung der Säule detektiert werden. Bei den meisten Säulenchromatographien entsteht wie bei *E. californicum*-Hämolymphe nur ein Maximum. Die nichtrespiratorischen Proteine enthalten kein Kupfer und können keinen Sauerstoff binden. Sie sind mit dem Hämocyanin nicht verwandt ^[177].

Sowohl bei dieser präparativen Größenausschlusschromatographie der Hämolymphe als auch bei analytischer Chromatographie beider Hämocyanine auf einer Superose 6-Säule (Abbildung 11) ist das Elutionsprofil für *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin deckungsgleich. Die beiden Proteine entsprechen sich demnach in Molekulargewicht und äußerer Dimension.

3.1.2 Elektronenmikroskopie und dynamische Lichtstreuung

Das identische Elutionsverhalten beider Cheliceraten-Hämocyanine bei der Größenausschlusschromatographie lässt den Schluss zu, dass die Proteine in ihrer Form und Dimension übereinstimmen. Diese Annahme wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hämocyanin von *P. imperator* und dem Vergleich mit seinem Pendant in der Vogel-

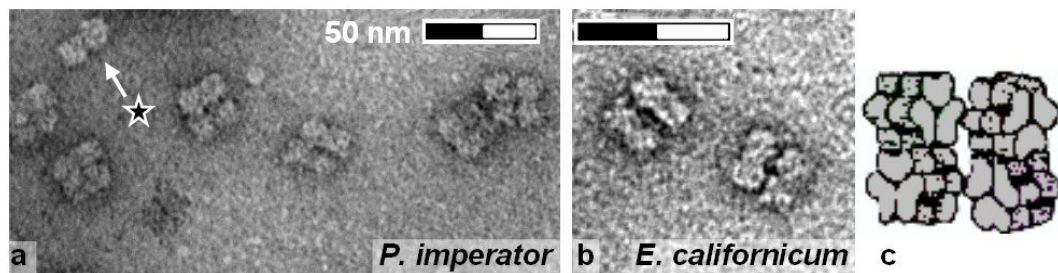


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hämocyanin (Negativfärbung mit Uranylacetat).

a Das Hämocyanin des Skorpions *P. imperator* besteht wie das Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* aus vier Hexameren. Bei der Aufsicht auf das 24-mer (gekennzeichnet durch ★) sind nur zwei der Hexamere zu sehen (auch möglich bei Dissoziation des Moleküls in dodekamere Halbmerkmale). Aufnahme T. Schweikardt, an einem Tecnai 12 D325 BioTwin TEM (Fa. FEI, Hissboro, USA) mit LaB6-Kathode und 120 kV Beschleunigungsspannung; Kamera MegaView III (Fa. Soft Imaging Systems SIS, Münster). Protein-Konzentration 0,05 mg/ml, Negativkontrastierung durch Uranylacetat.

b Hämocyanin von *E. californicum*, Aufnahme T. Schweikardt.

c schematische Zeichnung aus ^[2].

spinne bestätigt (Abbildung 12): Beide Hämocyanine bestehen aus vier Hexameren mit Abmessungen von circa 20 x 20 x 10 nm.

Mittels dynamischer Lichtstreuung werden Durchmesser von 19,1 nm für das Hämocyanin von *Pandinus imperator* und 19,6 nm für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* festgestellt (Werte bei 20°C, Puffer-korrigiert), die die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie bestätigen.

3.1.3 Analytische Ultrazentrifugation

Das Hämocyanin von *P. imperator* ist in seiner nativen Form ein 24-mer ^[43], ebenso wie das der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Die Ähnlichkeit der äußeren Dimensionen beider respiratorischer Proteine wurde bereits durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, dynamische Lichtstreuung und identisches Elutionsverhalten bei der Reinigung deutlich. Auch bei analytischer Chromatographie der Hämocyanine auf einer Superose 6-Säule (Abbildung 11) ist das Elutionsprofil deckungsgleich. Weitere Informationen zur Molekülgröße und Form können durch Ultrazentrifugation gewonnen werden.

Gereinigtes *Pandinus imperator*-Hämocyanin wird dazu in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Die symmetrischen Kurven der photometrischen Daten in Abbildung 13a zeigen, dass es sich um eine monodisperse Probe mit Molekülen der gleichen Aggregationsgröße handelt. Andere Aggregationsformen können ausgeschlossen werden. Das Hämocyanin wurde folglich rein isoliert.

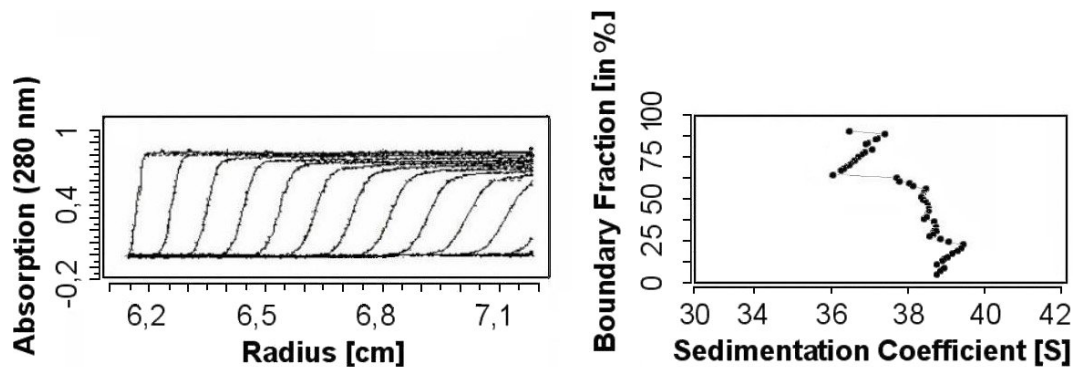


Abbildung 13: Sedimentationsanalyse von gereinigtem *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

- a** Das sedimentierende Protein (circa 0,6 mg/ml) in Pandinus-Puffer wurde bei 280 nm detektiert. Die Umdrehungsgeschwindigkeit betrug 30 000 rpm, die Temperatur 20°C.
- b** Van Holde-Weischet-Analyse und Verteilung der Sedimentationsdaten.

Der Sedimentationskoeffizient von nativem *Pandinus imperator*-Hämocyanin beträgt in Pandinus-Puffer 37,02 S (30 000 rpm, 2 h, 20°C) (Abbildung 13b). Dieser Wert von 37 S ($S_{20, w}$) für natives Hämocyanin von *Pandinus imperator* entspricht dem des Hämocyanins von *Eurytelma californicum*, das einen Sedimentationskoeffizienten von 36,8 S ($S_{20, w}$) (30 000 rpm, 2 h, 20°C) besitzt.

3.1.4 Gelchromatographie

Trotz Übereinstimmung in äußerer Form und Dimension, sowie gleichem Molekulargewicht (beschrieben durch Sedimentationskonstante, dynamische Lichtstreuung, Größenausschlusschromatographie und elektronenmikroskopische Aufnahme) laufen die beiden nativen Hämocyanin-Oligomere von Skorpion und Spinne bei Untersuchung im nativen Polyacrylamidgel unterschiedlich weit ins Gel ein (Abbildung 14). Skorpion-Hämocyanin legt in der Polyacrylamid-Matrix eine weitere Strecke zurück als das Vogelspinnen-Hämocyanin, und hat daher möglicherweise eine größere negative Ladung. Außerdem ist das *P. imperator*-Hämocyanin hinsichtlich seiner oligomeren Struktur deutlich instabiler: Während seiner Wanderung durch die Gelmatrix zerbricht das Hämocyanin zum Teil in dodekamere Halbmoleküle, die dann aufgrund ihrer geringeren Größe noch weiter in die Gelmatrix einwandern. So entstehen in der nativen PAGE eine obere Bande mit dem 24-meren Protein und eine untere Bande mit dodekamerem Hämocyanin. Dieser Zerfall ist allerdings nur ein Laborartefakt, bei Anwesenheit von zusätzlichen Calcium- und Magnesium-Ionen im Gel bricht das *Pandinus*-Hämocyanin nicht auseinander (siehe auch Kapitel 3.1.8).

Inkubation des Cheliceraten-Hämocyanins in 50 mM Glycin und 5 mM EDTA (pH 9,6) führt zu einer Dissoziation des Proteins in seine Untereinheiten, die dann anhand ihrer Laufstrecke in der nativen PAGE identifiziert werden können (Abbildung 14).

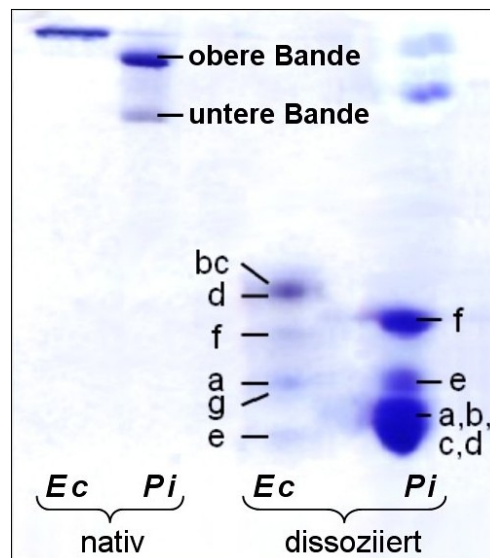


Abbildung 14: Native PAGE mit Hämocyanin von *E. californicum* und *P. imperator*.

Natives Coomassie-gefärbtes Gel (7,5 %, pH 8,8) mit je 20 µg Protein für die Spuren 1-3 und 120 µg für Spur 4. Bezeichnung der Untereinheiten-Typen nach ^[177, 179-181]. Hämocyanin von *P. imperator* zerbricht in der nativen PAGE in eine obere und eine untere Bande, unabhängig davon, ob der pH-Wert des Gels 7,5 oder 8,8 beträgt. Weitere Erläuterungen siehe Kapitel 3.1.8 und Abbildung 36f.

In der denaturierenden SDS-PAGE (Abbildung 15) kann das Gewicht der Hämolymp-Proteine abgeschätzt werden. Nach Untersuchung auf zehn Gelen ergeben sich mittlere Molekulargewichte von 75 kDa bis 62 kDa für die Hämocyane beider Cheliceraten, 120 kDa und 93 kDa für das Begleitprotein von *Eurypelma californicum*, sowie Banden um 274 kDa, 140 kDa und 120 kDa für beide *Pandinus imperator*-Begleitproteine und zusätzliche Banden bei 82 kDa und 77 kDa für *P. imperator*-Begleitprotein 2 (Tabelle 11).

	<i>P. imperator</i>			<i>E. californicum</i>	
	Hc	BP1	BP2	Hc	BP
Molekular- gewicht [kDa]	75,2		271	72,4	
	70,4	277,9	143,7	68,3	120,1
	66,9	136	118,3	65,9	93,4
	63,8	122,3	82,9	62,6	
			77,3		

Tabelle 11: Berechnete Molekulargewichte der Hämolymp-Proteine von *P. imperator* und *E. californicum*.

Die Proteine wurden mittels denaturierender SDS-PAGE (Minigele 7,5 %; Gradientengele von 5 % -10 % und 5 %-12,5 % mit pH 8,8) aufgetrennt und ihr Molekulargewicht in kDa mit der Software QuantityOne bestimmt. Die Proteine bestehen aus mehreren Polypeptidketten unterschiedlichen Gewichts und ergeben daher verschiedene Banden. Mittelwerte aus drei bis zehn Berechnungen; Abkürzungen Hc:Hämocyanin, BP: Begleitprotein. Die Einzelwerte weichen maximal 4 % vom Mittelwert ab.

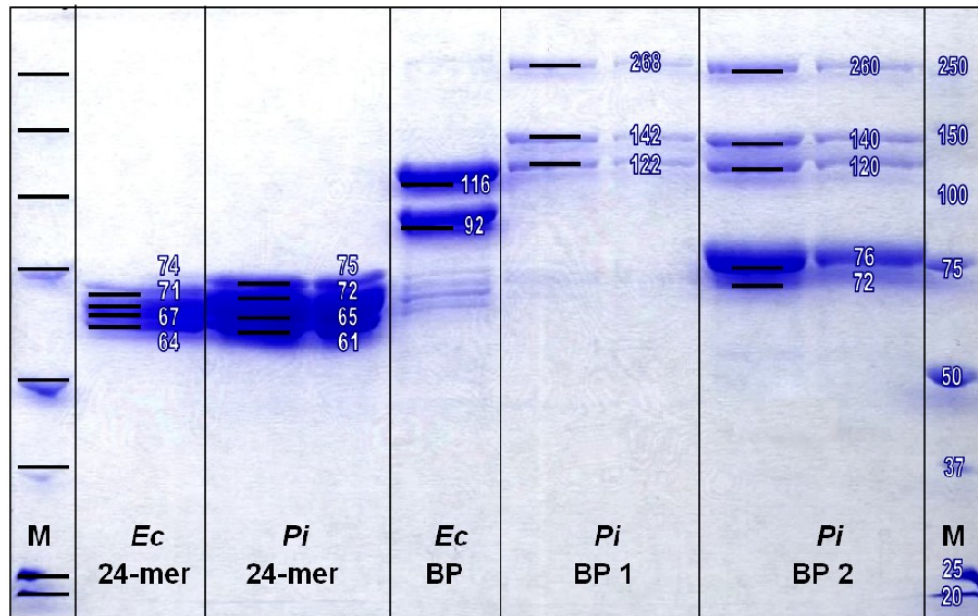


Abbildung 15: Denaturierende SDS-PAGE zur Gewichtsbestimmung der Hämolymphe-Proteine der Cheliceraten *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum*.

SDS-PAGE (7,5 %, pH 8,8) mit 4 µg bis 20 µg Protein je Spur. Molekulargewichte wurden mit der Software QuantityOne und dem BioRad-Marker PrecisionPlus errechnet. Abkürzungen *Ec*: *Eurypelma californicum*, *Pi*: *Pandinus imperator*, BP: Begleitprotein, M: Marker. Die Zahlen entsprechen den errechneten Molekulargewichten in kDa.

Die Hämocyanin-Untereinheiten der Vogelspinne wurden 2000 von Voit et al. ^[8] sequenziert. Aus diesen Sequenzen kann das Molekulargewicht errechnet werden. Für die Untereinheiten ergeben sich Längen von 627 Aminosäuren bis 631 Aminosäuren (cDNA, ohne poly(A)-Schwanz) und Massen zwischen 71,54 kDa und 72,44 kDa (ohne Initiator-Methionin). Die scheinbar verschiedenen Molekulargewichte des Spinnen-Hämocyanins bei den gelelektrophoretischen Untersuchungen spiegeln somit nicht die realen Molekulargewichte der Untereinheiten wider. Dies ist wahrscheinlich auch beim Skorpion-Hämocyanin der Fall; eine Größenordnung der Untereinheiten kann so jedoch abgeschätzt werden.

3.1.5 Absorptionsspektroskopie

In Bezug auf spektroskopische Eigenschaften ähneln sich die Hämocyanine von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* sehr. Beide Proteine weisen neben dem typischen durch aromatische Aminosäuren verursachten Maximum bei 280 nm ein weiteres Maximum bei 340 nm auf. Dieser zweite Absorptionsgipfel wird durch das oxygenierte aktive Zentrum verursacht (*ligand to metal charge transfer complex*) und besitzt einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{340\text{nm}} = 20\,000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$. Der Cu-O₂-Komplex ist auch für ein drittes Absorptionsmaximum verantwortlich, das mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{560\text{nm}} = 1\,000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ um 560 nm sehr viel schwächer ausgeprägt ist, dem oxygenierten

Hämocyanin jedoch seine charakteristische blaue Farbe verleiht ^[52]. Die Absorptionsmaxima bei 340 nm und 560 nm verschwinden, wenn das Hämocyanin dexyogeniert wird.

Zur Beurteilung der Probe können zwei Extinktionsverhältnisse herangezogen werden (Kapitel 2.12.1): Das Extinktions-Verhältnis $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ sollte bei intaktem Hämocyanin kleiner als 0,5 sein; das Verhältnis von $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ bei oxygeniertem *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin sollte bei Werten zwischen 0,26 und 0,24 liegen (empirische Mittelwerte in Tabelle 12).

Die Hämocyanin-Konzentration kann aus der optischen Dichte bei 280 nm und dem molaren Extinktionskoeffizienten ε berechnet werden. Für das Hämocyanin von *E. californicum* wurde der Literaturwert von $\varepsilon_{278\text{ nm}} = 1,1 \text{ ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{cm})^{-1}$ verwendet ^[154]. Tatsächlich liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren beim Hämocyanin der Vogelspinne bei 278 nm, die maximale Absorption des oxygenierten aktiven Zentrums bei 340 nm. Bei Hämocyanin von *P. imperator* liegen diese Maximalwerte bei 278,5 nm und 340 nm (Mittelwert aus zehn untersuchten Proben).

Für *P. imperator*-Hämocyanin wurde für den Extinktionskoeffizienten ein Wert von $1,0 \text{ ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{cm})^{-1}$ angenommen. Im Verlauf meiner Arbeit wurde für dieses Protein der molare Extinktionskoeffizient mit $\varepsilon_{280\text{ nm}} = 1,1\text{-}1,2 \text{ ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{cm})^{-1}$ bestimmt ^[182]. Um den systematischen Fehler bei der Konzentrationsberechnung konstant und gering zu halten, wurde dennoch der Koeffizient von $\varepsilon = 1,0 \text{ ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{cm})^{-1}$ beibehalten.

Hc-Spezies	<i>P. imperator</i>	<i>E. californicum</i>
Quotient OD $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$	0,436 ¹	0,417 ²
Quotient OD $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$	0,242 ³	0,254 ⁴

Tabelle 12: Extinktionsquotienten von intaktem Hämocyanin.

Das Verhältnis $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ ist bei intaktem *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin kleiner als 0,5; größere Werte entstehen durch hohen Streulichtanteil (denaturiertes oder aggregiertes Hämocyanin). Das Verhältnis $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ liegt bei oxygeniertem *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin zwischen 0,26 und 0,24. Kleinere Werte werden durch Verschmutzungen oder Sauerstoffverlust am aktiven Zentrum verursacht.

Mittelwerte aus ¹ 15 Messungen, ² 25 Messungen, ³ 103 Messungen, ⁴ 36 Messungen.

3.1.6 Fluoreszenzspektroskopie

Für Fluoreszenz-Untersuchungen wurde Skorpion-Hämocyanin mit Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt, die Emission wurde von 290 nm bis 500 nm aufgenommen.

Das Emissionsspektrum von *P. imperator*-Hämocyanin unterscheidet sich geringfügig von dem der Vogelspinne *E. californicum* (Abbildung 16). Im Spektrum von oxygeniertem Skorpion-Hämocyanin finden sich zwei Maxima: Ein lokales Maximum bei 304 nm bis 305 nm wird

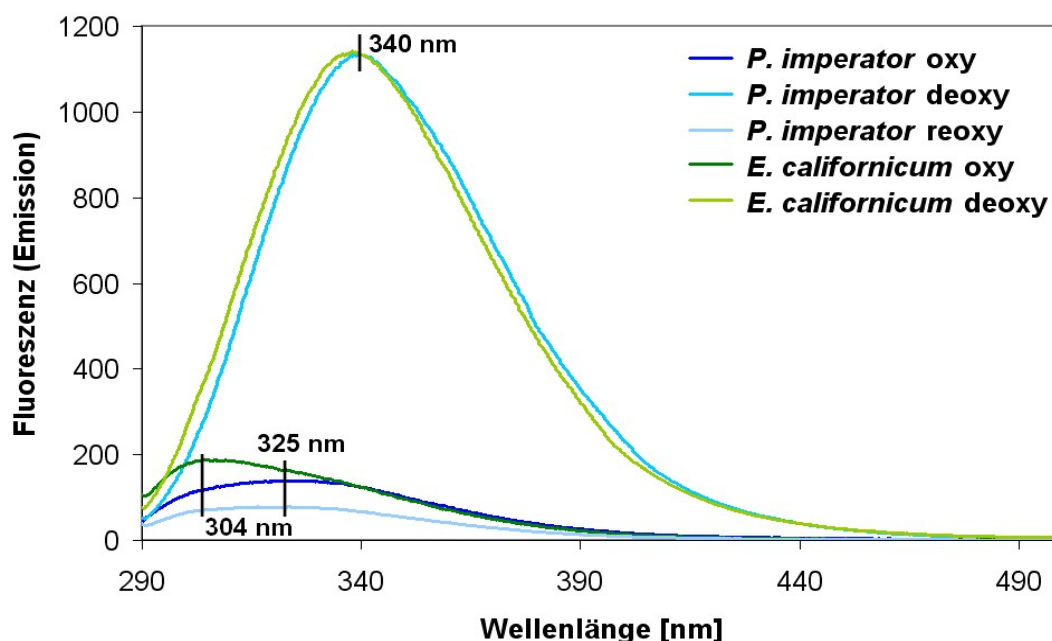


Abbildung 16: Fluoreszenzspektren von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Von Hämocyanin in einer Konzentration von 0,25 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) wurde im normalen oxygenierten, im deoxygenierten und im reoxygenierten Zustand Fluoreszenzemissionsspektren von 290 nm bis 500 nm aufgenommen. Deoxygeniert wurden die Proben in einem AtmosBag mit einer Sauerstoff-Konzentration von 0,2 % (Partialdruck (O_2) $\approx$ 200 Pa) für 2 h; reoxygeniert durch vorsichtiges Einleiten von Luft in die Probe. Die Daten wurden Baseline-korrigiert und anhand der Absorption von 280 nm normiert, um Konzentrationsveränderungen aufgrund der Verdunstung während der Deoxygenierung auszugleichen. Trotzdem ist die Fluoreszenzemission bei reoxygeniertem Hämocyanin etwas niedriger als bei nativem Hämocyanin.

Anregungswellenlänge 280 nm, Detektion 60 nm/min, Temperatur 20°C. Maximum bei 304 nm durch Tyrosine, bei 325 nm durch Tryptophane verursacht.

durch Tyrosin, das größere Maximum bei 324 nm bis 325 nm durch Tryptophan hervorgerufen. Der Unterschied dieses Spektrums zu dem des Spinnen-Hämocyanins (nur ein Maximum bei circa 304 nm) lässt sich höchstwahrscheinlich mit den unterschiedlichen Strukturen der beiden Proteine erklären. Die Sequenz des *P. imperator*-Hämocyanins ist noch nicht bekannt; vermutlich hat es ein anderes Tryptophan-Tyrosin-Verhältnis und / oder andere Abstände zwischen den Aromaten und dem Fluoreszenz-quenchenden Sauerstoff am aktiven Zentrum.

Auch die deoxy- und reoxy-Zustände von Hämocyanin von *Pandinus imperator* wurden mit Fluoreszenz und Absorption untersucht (Abbildung 16); dabei dienen die Absorptionsspektren der Kontrolle der vollständigen Deoxygenierung: Die Absorptionsbande bei 340 nm verschwindet bei Deoxygenierung. Deoxygeniert wurden die Proben bei einer Sauerstoff-Konzentration von 0,2 % (Partialdruck (O_2) $\approx$ 200 Pa) für 2 h; reoxygeniert durch vorsichtiges Einleiten von Luft in die Probe.

Bei beiden Hämocyanin-Spezies ist das generelle Fluoreszenz-Verhalten bei Deoxygenierung gleich. Das Emissionsmaximum verschiebt sich zu größeren Wellenlängen (batho-

chromer Effekt), gleichzeitig nimmt die Absorption stark zu, da der quenchende Einfluss von Sauerstoff auf die aromatischen Aminosäuren fehlt. So steigt die Fluoreszenzquantenausbeute bei *P. imperator*-Hämocyanin durch Deoxygenierung auf das 7,5-fache, bei dem Hämocyanin von *E. californicum* steigt sie um den Faktor 6,6. Die bathochrome Verschiebung ist bei *P. imperator*-Hämocyanin etwas stärker ausgeprägt, die Tryptophane des Skorpion-Hämocyanins scheinen mehr zum Lösungsmittel hin exponiert zu sein als bei Spinnen-Hämocyanin. Nach der Reoxygenierung haben die Hämocyanine beider Cheliceraten wieder die gleichen Absorptions- und Fluoreszenz-Eigenschaften wie vor der Deoxygenierung.

Fluoreszenz der Kutikula

Seit 1954 ist bekannt, dass auch die Skorpione selbst im UV-Licht leuchten (Abbildung 17) [183, 184]. Diese Eigenschaft entwickelt sich während der Aushärtung der Kutikula; frisch gehäutete Skorpione fluoreszieren nicht [183-185]. Stahnke [185] schließt daraus, dass die Fluorophore in die Kutikula sezerniert werden oder aus Vorläufern bestehen müssen, da kurz nach der Häutung getötete Tiere keine Fluoreszenz entwickeln.

Spinnen der Gattung *Eurypelma californicum* fluoreszieren nicht. Die Verwandtschaft der Spinnen und Skorpione erstreckt sich demnach nicht auf den Aufbau ihrer Kutikula.

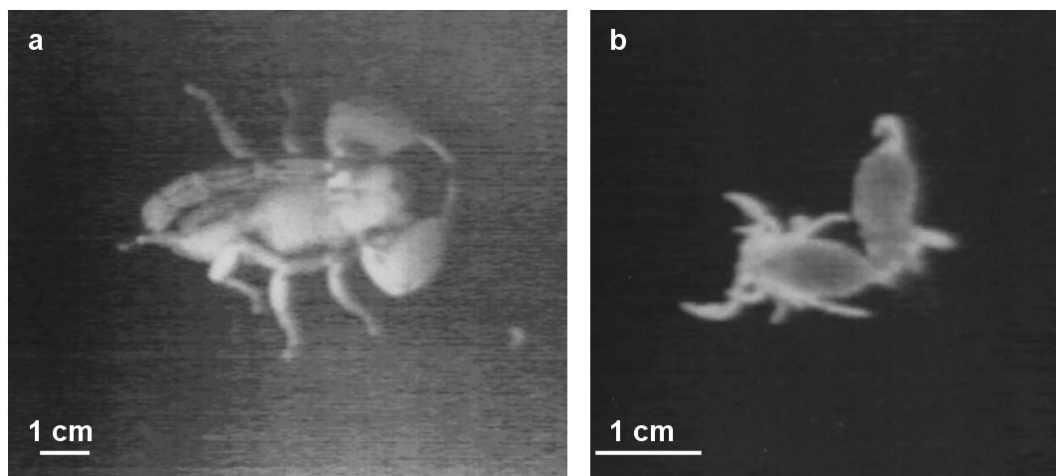


Abbildung 17: *Pandinus imperator* im UV-Licht.

- a** adultes Tier, mit Licht der Wellenlänge 254 nm von der Seite beleuchtet.
- b** 12 d alte Jungtiere, von unten beleuchtet.

3.1.7 Circular dichroismus

Zur Aufklärung der Sekundärstruktur des *P. imperator*-Hämocyanins wurden Circular dichroismus-Messungen am nativen Protein durchgeführt. Die CD-Daten müssen vor dem Einlesen in das Freeware-Programm CDPPro 2004 auf das durchschnittliche Aminosäuregewicht des betreffenden Proteins genormt werden. Da weder die exakte Anzahl der Aminosäuren noch Daten über das genaue Gewicht für *P. imperator*-Hämocyanin existieren, wurde mit den entsprechenden Werten von *E. californicum*-Hämocyanin gearbeitet. Auswertung der

CD-Daten (Abbildung 18) mit CDPPro (Tabelle 13) ergeben 33 % α -helikale Anteile im Protein von *P. imperator*, 20 % der Sekundärstrukturen stellen β -Faltblätter dar, 17 % Turns und 29 % statistisches Zufallsknäuel. Das Hämocyanin von *E. californicum* zum Vergleich besteht aus 30 % α -Helices, 20 % β -Faltblatt-Strukturen, 21 % Turns und 28 % Zufallsknäuel. Das Hämocyanin von *Palinurus elephas* (= *vulgaris*) hat vergleichbare Anteile an Sekundärstrukturelementen. Alle drei untersuchten Hämocyanine zeigen damit eine ähnliche statistische Verteilung von Sekundärstrukturen.

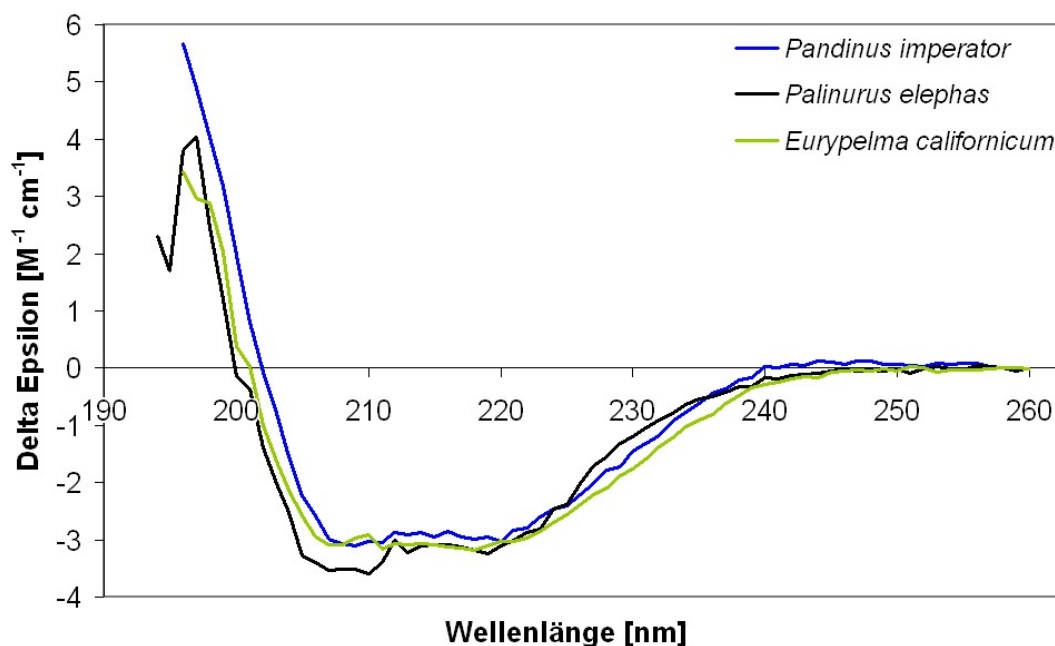


Abbildung 18: CD-Spektren zur Sekundärstrukturbestimmung verschiedener Hämocyanine.

Circulardichroismus-Spektren von 196 nm bis 260 nm wurden von sechs verschiedenen *P. imperator*-Hämocyanin-Chargen (dreifachbestimmt) und zum Vergleich von *E. californicum*- und *P. elephas*-Hämocyanin in 10fach verdünntem Pandinus-Puffer, Endkonzentration 0,2 mg/ml, bei 20°C. aufgenommen. Verwendetes durchschnittliches Aminosäuregewicht von *E. californicum* und *P. imperator* 114,55 Da; für *P. elephas* 115,28 Da.

ausgewertet mit...	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	random coil
Selcon3	30,9 %	19,8 %	18,1 %	29,6 %
CDSSTR	36,2 %	19,4 %	16,4 %	27,9 %
Contin	31,5 %	21,8 %	16,8 %	29,9 %
<i>Pandinus imperator</i>	32,9 %	20,3 %	17,1 %	29,1 %
<i>Eurypelma californicum</i>	30,3 %	20 %	21,3 %	28,1 %
<i>Palinurus elephas</i>	32 %	30 %	20,6 %	26,9 %

Tabelle 13: Sekundärstrukturanalyse von *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit CDPPro 2004.

Legende siehe Abbildung 18.

Die Kristallstruktur des Hämocyanins von *Palinurus interruptus* zeigt, dass vor allem die Domänen I und II aus α -helikalen Strukturen bestehen, die dritte Domäne dieses Langusten-Hämocyanins wird durch ein siebensträngiges β -Barrel gebildet ^[14]. Das Hämocyanin von *Palinurus elephas* hat eine Sequenzidentität von circa 80 % zum Hämocyanin von *Panulirus interruptus*. Analyse der CD-Daten von *P. interruptus*- und *P. imperator*-Hämocyanin sowie *E. californicum*-Hämocyanin zeigen eine gute Übereinstimmung. Von einem ähnlichen Sekundärstruktur-Aufbau beim Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* und *P. interruptus* kann daher ausgegangen werden.

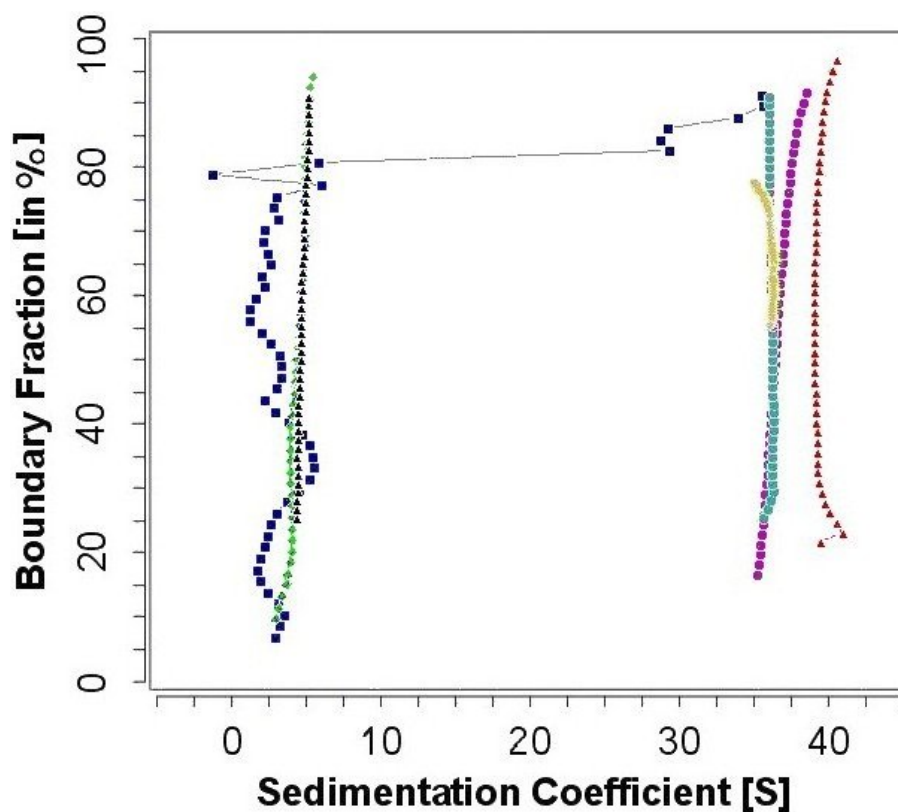
3.1.8 Einfluss von Magnesium- und Calcium-Ionen auf das Hämocyanin-Oligomer

Die beiden Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} sind essentiell für den Zusammenhalt der einzelnen Untereinheiten des *P. imperator*-Hämocyanins. Dies wurde bereits für das Hämocyanin von *E. californicum* beschrieben ^[186]. Wurde das Skorpion-Hämocyanin in 0,1 M Tris verschiedener pH-Werte über einen Zeitraum von vier Tagen inkubiert, ergeben sich bei Untersuchung mittels Ultrazentrifugation (unkorrigierte) Sedimentationskoeffizienten von 36 S bis 39 S (Abbildung 19 und Tabelle 14). Diese Werte entsprechen nativem 24-merem Hämocyanin, das Protein behält seine oligomere Struktur bei.

Bei Inkubation mit 20 mM EDTA zerfällt das oligomere Protein. Es werden (unkorrigierte) Sedimentationskoeffizienten von 3 S bis 6 S errechnet, die monomeren Hämocyanin-Untereinheiten entsprechen. Daraus lässt sich schließen, dass die Dissoziation des Hämocyanins frei in Lösung beziehungsweise bei der Dialyse weniger durch den pH-Wert als vielmehr durch einen Mangel der Struktur-erhaltenden Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) ausgelöst wird. Die Wirkung der Kationen macht man sich bei der Dissoziation zunutze: Natives Hämocyanin von *P. imperator* kann in Dissoziationspuffer vollständig zur Dissoziation gebracht werden. Alle Untereinheiten trennen sich, es bleiben keine multimeren Aggregate zurück.

Bei Größenausschlusschromatographie auf einer Superose 6-Säule (Abbildung 20) finden sich bei *E. californicum*-Dissoziat außer der Fraktion mit monomeren Untereinheiten, die bei 16,5 ml eluieren, auch eine weitere Fraktion mit größeren Proteinaggregaten, die bereits bei 15 ml eluiert und für die das Untereinheiten-Dimer *bc* verantwortlich ist. Diese früher eluierende Fraktion enthält 26 % des aufgetragenen Hämocyanins und deckt sich damit gut mit den theoretisch zu erwartenden 29 % für die Untereinheiten *bc* (zwei von sieben Untereinheiten).

Eine Größenausschlusschromatographie mit Dissoziat von *P. imperator*-Hämocyanin ergibt eine Hauptelutionsfraktion bei ebenfalls 16,5 ml, also ein Gemisch aus Monomeren. Dies kann auch durch eine native PAGE bestätigt werden, in der das Bandenmuster dieser Fraktion identisch mit der von dissoziiertem Gesamthämocyanin ist. Der vorgelagerte Peak enthält



Puffer			Sedimentations- koeffizient [S]	Oligomerisierungs- grad	
0,1 M Tris	pH 7,8	ohne EDTA	36	24-mer	●
0,1 M Tris	pH 8,3	ohne EDTA	39	24-mer	▲
		20 mM EDTA	3	~ Monomer	■
0,1 M Tris	pH 8,8	ohne EDTA	36	24-mer	●
		20 mM EDTA	6	~ Monomer	◆
0,1 M Tris	pH 9,3	ohne EDTA	36	24-mer	■
		20 mM EDTA	5	~ Monomer	▲

Abbildung 19 und Tabelle 14: Sedimentationskoeffizienten und Aggregationsgröße von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml wurde für vier Tage bei 4°C in verschiedenen Puffer-Medien inkubiert. Ohne EDTA sind Mg^{2+} und Ca^{2+} nur im μM -Bereich vorhanden. Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation wurden bei 30 000 rpm und 20°C durchgeführt. Die Sedimentationskoeffizienten wurden nicht Puffer-korrigiert.

(ebenso wie das Maximum bei circa 20,5 ml bei *P. imperator* und *E. californicum*) zu wenig Hämocyanin, um gelelektrophoretisch nachgewiesen werden zu können.

In der nativen PAGE zerfällt das Hämocyanin von *P. imperator* zum Teil in sein dodekameres Halbmolekül (Abbildung 14). Dieser partielle Zerfall des 24-meren Hämocyanins wurde bereits in meiner Diplomarbeit ^[150] und in Arbeiten von Heimerl ^[181] und Heintze ^[187] dokumentiert. Die beiden Bruchstücke konnten als 24-mer und 12-mer identifiziert werden ^[181, 187].

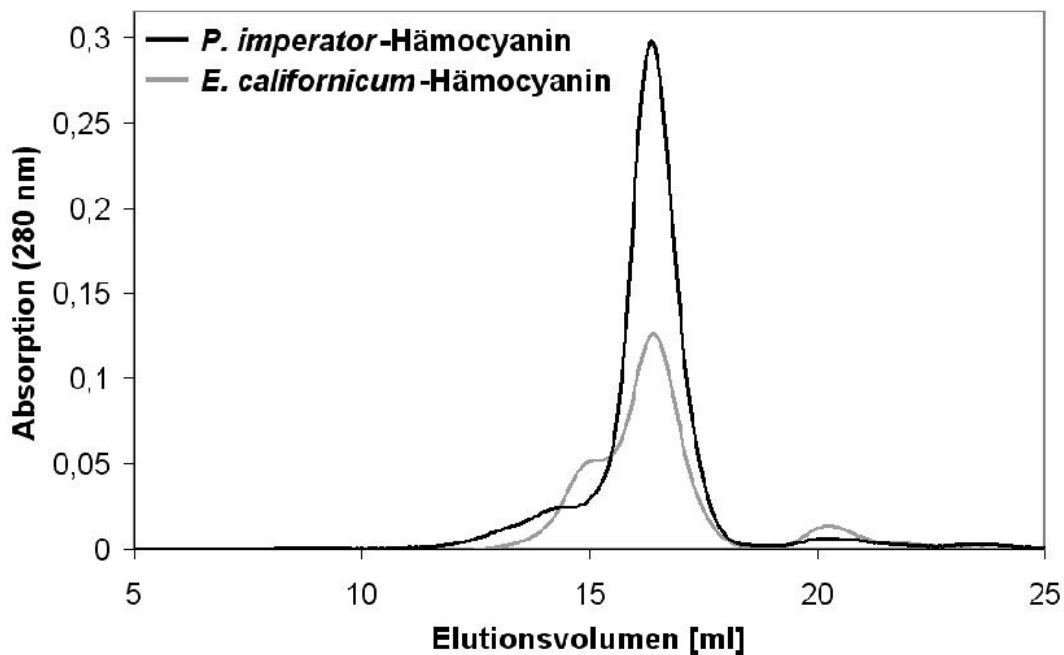


Abbildung 20: Elutionsprofile von dissoziiertem Hämocyanin von *P. imperator* und *E. californicum* auf einer 6 HR 10/30 Säule.

Das gereinigte und dissoziierte Protein wurde mit einer Flussrate von 0,38 cm/min eluiert. Bei einem Elutionsvolumen von circa 16,5 ml eluieren Monomere, bei circa 15 ml Dimere.

Die Stabilität des Skorpion-Hämocyanins wird durch Calcium- und Magnesium-Chlorid mitbestimmt. Im Gel wandert während des Laufes die Probe in das Trenngel in Richtung der Anode, während die bivalenten Kationen zur Kathode wandern. Diese Ionen werden der Hämocyanin-Probe folglich entzogen. Der Kationen-Mangel und das Fehlen eines schwer zu trennenden Heterodimers, das ähnlich wie beim Hämocyanin der Vogelspinne das native 24-mer stabilisiert ^[177, 188, 189], bedingt wahrscheinlich den Zerfall des *Pandinus*-Hämocyanins im Gel in eine obere und eine untere Bande.

Es handelt sich dabei jedoch um ein reines Laborartefakt, das auf mechanische Belastung zurückzuführen ist: Bei gelelektrophoretischen Untersuchungen zerfallenes Hämocyanin wurde aus der Acrylamidmatrix wieder herausgelöst. Mittels Sedimentationsuntersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge konnte festgestellt werden, dass sich das Protein in beiden Banden entweder wieder zu einem 37 S-Aggregat (entspricht 24-merem Hämocyanin) zusammenlagert, oder in noch kleinere Strukturen mit Sedimentationskoeffizienten von 14 S beziehungsweise 6 S zerfällt (entspricht hexameren und niedrigeren Aggregationsformen). (Alle Daten apparente Sedimentationskoeffizienten.)

Dodekameres Hämocyanin konnte nicht stabil isoliert werden.

Die Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 zu Trenn- und Sammelgel bei der nativen PAGE verhindert den Zerfall des *P. imperator*-Hämocyanins in seine Halbmoleküle (Abbildung 36f), es verbleibt stabil als 24-meres Protein.

Fazit

Die beiden Cheliceraten-Hämocyanine von *P. imperator* und *E. californicum* ähneln sich sehr in Bezug auf ihre äußere Dimension, ihre Größe und ihr Gewicht. Quartär- und Sekundärstruktur stehen in guter Übereinstimmung, ebenso wie die Absorptionseigenschaften. Leichte Abweichungen, die durch Unterschiede in der Primärstruktur erklärt werden können, ergeben sich bei den Fluoreszenzeigenschaften der beiden Proteine.

Beide Hämocyanine bestehen aus mehreren Untereinheiten. Genauerer Untersuchung dieser Untereinheiten ist das nächste Kapitel gewidmet.

3.2 Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

3.2.1 Dissoziation von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Am Beginn der Untereinheiten-Trennung und -Reinigung steht die Dissoziation des Hämocyanins in seine Untereinheiten. Dies geschieht standardmäßig durch eine dreitägige Dissoziation in Dissoziationspuffer (0,05 M Glycin-OH, 5 mM EDTA, pH 9,6) bei einer Hämocyanin-Endkonzentration vom 1 mg/ml.

In Proteinen sind die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin für die Fluoreszenz verantwortlich. Tryptophan besitzt dabei die mit Abstand größte Fluoreszenzintensität: Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm ist die detektierte Fluoreszenz praktisch komplett auf Tryptophane zurückzuführen, die aufgrund ihres hydrophoben Charakters meist im Proteininneren liegen. Umliegenden Aminosäurereste und bei Hämocyanin vor allem das oxygenierte Sauerstoff-Kupferzentrum löschen jedoch einen Großteil der Tryptophanfluoreszenz ^[190, 191].

Das 24-mere native Hämocyanin zeigt nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei etwa 325 nm, das durch Tryptophane verursacht wird, und zum Teil ein weiteres lokales Maximum bei 304 nm bis 305 nm, das durch Tyrosine entsteht (Abbildung 16).

Heterogenität bei Proben mit dissoziiertem Hämocyanin

Es wurde versucht, die Dissoziation des *P. imperator*-Hämocyanin fluoreszenzspektroskopisch zu verfolgen. Vom Hämocyanin der Vogelspinne ist bekannt, dass sich im Fluoreszenzspektrum die native oligomere Form von seinen dissoziierten Untereinheiten unterscheidet (Abbildung 97a) ^[186]. Daher wurden Fluoreszenzemissionsspektren von 24-merem *P. imperator*-Hämocyanin bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen. Die gleichen Proben wurden zusätzlich mittels Absorptionsspektroskopie untersucht und auf den willkürlich gewählten Wert von $OD_{280nm} = 0,19$ normiert, um Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Derselbe Normierungsfaktor wurde dann auch für die Fluoreszenz-Daten verwendet.

Dabei stellte sich bei der Untersuchung von verschiedenen Hämocyanin-Isolierungen heraus, dass das Emissionsmaximum von nativem 24-meren Hämocyanin in der Regel immer um 324 nm liegt, aber trotz der Normierung die Fluoreszenzintensität bei jeder Charge unterschiedlich war. Bei den sechs verschiedenen Hämocyanin-Proben schwankt die Fluoreszenzintensität am Ort des Maximums von -25 % bis +23 % um den Mittelwert.

Auf die Heterogenität der verschiedenen Hämocyanin-Präparationen wird weiter in Kapitel 3.5 eingegangen.

Bei der Dissoziation von *P. imperator*-Hämocyanin in seine Untereinheiten kommt es neben einer kleinen bathochromen Verschiebung des Maximalwertes auch zu einem leichten Sau-

erstoffverlust, der anhand des Absorptionsquotienten $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ belegt werden kann: Für 24-meres Hämocyanin beträgt dieser Richtwert 0,242 (siehe Kapitel 3.1.5 Tabelle 12), für dissoziiertes Hämocyanin dagegen $0,218 \pm 0,011$ (Mittelwert der sechs Messungen), also eine Abnahme um 10 %.

Entsprechend zu diesem Sauerstoffverlust hat dissoziiertes Hämocyanin in der Regel eine leicht erhöht Fluoreszenzintensität. Diese Veränderung entspricht allerdings nicht einer Intensitätserhöhung des Maximums von nicht-dissoziiertem nativem 24-merem Hämocyanin um 10 % (wie es durch die Abnahme der Oxygenierung zu erwarten wäre), sondern schwankt bei den dissoziierten Proben von -32 % bis +54 % um einen Mittelwert. Das heißt, es kommt nicht zu einer durch den Sauerstoffverlust vorhersagbaren Zunahme. Der prozentuale Anteil dieser Intensitäts-Änderung ist bei Mehrfach-Ansätzen reproduzierbar, variiert jedoch von einer Hämocyanin-Präparation zur nächsten und folgt dabei keinem erkennbaren Muster. Möglich ist, dass das Hämocyanin während der Dissoziation etwas entfaltet wird, und sich die Umgebung der Fluorophore verändert.

Diese Resultate (unterschiedliche Fluoreszenzintensität bei nativem Hämocyanin, verschiedenen starke Intensitätszunahme bei Dissoziation) lassen es zu, bereits vor der Untereinheiten-Trennung über mehr als sechs mögliche Untereinheiten-Typen pro Hexamer zu spekulieren. Eine unterschiedliche Zusammensetzung des 24-meren Hämocyanin aus verschiedenen Untereinheiten-Typen, die abhängig sein könnte von Alter, Geschlecht, Entwicklungs- oder Häutungszustand, ist denkbar. Die Existenz verschiedener Untereinheiten-Typen, die unterschiedliche Fluoreszenz-Eigenschaften besitzen, könnte die Unähnlichkeiten bei der Fluoreszenzuntersuchung erklären.

3.2.2 Trennung der Hämocyanin-Untereinheiten

Hämocyanin-Dissoziat kann in seiner Gesamtheit auf einem nativen PAGE-Gel getrennt und die Untereinheiten anhand ihrer zurückgelegten Laufstrecke identifiziert werden (wie gezeigt anhand Abbildung 14).

Zur Trennung der Untereinheiten wurde eine Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule mit einem Gradienten im Elutionsmittel (Dissoziationspuffer) aus KCl durchgeführt. Da die Hämocyanin-Untereinheiten alle ein sehr ähnliches Molekulargewicht besitzen, können sie nicht allein anhand ihrer Größe voneinander getrennt werden. Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) ist ein polykationisches Derivat von Dextran; DEAE-Cellulose ist bei pH-Werten über 9,5 ungeladen und selbst bei pH 6 noch nicht vollständig protoniert. Dies bedeutet, dass dieses Material bei physiologischen pH-Werten als starker Puffer wirkt. DEAE ist eine schwache Base mit positiver Nettoladung, die Anionen bindet. Daher eluieren die verschieden geladenen Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin zu unterschiedlichen Zeitpunkten, beziehungsweise bei unterschiedlicher KCl-Konzentration.

Das Ausgangsprotokoll der Untereinheiten-Auftrennung wurde in mehreren Versionen weiterentwickelt. Am Beispiel von Abbildung 21 werden die Verbesserungen im Elutionsprogramm deutlich. Es fällt auf, dass im ersten Elutionsprofil die Absorptionsmaxima, die

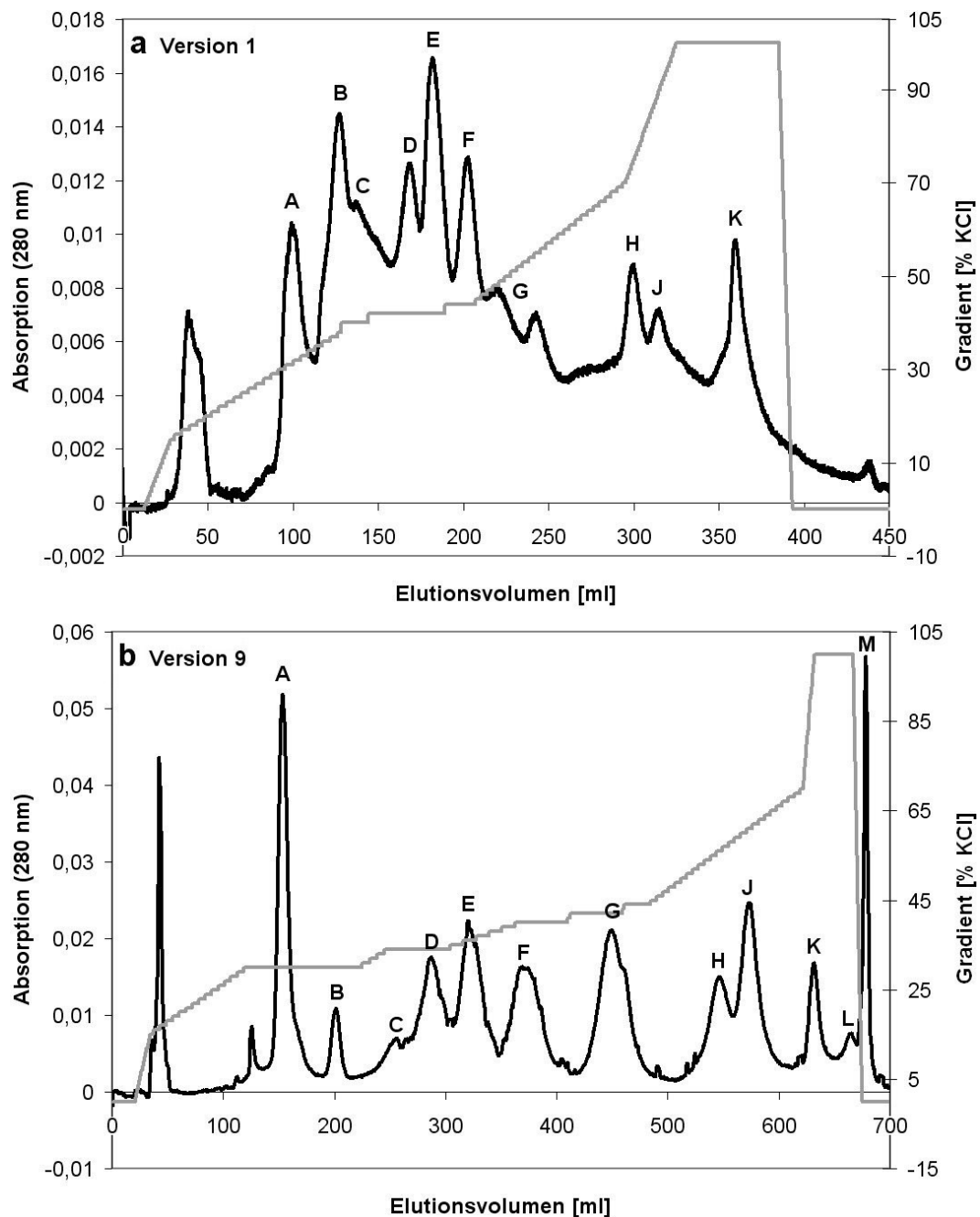


Abbildung 21: Elutionsprofile der Untereinheiten-Reinigung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin, Version 1 (a) und Version 9 (b).

Auf einer DEAE-Säule wurde 1 mg (a) beziehungsweise 16 mg (b) gereinigtes und dissoziiertes Hämocyanin aufgetragen und mit einer Flussrate von 1 ml/min (a) beziehungsweise 2,5 ml/min (b) und einem KCl-Gradienten in Dissoziationspuffer eluiert.

Die Absorption wurde bei 280 nm (—) aufgenommen und der KCl-Gradient (---) anhand der Pumpleistung verfolgt. Die Buchstaben über den Absorptionsmaxima dienen zur Kennzeichnung der Protein-Peaks.

	Elutionsvolumen		DEAE-Säule	Version 9
1			Fraction Size: 5,5 ml	Flussrate 2,5 ml/min - 3 ml/min
2	0 ml	UV Lamp	Turn ON	
3	0 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % 0 % 5 ml 2,5 ml/min
4	5 ml	Set Zero Baseline	UV Detector	
5	5 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % 0 % 2 ml 2,5 ml/min
6	7 ml	Inject Sample	Static Loop	3 ml 1,0 ml/min
7	10 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % 0 % 8 ml 2,5 ml/min
8	18 ml	Set Zero Baseline	UV Detector	
9	18 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % → 85 % 0 % → 15 % 16 ml 2,5 ml/min
10	34 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	85 % → 70 % 15 % → 30 % 87 ml 2,5 ml/min
11	121 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	70 % 30 % 100 ml 2,5 ml/min
12	221 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	70 % → 66 % 30 % → 34 % 27 ml 2,5 ml/min
13	248 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	66 % 34 % 50 ml 2,5 ml/min
14	298 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	66 % → 60 % 34 % → 40 % 70 ml 2,5 ml/min
15	368 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	60 % 40 % 40 ml 2,5 ml/min
16	408 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	60 % → 58 % 40 % → 42 % 5 ml 2,5 ml/min
17	413 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	58 % 42 % 45 ml 2,5 ml/min
18	458 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	58 % → 56 % 42 % → 44 % 2 ml 2,5 ml/min
19	460 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	56 % 44 % 20 ml 2,5 ml/min
20	480 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	56 % → 30 % 44 % → 70 % 140 ml 2,5 ml/min
21	620 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	30 % → 0 % 70 % → 100 % 10 ml 2,5 ml/min
22	630 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	0 % 100 % 35 ml 2,5 ml/min
23	665 ml	Linear Gradient	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	0 % → 100 % 100 % → 0 % 8 ml 2,5 ml/min
24	673 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % 0 % 50 ml 3 ml/min
25	723 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	0 % 100 % 50 ml 3 ml/min
26	773 ml	Isocratic Flow	Pump A: Diss-Puffer Pump B: Diss-Puffer + 0,4 M KCl	100 % 0 % 7 ml 3 ml/min
25	780 ml	End of Protocoll		

Tabelle 15: Elutionsprotokoll Version 9 zur Trennung der Untereinheiten von *P. imperator*-Hämocyanin mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule.

durch das eluierte Protein bedingt sind, sehr eng aufeinanderfolgen. Im Gegensatz dazu sind die Absorptionsmaxima bei der Elution nach Protokollversion 9 klar voneinander getrennt (Elutionsprotokoll in Tabelle 15). Die einzelnen Proteinfractionen gehen kaum ineinander über.

Verschiedene Untereinheiten-Trennungsgänge nach dem gleichen Protokoll unterscheiden sich kaum. Die Proteinmaxima erscheinen reproduzierbar zu den gleichen Zeitpunkten, können in ihrer Höhe allerdings etwas variieren. Peak B bildet hier eine Ausnahme: Bei der Untereinheiten-Trennung einer neuen Hämocyanin-Isolierung war der Peak B nicht mehr zu sehen; alle anderen Maxima erschienen wie gewohnt. Dies ist ein zweiter Hinweis auf ver-

schiedene Untereinheiten-Typen, deren Existenz und / oder Konzentration in der Skorpion-Hämolymphe verschiedener Individuen nicht identisch ist.

Insgesamt entstehen elf Elutionsmaxima, die gut voneinander getrennt sind. Allerdings eluiert nicht das gesamte Protein von der Säule. Obwohl ab einem Elutionsvolumen von 630 ml 100 % Dissoziationspuffer mit 0,4 M KCl über die Säule gegeben werden, die alles gebundene Hämocyanin von der DEAE-Matrix ablösen sollten, bleiben immer noch Proteine gebunden. Sie eluieren noch später (zum Beispiel Peak M), zum Teil erst nach rigiden Waschschritten mit 1 M NaCl, 0,8 M NaOH und 50 % Ethanol. Eine Erhöhung der KCl-Konzentration im Elutionspuffer führt nicht zu einer verbesserten Auftrennung.

Die Hämocyanin-Konzentration in den einzelnen Elutionspeaks ist gering; auch nach zahlreichen Ionenaustaschchromatographien stand nur wenig Protein zur Verfügung (Tabelle 16).

Peak	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
Konzentration (mg/ml)	5,8	0,1	0,9	4,8	4,8	2,7	5,4	1,7	3,2	0,1	0,3
Volumen (ml)	2,2	2,0	1,2	1,0	1,5	0,3	2,2	2,0	2,0	1,0	2,5

Tabelle 16: Gepoolte Fraktionen aus den Elutionen zur Untereinheiten-Reinigung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Gesamtproteinmenge nach 25 Gelfiltrationen circa 47 mg.

Elf Untereinheitenpeaks können säulenchromatographisch unterschieden werden. Dadurch kann jedoch nicht auf tatsächlich elf verschiedenen Untereinheiten-Typen zurückgeschlossen werden. Von Untersuchungen am Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *L. polyphemus* ist bekannt, dass die Anzahl der isolierbaren Hämocyanin-Untereinheiten mit der Methode ihrer Trennung schwankt ^[192]. Tatsächlich sind von zwölf elektrophoretisch verschiedenen Untereinheiten nur noch acht immunologisch unterscheidbar ^[177, 192, 193]. Unter den elf säulenchromatographisch unterscheidbaren *P. imperator*-Untereinheiten könnten sich zum Beispiel identische Untereinheiten ohne und mit Modifikationen, oder mit verschiedenen Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen oder Glykosylierungen befinden.

Die einzelnen Fraktionen wurden zur weiteren Untersuchung auf ein natives Gradientengel (5-15 %, pH 8,8) aufgetragen (Abbildung 22). Das Bandenmuster bestätigt die Eignung der Untereinheiten-Trennung nach Elutionsversion 9. Erwartungsgemäß finden sich in Spur G eine starke und eine schwächere Bande, entsprechend zu dem Hauptpeak und der Schulter in Elutionspeak G. Ebenfalls mehr als eine Bande finden sich in den Spuren A, B, F und K. Da für diese Absorptionsmaxima im Elutionsprofil keine Mehrgipfeligkeit vorliegt, wäre vorstellbar, dass diese Untereinheiten als Heterodimere eluieren und durch die mechanische Belastung im Gel zerbrechen. Angesichts der Tatsache, dass auch schon das 24-mere

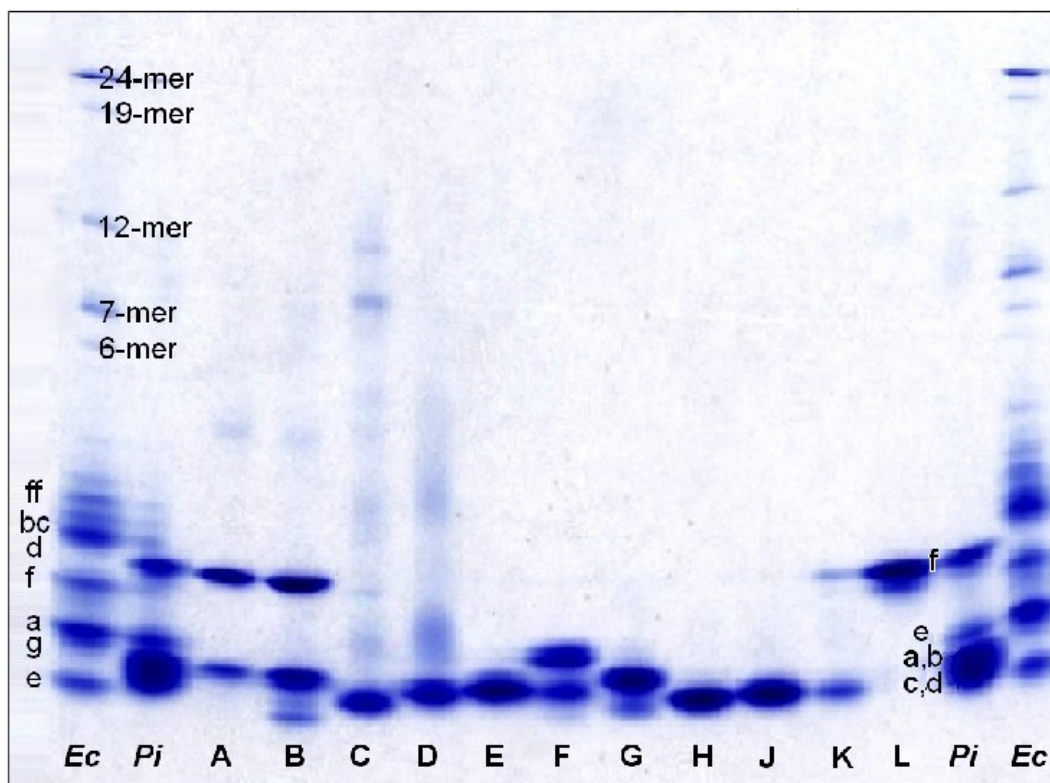


Abbildung 22: Natives Gradientengel mit Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Coomassie-gefärbte native PAGE (7,5 % bis 15 %, pH 8,8) mit den gereinigten Untereinheiten (DEAE-Elution Version 9, zweifache Reinigung). Aufgetragen wurde dissoziiertes Hämocyanin von *E. californicum* und *P. imperator* (15 µg) und je 2 µg bis 5 µg Protein der DEAE-Elutions-Peaks A bis L.

Oligomer in der nativen PAGE zerbricht, liegt dies durchaus im Bereich des Möglichen. Dem widerspricht allerdings das Ergebnis der Größenausschlusschromatographie mittels Superose 6 (Abbildung 20), bei dem fast nur Monomere eluiert werden konnten. Demnach könnte es sich hier bei den verschiedenen Banden um Ladungsisomere handeln, die unterschiedlich groß sind oder um Untereinheiten, die zum Teil posttranskriptionell modifiziert wurden.

Einige Elutionspeaks können bereits direkt einem Untereinheiten-Typ zugeordnet werden. Die Peaks A und B enthalten die Untereinheit *f* und jeweils eine, eventuell auch zwei weitere Untereinheiten, davon wahrscheinlich einmal die Untereinheit *c*. Die Peaks C, D und E enthalten jeweils die Untereinheiten *a*, *b* und *c*. Der Elutionspeak F wiederum enthält mindestens zwei Untereinheiten, eine davon Typ *e*. Peak G enthält *a* und *d*, die Peaks H, J und K wiederum *b* und *c*. Untereinheit *f* ist nochmals in Elutionspeak L enthalten.

Hinsichtlich ihres Molekulargewichts wurden die Untereinheiten mittels denaturierender PAGE untersucht (Abbildung 23). Trotz des eingesetzten Denaturierungspuffers mit β-Mercaptoethanol, thermischer Denaturierung bei 95°C und standardisierter Molekulargewichtsbestimmung mit QuantityOne ergeben sich bei verschiedenen Ansätzen leicht abweichende Gewichte für die einzelnen Banden. In Tabelle 17 sind die Mittelwerte von mehreren Gelen

dargestellt. In Abbildung 23 entsprechen die Elutionspeaks H, J, K und L mit dem Molekulargewicht ihrer (schwersten) Banden am ehesten der Untereinheit *f*. Elutionspeak A scheint hier nicht die Untereinheit *f*, sondern eine andere Untereinheit, eventuell *e*, zu enthalten. Peak B besteht vermutlich aus mindestens einer weiteren Untereinheit aus dem Gemisch *a*, *b*, *c* und *d*. Wenigstens eine dieser Untereinheiten werden sich auch in den Absorptionsgipfeln

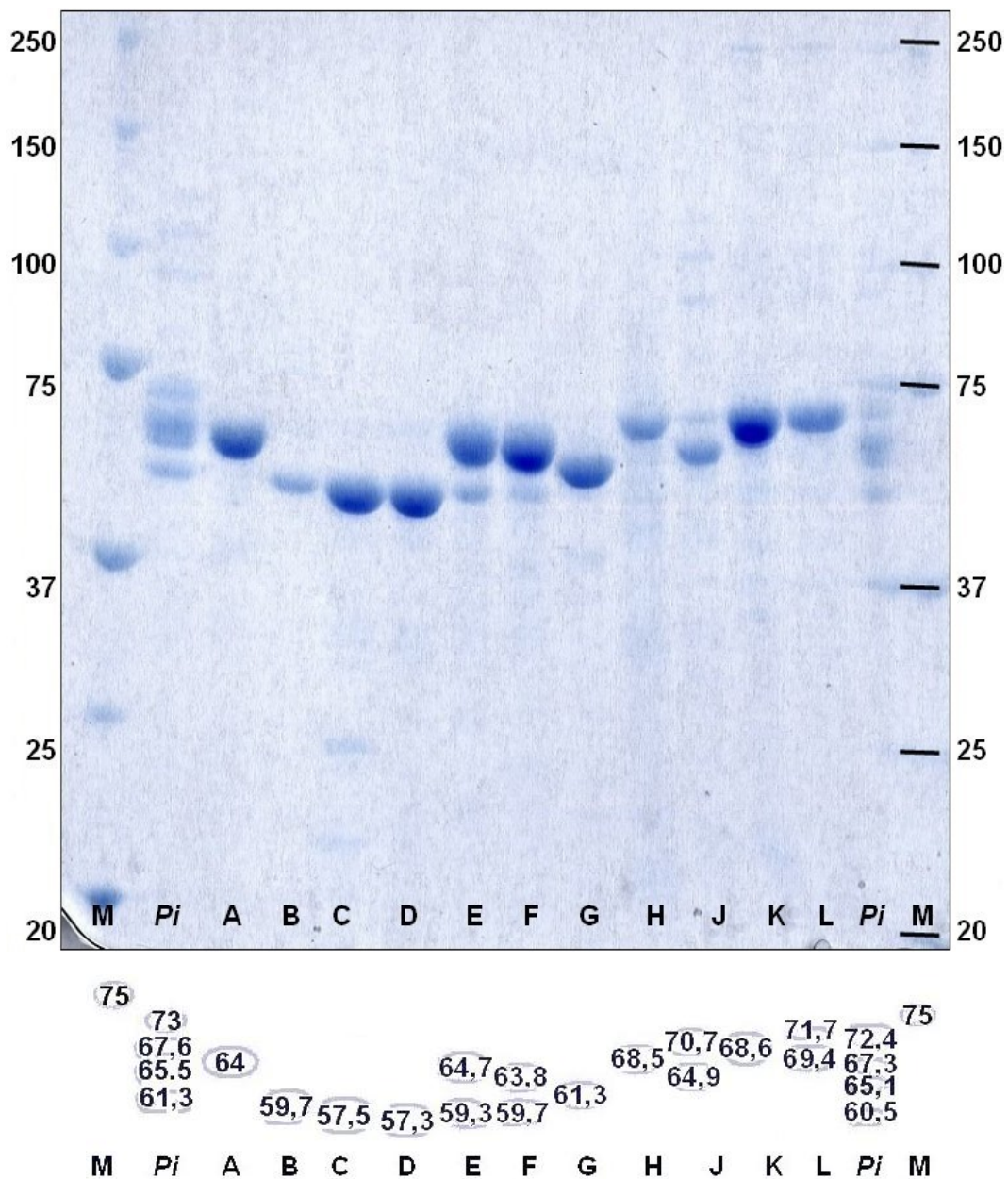


Abbildung 23: Denaturierende SDS-PAGE zur Molekulargewichtsbestimmung der Hämocyanin-Untereinheiten von *Pandinus imperator*.

Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (7,5 %, pH 8,8) mit 2 µg bis 10 µg Protein je Spur. Molekulargewichte wurden mit der Software QuantityOne und dem BioRad-Marker PrecisionPlus errechnet. Abkürzungen M: Marker, Pi: *Pandinus imperator*, A-J entsprechen den Elutionspeaks in Abbildung 21b. Die Zahlen entsprechen den errechneten Molekulargewichten in kDa.

A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	Hc
64,3	61,5	59,7	69,2	66,2	65,8	66,5	69	71,7	70,2	71,7	73,3
			64,1	61,4	62	64		65,6			67,6
											64,4
											60,9

Tabelle 17: Berechnete Molekulargewichte der Hämocyanin-Untereinheiten von *P. imperator*.

Die Untereinheiten wurden mittels denaturierender SDS-PAGE (7,5 % und 10 %, pH 7,5 und 8,8; Gradientengele von 5-10 % und 5-12,5 %) aufgetrennt und ihr Molekulargewicht in kDa mit der Software QuantityOne bestimmt. Bei einigen Elutionspeaks (D, E, F, G und J) entstanden in der PAGE zwei Banden, bei Hämocyanin (Gesamthämocyanin) vier Banden. Mittelwerte aus zwei bis sieben Berechnungen. Die Einzelwerte weichen maximal 7 % vom Mittelwert ab.

und den leichteren Banden der Spuren A, D und G finden lassen. Absorptionsmaximum J enthält wahrscheinlich die Untereinheiten-Typen e und f.

Die Untereinheiten-Typen a, b, c und d sind sowohl in der nativen als auch in der denaturierenden PAGE schwer bis gar nicht voneinander zu isolieren, und können daher kaum zugeordnet werden. Vermutlich enthalten fast alle Absorptionspeaks mit Ausnahme von H, K und L eine oder alle Untereinheiten vom Typ a, b, c oder d.

Auch hier spiegeln die verschiedenen Molekulargewichte der Untereinheiten bei gelelektrophoretischer Untersuchung nicht unbedingt die realen Gewichte dar. Die geringfügigen Unterschiede in den Laufstrecken der Untereinheiten-Typen von Gel zu Gel und untereinander sowie die Ableseungenauigkeit macht eine genaue Zuordnung schwierig. Eindeutige Ergebnisse kann nur eine Sequenzierung des Hämocyanins liefern.

3.2.3 Zweidimensionale Immungelelektrophorese

Mit der Methode der zweidimensionalen Immungelelektrophorese können Informationen über die dreidimensionale Struktur und die Oberfläche des Proteins gewonnen werden. Bei großer Ähnlichkeit der Proteinstruktur beziehungsweise entsprechenden antigene Determinanten erkennen die eigentlich gegen nur einen Untereinheiten-Typen gerichteten Antikörper auch eine andere Hämocyanin-Untereinheit. So können Rückschlüsse auf die Verwandtschaft der einzelnen Hämocyanin-Monomere gezogen werden.

Bei der zweidimensionalen Immungelelektrophorese wird in der ersten Dimension dissoziiertes Hämocyanin von *Pandinus imperator* aufgetragen. Das Protein läuft von links nach rechts und trennt sich ähnlich wie bei der nativen PAGE der Größe und der Ladung nach auf. In der zweiten Dimension wandern die Untereinheiten nach oben in das Antikörperfeld ein und bilden bei äquivalenten Konzentrationsverhältnissen eine Präzipitationslinie aus. Ein direkter Vergleich der Peakhöhe ist nicht möglich.

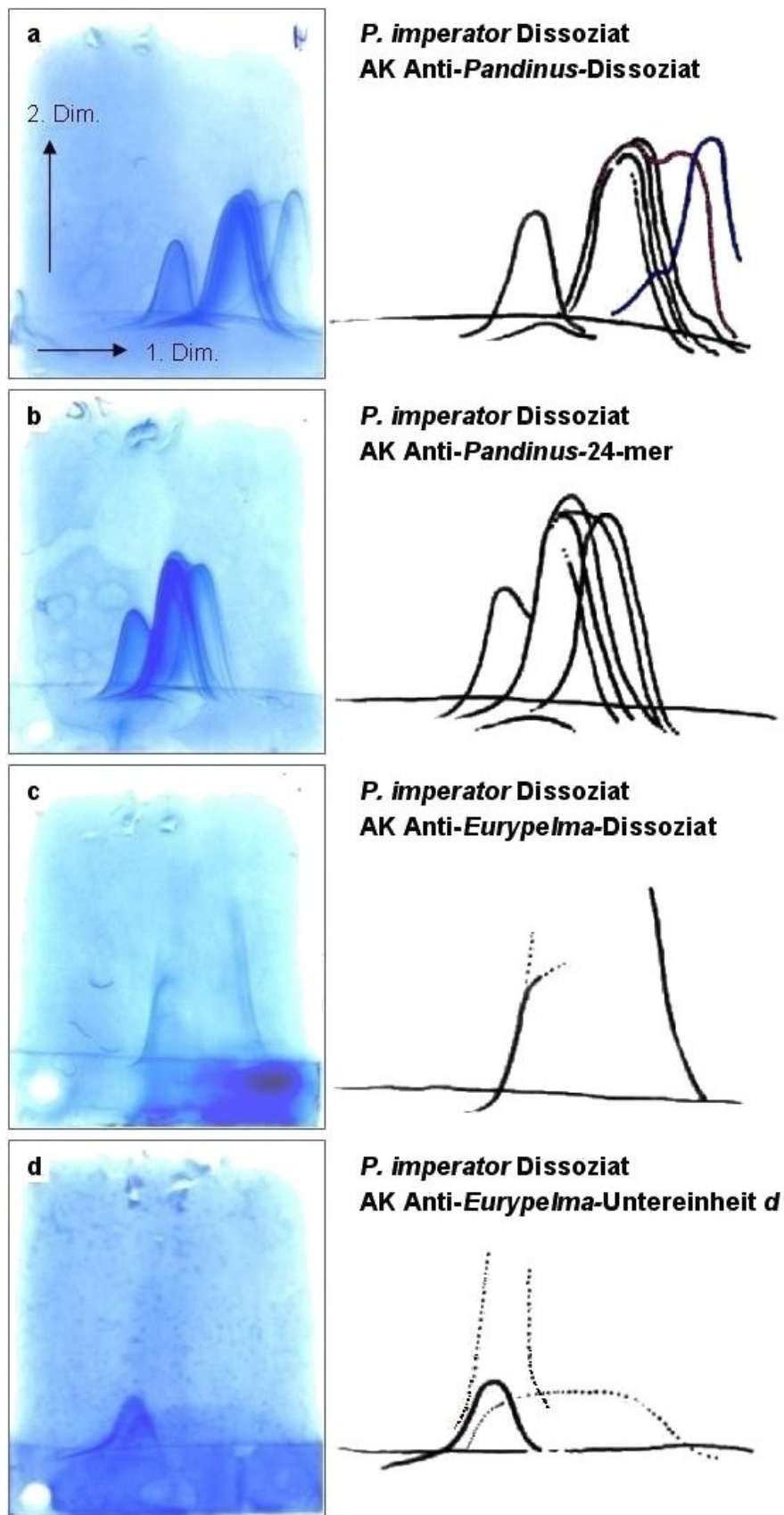


Abbildung 24: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Hämocyanin-Dissoziat von *P. imperator*.

In der 1. Dimension von links nach rechts wurde 8 µg Dissoziat eingesetzt; in der 2. Dimension wandert das Protein nach oben in das Antikörperfeld ein.

In Abbildung 24a (Hämocyanin-Dissoziat mit Antikörpern gegen *P. imperator*-Dissoziat) sind neun Präzipitationskurven erkennbar. Dies spricht für neun immunologisch unterscheidbare Untereinheiten-Typen. Jeweils zwei Kurven (rot und blau gekennzeichnet) gehen ineinander über. Diese Verbindung der Präzipitationslinien wird mit einem Verwandtschaftsverhältnis beziehungsweise durch Kreuzreaktivität der beiden Untereinheiten-Typen erklärt.

Abbildung 24b (Hämocyanin-Dissoziat mit Antikörpern gegen *P. imperator*-24-mer) zeigt sieben bis acht Peaks. Auch hier gehen wahrscheinlich Präzipitationslinien ineinander über, diese sind aber sehr schwer zu identifizieren. Einer der Präzipitationsgipfel ist wie in Abbildung 24a nur schwach ausgeprägt; vermutlich handelt es sich dabei jedesmal um die gleiche Untereinheit. Auch die anderen Präzipitationslinien sind sich in Bezug auf ihre Lage zueinander recht ähnlich. Die Präzipitationslinien trennen sich bei den Versuchen relativ deutlich voneinander ab, es scheint sich (bis auf die rot und blau gekennzeichneten Ausnahmen) um immunologisch unterscheidbare Untereinheiten zu handeln, die keine immunologisch feststellbare Verwandtschaft aufweisen. Insgesamt kann von sieben bis neuen Untereinheiten ausgegangen werden.

Mit der Methode der zweidimensionalen Immungelektrophorese wurde ein weiterer Ansatz unternommen, die *P. imperator*-Untereinheiten zu charakterisieren: Mittels Antikörper gegen bestimmt Untereinheiten-Typen von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin wurde versucht, über die Kreuzreaktivität Verwandtschaftsbeziehungen herzustellen. Eingesetzt wurden Antikörper gegen *E. californicum*-Dissoziat und gegen die Untereinheiten *d*, *e* und *f*.

Bei Verwendung von Anti-*E. californicum*-Dissoziat gegen *P. imperator*-Dissoziat (Abbildung 24c) ergeben sich zwei schwach ausgebildete Präzipitationslinien. Diese sind nach oben hin nicht vollkommen geschlossen. Dies könnte an dem Alter des im Dezember 1996 hergestellten Antikörpers oder an einer zu geringen Antikörperkonzentration liegen.

Abbildung 24d zeigt die Ergebnisse bei *P. imperator*-Dissoziat gegen die *E. californicum*-Untereinheit *d*. Hier wird eine Untereinheit erkannt. Des Weiteren ist eine schwache Präzipitationslinie zu erkennen, die stark abgeflacht ist und bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (100 µl bis 200 µl; Antikörper hergestellt November 2000) auftritt. Diese Untereinheiten, die von dem gegen *E. californicum*-Untereinheit *d* gerichteten Antikörper erkannt werden, sind am wenigsten weit in der ersten Dimension in das Gel eingelaufen. Bei der nativen PAGE legt *P. imperator*-Untereinheit *f* die kürzeste Laufstrecke zurück, das heißt hier kreuzreagiert *P. imperator*-Untereinheit *f* mit *E. californicum*-Untereinheit *d*. Dies legt eine verwandtschaftliche Beziehung und Übereinstimmungen in der Sequenz oder zumindest in der antigenen Determinante nahe.

Bei der Verwendung von *E. californicum*-Untereinheit *e* und *E. californicum*-Untereinheit *f* wurden keine distinkten *P. imperator*-Untereinheiten eindeutig erkannt.

Der Einsatz von Antikörpern gegen die Untereinheiten *bc* von *E. californicum*-Hämocyanin wäre wünschenswert gewesen, beispielsweise um die eventuell für die enzymatische Aktivi-

tät verantwortlichen Untereinheiten im Hämocyanin von *P. imperator* zu identifizieren. Dieser Antikörper stand jedoch nicht zur Verfügung.

Eine genaue Analyse des immunologischen Verhaltens der *P. imperator*-Untereinheiten soll in Form einer Diplomarbeit vorgenommen werden. Für weitere Betrachtungen in dieser Arbeit ist sie ohne Bedeutung.

Fazit

Hämocyanin von *Pandinus imperator* lässt sich wie das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* durch Dissoziierungspuffer innerhalb von zwei Tagen in seine Untereinheiten dissoziieren. Bei diesem Vorgang nimmt der Absorptionsquotient $^{340\text{nm}}/_{280\text{nm}}$ geringfügig ab (Abbildung 97). Im Gegensatz zu Vogelspinnen-Hämocyanin unterscheiden sich Fluoreszenzspektren von nativem und dissoziiertem Skorpion-Hämocyanin nicht. Die Dissoziation kann demnach nicht fluorimetrisch verfolgt werden. Auffällig ist, dass im Gegensatz sogar jedes Fluoreszenzemissionsspektrum von Hämocyanin-Dissoziat verschiedener Hämocyanin-Isolierungen unterschiedlich ist.

Eine neu erstellte Elutionsvorschrift zur säulenchromatographischen Trennung der Hämocyanin-Untereinheiten führt zu elf Fraktionen. Immunologisch können nur noch sieben bis neun Untereinheiten unterschieden werden. Klarheit über die genaue Anzahl der Untereinheiten und deren Verwandtschaft untereinander beziehungsweise mit anderen Hämocyaninen sowie Rückschlüsse auf ihre Lage im Gesamtmolekül kann aber nur eine Sequenzierung des Hämocyanins bringen.

3.3 Stabilität von Hämocyanin

Als respiratorisches Pigment eines Poikilothermen ist das Hämocyanin von *Pandinus imperator* hohen Temperaturen und Temperaturschwankungen ausgesetzt. Die klimatischen Bedingungen im Lebensraum des Kaiserskorpions, Westafrika, haben das Hämocyanin zu biochemischen und / oder morphologischen Anpassungen gezwungen. In diesem Kontext wurde die Stabilität des *P. imperator*-Hämocyanins gegenüber der Temperatur untersucht. Weiterhin wurde das Verhalten des Hämocyanins gegenüber Detergenzien überprüft. So kann Aufschluß über die Stabilität und die komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen strukturellen Ebenen des Oligomers und einer einzelnen Untereinheit gewonnen werden. Es wurden spektroskopische und elektrophoretische Methoden eingesetzt.

3.3.1 Bestimmung der Thermostabilität

3.3.1.1 Bestimmung der Thermostabilität mittels Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Bestimmung der Thermostabilität durch Fluoreszenzspektroskopie wurde Hämocyanin von *P. imperator* in 0,1 M Tris- oder in Pandinus-Puffer bei Temperaturen zwischen 10°C und 90°C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden Emissionsspektren aufgenommen. Abbildung 25 zeigt exemplarische Fluoreszenzspektren nach 10-minütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen in 0,1 M Tris-Puffer.

Tris-Puffer hat einen hohen Temperaturkoeffizienten; der pH-Wert fällt um circa 0,03, wenn die Temperatur um ein Grad steigt. Der Puffer war bei 20°C auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt worden, bei einer Temperatur von 90°C hat er einen pH-Wert von circa 5,7.

Bei einer Denaturierung ändert sich die Mikroumgebung der Tryptophane, die Abstände zu den umliegenden Aminosäureresten werden größer; damit verringert sich die Fluoreszenzlöschung. Die Fluoreszenzintensität des Proteins nimmt zu, weiterhin kommt es zu einer Rotverschiebung des Emissionsspektrums (Stokes shift).

Abbildung 26 zeigt das Fluoreszenzemissionsmaximum und Fluoreszenzintensitäten von Hämocyanin, das zehn Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurde. Die Fluoreszenzintensität wurde bei der maximalen Emissionswellenlänge aufgenommen.

Das 24-mere native Hämocyanin zeigt nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei etwa 324 nm. Mit Inkubation bei steigenden Temperaturen wird die Löschung der Tryptophanfluoreszenz aufgehoben und die Fluoreszenzintensität nimmt zu. Weiter kommt es zu der erwarteten Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums in den längerwelligen Bereich.

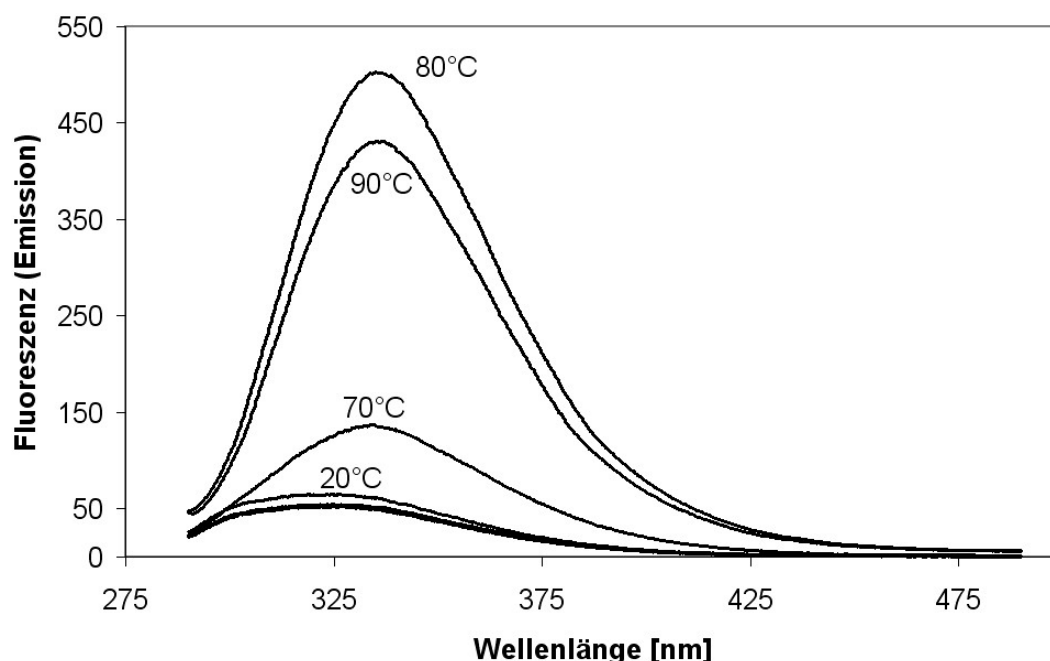


Abbildung 25: Fluoreszenzemission von *Pandinus imperator*-Hämocyanin nach zehn Minuten Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

Hämocyanin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurde in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) bei Temperaturen zwischen 10°C und 90°C für 10 min inkubiert. Danach wurden die Proben bei 20°C mit Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt und ein Emissionsspektrum von 290 nm bis 490 nm gemessen. Die pH-Verschiebung bei Erwärmung des Puffers wurde nicht berücksichtigt; es ist allerdings von einer Abnahme von 0,03 pH-Einheiten pro °C Temperaturzunahme auszugehen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je vier Messungen.

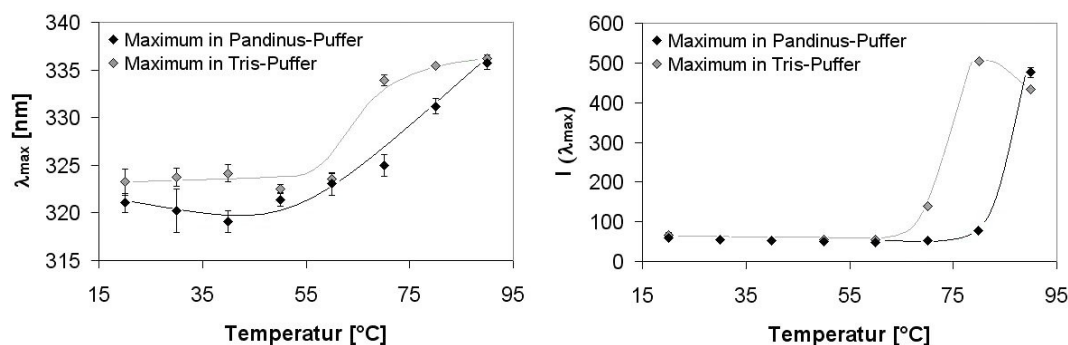


Abbildung 26: Fluoreszenzemissionsmaximum und Fluoreszenzintensitäten von Hämocyanin, nach zehn Minuten Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

Aufgenommen wurde **a** das Maximum der Fluoreszenzemission bei maximaler Emissionswellenlänge dient. Es dient als Indikator für **b** die maximale Intensität der Fluoreszenz. Die stabilisierende Wirkung von Ca^{2+} und Mg^{2+} ist zu erkennen.

Baseline-korrigierte Mittelwerte aus zwei Ansätzen mit je zwei Messungen. Der Fehler des Mittelwertes wurde abgetragen. Weitere Bedingungen siehe Abbildung 25.

Das Fluoreszenzmaximum (Abbildung 26a) schwankt zu Beginn der Temperaturreihe um seinen nativen Wert von 324 nm. Bei Inkubation in Tris-Puffer mit 70°C oder höheren Temperaturen verschiebt sich die Lage des Fluoreszenzmaximums sprunghaft um 10 nm in den

längerwelligen Bereich. Parallel dazu nimmt auch die Fluoreszenzintensität am Ort des Maximums deutlich zu, am Ende um mehr als das dreieinhalb-fache. Bei 70°C zeichnet sich demnach der Beginn der Denaturierung durch die Erhöhung der Fluoreszenzintensität ab: Die Intensität des nativen Startwertes springt von 56 auf 138, der Endwert der mittleren Fluoreszenzintensität beträgt bei 80°C und 90°C etwa 470 (Abbildung 26b).

Bei Inkubation und Erhitzung in Pandinus-Puffer verschiebt sich das Fluoreszenz-Maximum dagegen nur allmählich in den längerwelligen Bereich. Eine deutliche Abweichung vom Maximalwert kann ab einer Temperatur von 80°C festgestellt werden. Die Betrachtung der Fluoreszenzintensität lässt den Beginn der Denaturierung sogar erst bei 94°C feststellen. Die Metallsalze $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (je 10 mM im Pandinus-Puffer) wirken demnach stabilisierend auf die Quartär- und Tertiärstruktur des Hämocyanins.

3.3.1.2 Bestimmung der Thermostabilität von Sekundärstrukturelementen

Nach der Betrachtung des Gesamtmoleküls sollten Messungen mittels CD-Spektroskopie Aufschluss über die Stabilität der Sekundärstrukturelemente gegenüber thermischer Denaturierung geben. Dazu wurde Hämocyanin 10 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und Circular dichroismus-Spektren aufgenommen (Abbildung 27).

Bei der CD-Spektroskopie ergibt sich ein für Hämocyanin charakteristisches Differenzspektrum mit einem Maximum im Fern-UV-Bereich und einem Doppelminimum um 210 nm. Die

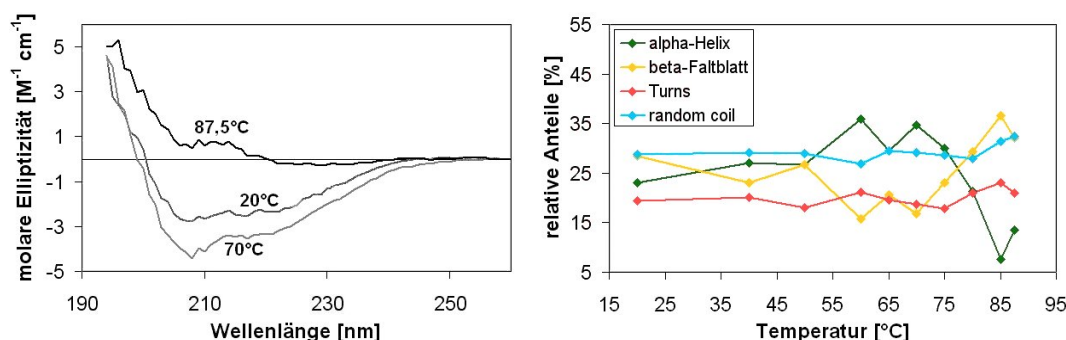


Abbildung 27: Circular dichroismus-Spektren und Sekundärstruktur von *Pandinus imperator*-Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.

CD-Spektren von zwei verschiedenen Hämocyanin-Isolierungen wurden von 196 nm bis 260 nm aufgenommen. Hämocyanin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde in 1:10-verdünntem 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) jeweils 10 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert, dann wurde von jeder Probe drei Differenzspektren bei 20°C aufgenommen. Die Daten wurden mit CDPPro ausgewertet. Verwendetes durchschnittliches Aminosäuregewicht von *E. californicum* für *P. imperator*: 114,55 Da.

Als problematisch stellt sich die Eigenabsorption der Puffersubstanz Tris dar; sie verhindert, trotz Verdünnung, eine Datenaufnahme im UV-Bereich unterhalb von 196 nm.

a Differenzspektren (x-Achsen-korrigiert): Mittelwerte von je drei Messungen bei 20°C, 70°C und 90°C.

b Anteile der Sekundärstrukturen nach Auswertung mit CDPPro.

mit CDPro ausgewerteten Daten ergeben für Skorpion-Hämocyanin im nativen Zustand circa 23 % α -Helices, 28 % β -Faltblättern, 19 % Turns und 29 % Strukturen, die als random coil bezeichnet werden (Abbildung 27 und Tabelle 18). Die Anteile der Sekundärstrukturelemente bleiben bei Erwärmung des Proteins bis 60°C ungefähr gleich. Danach beginnen die Anteile der Sekundärstrukturen zu schwanken, wobei sich vor allem die α -Helix als besonders empfindliches Element ausmachen lässt. Relativ unempfindlich gegen die Temperaturerhöhung sind die random coil-Strukturen. Der Verlust der korrekt gefalteten Sekundärstrukturelemente nimmt mit der Temperatur zu. Bei 87,5°C wird auch aus dem CD-Spektrum ersichtlich, dass das Protein zerstört ist. Bei Inkubationstemperaturen von 90°C und 95°C denaturiert das Hämocyanin; bei 95°C fällt es in weißen Flocken aus.

Temperatur [°C]	relativer Anteil an Sekundärstrukturelementen			
	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	random coil
20	23 %	28 %	19 %	29 %
40	27 %	23 %	20 %	29 %
50	27 %	27 %	18 %	29 %
60	36 %	16 %	21 %	27 %
65	29 %	21 %	20 %	29 %
70	35 %	17 %	19 %	29 %
75	30 %	23 %	18 %	29 %
80	21 %	29 %	21 %	28 %
85	8 %	37 %	23 %	31 %
87,5	14 %	32 %	21 %	32 %

Tabelle 18: Sekundärstruktur von *Pandinus imperator*-Hämocyanin bei verschiedenen Temperaturen.

Mittelwerte von zwei Proben, deren Daten mit CDPro (Selcon3, CDSSTR und Contin) ausgewertet wurden. Weitere Versuchsbedingungen siehe Legende Abbildung 27.

3.3.2 Stabilität gegenüber Detergenzien

Das Hämocyanin der Vogelspinne lässt sich durch Inkubation mit SDS zu einer Diphenoloxidase aktivieren ^[65, 150]. Auf die gleiche Art und Weise kann auch das Hämocyanin von *Pandinus imperator* enzymatisch aktiv werden (Kapitel 3.4). Um auszuschließen, dass das Hämocyanin bei der Inkubation mit dem Detergenz SDS vollständig denaturiert wird, wurde die Stabilität des Hämocyanins gegenüber Detergenzien untersucht.

3.3.2.1 Stabilität gegenüber SDS in geringen Konzentrationen

Oxygeniertes Hämocyanin zeigt neben einem für Proteine typischen Absorptionsmaximum bei 280 nm eine Absorption bei 340 nm, die durch den Kupfer-Sauerstoff-Komplex des aktiven Zentrums hervorgerufen wird. Sie verschwindet bei Deoxygenierung des Hämocyanins. Damit stellt die Extinktion bei 340 nm ein Maß für die Beladung mit Sauerstoff und somit für die Intaktheit des aktiven Zentrums dar.

Intaktes beziehungsweise voll oxygeniertes Hämocyanin hat einen Absorptionsquotienten $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ von 0,242 (*P. imperator*) beziehungsweise 0,254 (*E. californicum*) (Kapitel 2.12.1 und Tabelle 19). Bei Deoxygenierung nimmt der Quotient ab und hat bei vollständiger Sauerstoffentladung einen Wert von circa 0,036 für Skorpion- und circa 0,023 für Vogelspinnen-Hämocyanin. Als Relativwert ausgedrückt ist Hämocyanin bei einem Absorptionsquotienten von 100 % (Ausgangswert) voll oxygeniert, bei noch etwa 15 % (*P. imperator*) beziehungsweise 8 % (*E. californicum*) des Quotienten maximal deoxygeniert (Tabelle 19). Da die optische Dichte bei 340 nm durch die Flanke des Absorptionspeaks der aromatischen Aminosäuren nicht auf Null absinken kann, nimmt auch $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ nicht Null an. Zur Vereinfachung wird bei weiteren Auswertungen der Startwert des Quotienten als 100 % Oxygenierung und ein Absorptionsquotient von 15 % (*P. imperator*) beziehungsweise 8 % (*E. californicum*) in einen Oxygenierungsgrad von 0 % umgerechnet.

Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$				
<i>Pandinus imperator</i>	oxy	0,248	oxy [%]	100
	deoxy	0,036	deoxy [%]	14,5
	reoxy	0,257		
	Standard oxy	0,242 ¹		
<i>Eurypelma californicum</i>	oxy	0,280	oxy [%]	100
	deoxy	0,023	deoxy [%]	8,1
	reoxy	0,270		
	Standard oxy	0,254 ²		

Tabelle 19: Absorptionskoeffizient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ als Maß für die Sauerstoffbeladung.

Hämocyanin von *P. imperator* und *E. californicum* ist bei normalem Sauerstoffpartialdruck voll beladen^[194]. Bei weiteren Auswertungen wird der Startwert $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ der Reaktion als 100 % Oxygenierung und ein Absorptionsquotient von etwa 15 % (*P. imperator*) beziehungsweise 8 % (*E. californicum*) in einen Oxygenierungsgrad von 0 % umgerechnet. Mittelwerte aus ¹ 103 Messungen, ² 36 Messungen.

3.3.2.1.1 Stabilität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin gegenüber SDS

Die zeitabhängige Stabilität des aktiven Zentrums gegenüber SDS wurde anhand der Oxygenierung wie in Kapitel 2.18.1 beschrieben untersucht. Die Messungen wurden in Tris-

Puffer (pH 7,8) bei 25°C durchgeführt. Die SDS-Konzentration betrug 2 mM, entsprechend der Menge, mit dem das Hämocyanin normalerweise aktiviert wird (Kapitel 3.4 und 3.6.2).

Während der mehrere Stunden andauernden Inkubation des Hämocyanins mit 2 mM SDS kommt es zur Deoxygenierung des aktiven Zentrums. Dieser Verlust kann nicht auf die

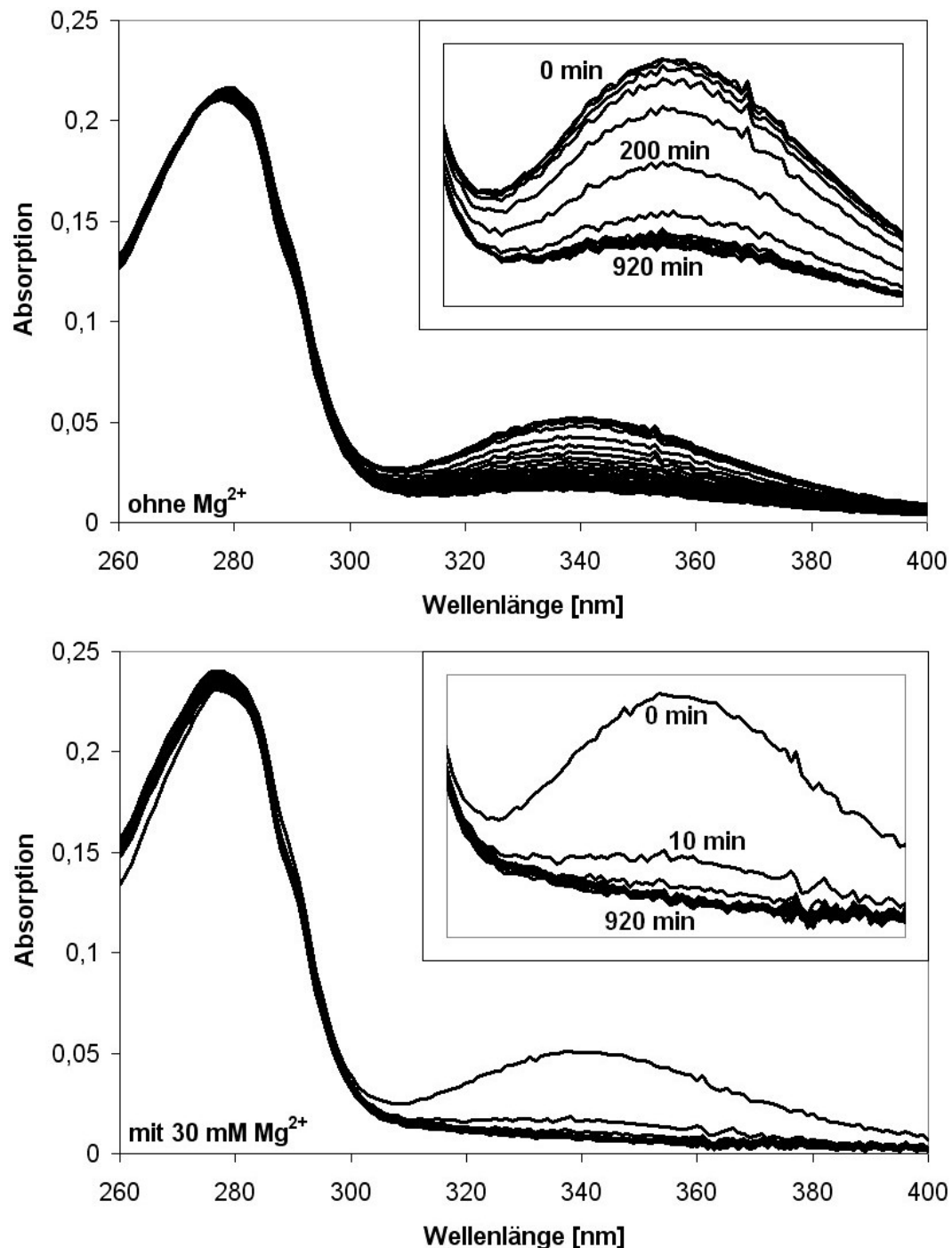


Abbildung 28: Deoxygenierung des aktiven Zentrums als Maß für die Stabilität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin gegenüber SDS.

a Bei einer Temperatur von 25°C wurde über einen Zeitraum von 14 h alle 5 min Absorptionsspektren von Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) und 2 mM SDS aufgenommenen.

b Identischer Ansatz, bei dem 30 mM Mg²⁺ in Form von MgCl₂-Lösung zugegeben wurde. Kinetik siehe Abbildung 113.

Inkubationstemperatur von 25°C zurückgeführt werden, da das Hämocyanin bis mindestens 40°C stabil ist (wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben). Der Sauerstoffverlust kann nicht durch Einleiten von Luft in die Probe rückgängig gemacht werden. Folglich wirkt hier das SDS am aktiven Zentrum.

Bei Inkubation in Tris-Puffer (Abbildung 28a) vollzieht sich der Sauerstoffverlust allmählich; innerhalb der ersten Stunde sinkt die Absorption bei 340 nm nur geringfügig ab. Im weiteren zeitlichen Verlauf nimmt die Oxygenierung dann langsam, aber kontinuierlich weiter ab. Nach fünfzehn Stunden ist das lokale Maximum bei 340 nm nicht vollständig verschwunden, das Hämocyanin hat demzufolge noch Sauerstoff am aktiven Zentrum gebunden.

Der Quotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ nimmt im Verlauf des Experiments langsam ab (Tabelle 20). Dies ist bedingt durch den kontinuierlichen Sauerstoffverlust und damit verbundene Abnahme der Absorption bei 340 nm. Die Oxygenierung, repräsentativ für die Stabilität, sinkt also kontinuierlich ab. Die Streuung dagegen (Absorptionsquotient $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$) nimmt nur sehr wenig zu. Der empfindlichste Teil des Hämocyanins ist also tatsächlich das aktive Zentrum.

Das gesamte Protein ist trotz Anwesenheit von 2 mM SDS relativ stabil. Über die Quartärstruktur kann allerdings mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

3.3.2.1.2 Stabilität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin gegenüber SDS mit MgCl_2

Da das Hämocyanin standardmäßig in einem MgCl_2 -haltigen (10 mM) Puffer aufbewahrt und in den Versuchen zur Aktivierung der Phenoloxidase unter anderem auch die Abhängigkeit von verschiedenen Salz-Konzentrationen gemessen werden sollte, wurde die Stabilität der Oxygenierung von *P. imperator*-Hämocyanin gegenüber SDS in Verbindung mit 30 mM MgCl_2 untersucht.

Unter diesen Bedingungen kommt es deutlich schneller zu einer Abnahme der Absorptionsbande bei 340 nm als zuvor (Abbildung 28b). Die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen setzt die Fähigkeit des Hämocyanins beziehungsweise des aktiven Zentrums, Sauerstoff reversibel zu binden, herab. Zu dem Sauerstoffverlust kommt es jedoch nicht allmählich, sondern fast ausschließlich innerhalb der ersten Stunde: Bereits nach fünf Minuten Inkubation mit Mg^{2+} hat das Hämocyanin einen Absorptionquotienten $^{280\text{ nm}} / ^{340\text{ nm}}$, der nur noch 55 % der anfänglichen Sauerstoffbeladung entspricht. Nach einer halben Stunde ist die Absorption im Ansatz mit Mg^{2+} bereits nahezu auf den Endwert gesunken (Tabelle 20). Auch das gesamte Protein reagiert auf SDS in Kombination mit Mg^{2+} empfindlicher, die Streuung bei 250 nm ist deutlich höher als im Ansatz ohne MgCl_2 . Sie nimmt allerdings nicht so drastisch zu wie die Sauerstoffbeladung abnimmt.

Im Gegensatz zu einem stabilisierenden Effekt auf den Zusammenhalt der Untereinheiten oder der Sekundärstrukturelemente bei Temperaturerhöhung, der dem MgCl_2 und CaCl_2 in der Hämolymphe, beziehungsweise in *Pandinus*-Puffer zukommt, hat das Mg^{2+} hier einen destabilisierenden Effekt auf das aktive Zentrum, der zur Dexoxygenierung und zum Teil auch noch zur Denaturierung (zunehmende Streuung) führt.

Inkubations- dauer	<i>Pandinus</i> 0mM Mg ²⁺		<i>Pandinus</i> 30mM Mg ²⁺		<i>Eurypelma</i> 0mM Mg ²⁺		<i>Eurypelma</i> 30mM Mg ²⁺	
	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.
0 h	100	0	100	0	100	0	100	0
0,25 h	97,2	1,4	11,4	18,1	72,7	-0,7	92,0	-0,3
0,5 h	92,8	0,8	2,0	18,8	71,8	-0,7	88,1	-0,1
1 h	84,6	0,8	-1,6	14,6	71,5	-0,6	82,4	-0,2
2 h	69,2	0,6	-1,7	14,7	71,9	0,5	74,3	1,1
3 h	59,1	0,5	-0,2	16,5	72,2	1,1	68,4	2,2
4 h	50,2	0,7	-0,1	17,2	72,2	2,0	63,3	3,6
5 h	43,2	1,0	-0,6	18,0	72,9	2,8	60,3	4,6
7,5 h	33,5	2,3	-1,0	19,1	73,7	4,9	54,5	6,7
10 h	27,3	4,1	-0,2	19,5	74,7	7,8	51,2	8,3
12,5 h	23,4	5,7	0,1	20,6	75,5	8,9	48,5	9,4
15 h	21,5	7,4	0,5	22,0	77,2	11,6	47,6	10,4

Tabelle 20: Relative Oxygenierung und Streuung (in %) von 24-merem Skorpion- und Spinnen-Hämocyanin gegenüber SDS und Mg²⁺.

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 28. Die zeitabhängige Oxygenierung (O₂) des aktiven Zentrums gegenüber SDS wurde anhand des Quotienten $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ errechnet; das Absorptionsverhältnis $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ zum Versuchsbeginn entspricht dem Ausgangswert mit 100 % gebundenem Sauerstoff.

Die Streuung (Streu.) wurde anhand des Verhältnis $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ berechnet. Der Wert dieses Absorptionsquotienten zu Versuchsbeginn stellt 0 % Streuung dar.

Mittelwerte aus zwei Messungen. Kinetik siehe Abbildung 113. Berechnungen zur Auswertung der Absorptionsquotienten wie in Kapitel 2.18.1 beschrieben.

Es stellt sich die Frage, welchen Effekt das SDS genau hervorruft: Entfaltet es alle Hämocyanin-Untereinheiten gleichmäßig, oder reagieren einige Untereinheiten empfindlicher als andere und sind bereits entfaltet, während andere noch zum größten Teil intakt sind. Auch bleibt unklar, ob das aktive Zentrum tatsächlich nur noch zur Hälfte in seiner korrekten Faltung vorliegt, oder ob bei der Hälfte aller Hämocyanine das aktive Zentrum vollständig denaturiert wurde und die andere Hälfte nicht. (Die wäre zumindest für die Sauerstoffbeladung unerheblich.) Die dritte mögliche Vorstellung, dass nur die Sauerstoffaffinität besonders empfindlich gegenüber SDS ist, so dass das Hämocyanin deoxygeniert, in seiner Struktur jedoch weitgehend funktionell bleibt, ist sehr wahrscheinlich.

SDS in der Konzentration von 2 mM kann nicht nur mit dem Hämocyanin, sondern eventuell auch mit dem Magnesiumsalz interagieren. Ohne Mg²⁺ liegt die kritische micelläre Konzentration CMC von SDS bei etwa 7,8 mM (Berechnung nach ^[175], siehe Kapitel 2.24). Für MgCl₂ liegen keine geeigneten Daten vor, mit 30 mM Mg(ClO₄)₂ liegt die CMC bei circa 1 mM SDS

und damit unter der im Ansatz vorhandenen Konzentration von 2 mM. Die Reaktion zwischen Hämocyanin und SDS finden demzufolge nicht unbedingt unter den gleichen Bedingungen statt, da das Hämocyanin einmal mit frei gelösten SDS-Molekülen und einmal mit SDS-Micellen interagieren muss.

Untersuchungen zur SDS-Stabilität von Hämocyanin mittels CD-Spektroskopie oder der analytischer Ultrazentrifugation wurden nicht vorgenommen.

3.3.2.1.3 Stabilität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin gegenüber SDS mit CaCl_2

Im Anbetracht der Wirkung von Mg^{2+} auf die Stabilität von Hämocyanin wäre es von Interesse gewesen, den Einfluss von Ca^{2+} ebenfalls zu untersuchen.

Allerdings wird die Löslichkeit von SDS (Natriumdodecylsulfat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) in Anwesenheit von Ca^{2+} durch das Löslichkeitsprodukt von Calciumdodecylsulfat bestimmt. Das anionische Detergens SDS kann in der Form von Kalkseife $\text{Ca}(\text{DS})_2$ ausfallen. Die Löslichkeit von $\text{Ca}(\text{DS})_2$ nimmt mit steigenden Calcium-Konzentrationen ab ^[195].

Dies führt dazu, dass bei den verwendeten Ca^{2+} - und SDS-Konzentrationen $\text{Ca}(\text{DS})_2$ in der Reaktionslösung ausfällt. Wie in Abbildung 29 zu erkennen, fällt Ca^{2+} bei einer SDS-Konzentration von 2 mM schon ab einer Menge von 1,1 mM aus. Durch das ausfallende $\text{Ca}(\text{DS})_2$ kann weder die SDS- noch die Ca^{2+} -Konzentration konstant gehalten oder genau bestimmt werden. Analoge Versuche zur Ca^{2+} -Abhängigkeit wie zu denen mit Mg^{2+} können daher nicht durchgeführt werden.

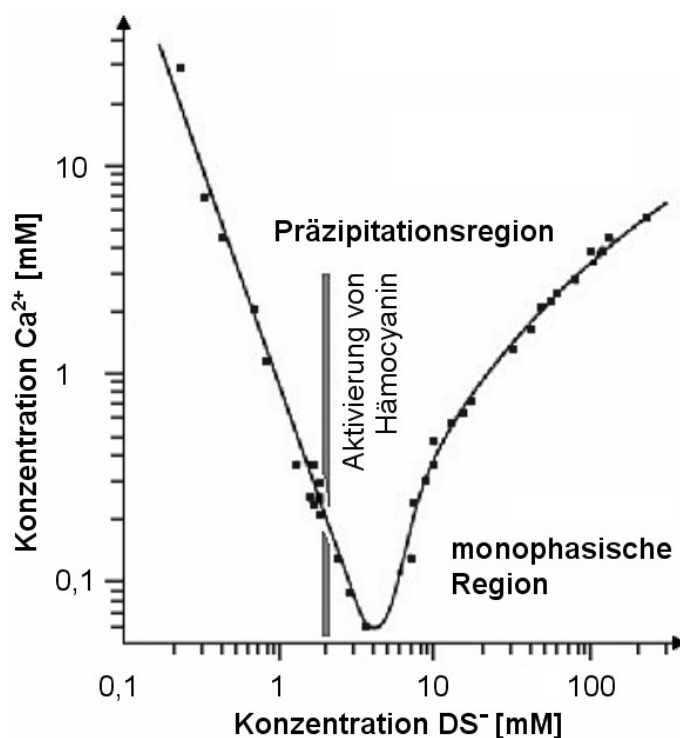


Abbildung 29: Präzipitationsregion des Calciumdodecylsulfat-Systems.

Werte für eine Temperatur von 25°C; aus ^[195].

3.3.2.1.4 Stabilität von *E. californicum*-Hämocyanin gegenüber SDS

Das Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* wurde bereits hinsichtlich seiner Stabilität gegenüber verschiedenen Detergenzien ^[186] und der Temperatur ^[196] untersucht und

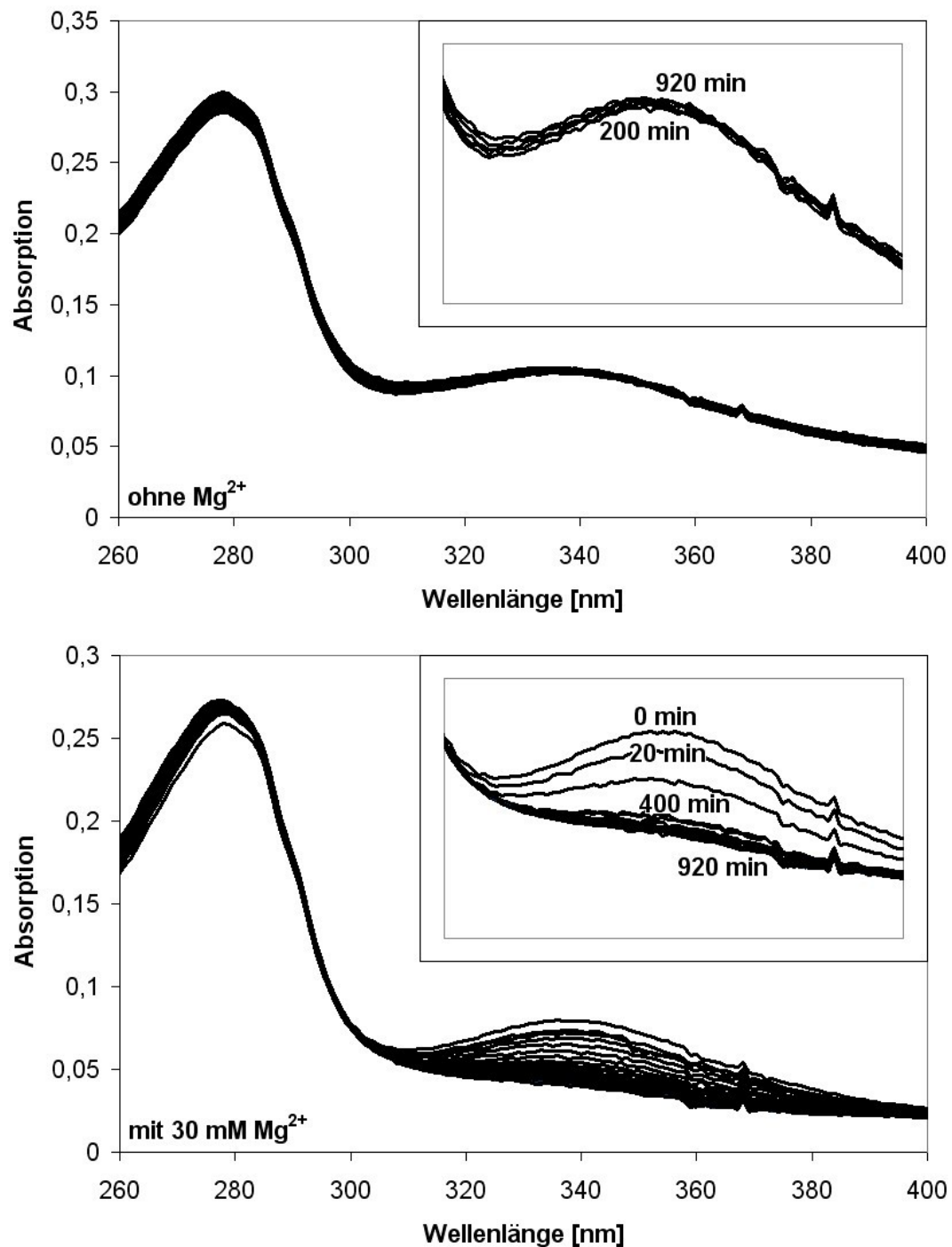


Abbildung 30: Deoxygenierung des aktiven Zentrums als Maß für die Stabilität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin gegenüber SDS.

a Bei einer Temperatur von 25°C wurde über einen Zeitraum von 14 h alle 5 min Absorptionsspektren von Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) und 2 mM SDS aufgenommenen.

b Identischer Ansatz, bei dem 30 mM Mg²⁺ in Form von MgCl₂-Lösung zugegeben wurde. Kinetik siehe Abbildung 113.

zeigte dabei große Widerstandsfähigkeit gegenüber diesen denaturierenden Faktoren. Seine Stabilität beziehungsweise die Beständigkeit des Oxygenierungsgrades gegenüber SDS soll hier dem Vergleich zum Hämocyanin von *P. imperator* dienen.

Die Versuche mit dem Hämocyanin der Spinne wurden entsprechend den Versuchen mit Skorpion-Hämocyanin durchgeführt und wie in Kapitel 2.18.1 beschrieben ausgewertet.

Ohne Mg^{2+} scheint das Hämocyanin durch SDS keinerlei Veränderungen zu erfahren (Abbildung 30a). Nach mehreren Stunden Inkubationszeit pegelt sich der Quotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ auf Werte um 70 % ein (Tabelle 20). Streuung entsteht erst nach zwei bis drei Stunden und nimmt dann langsam zu. Damit ist das Hämocyanin von *E. californicum* hinsichtlich seiner Sauerstoffbindung stabiler, was das Gesamtprotein betrifft etwas instabiler als das Hämocyanin von *P. imperator*.

Mit Mg^{2+} (Abbildung 30b) ist auch das Hämocyanin der Vogelspinne deutlich anfälliger für den Verlust des Sauerstoffs am aktiven Zentrum. Der Quotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ fällt im Lauf der Inkubationszeit auf etwa die Hälfte; die Streuung nimmt allerdings nicht stärker zu als ohne Mg^{2+} . Im Gegensatz zu *P. imperator*-Hämocyanin verliert das Hämocyanin von *E. californicum* seinen Sauerstoff beziehungsweise die Absorptionsbande bei 340 nm nicht plötzlich, sondern nach und nach.

3.3.2.1.5 Stabilität von *Pandinus imperator*-Dissoziat gegenüber SDS

Identische Versuche wurden mit Dissoziat von *P. imperator*-Hämocyanin durchgeführt. Diese Experimente geben Hinweise darauf, inwieweit die Oligomerstruktur zur Stabilität und Sauerstoffbeladung beiträgt.

Wie in Tabelle 21 zu sehen ist, nimmt die Oxygenierung von dissoziiertem *P. imperator*-Hämocyanin bei Inkubation mit 2 mM SDS schnell ab. Bereits innerhalb der ersten 5 min sinkt sie auf 65 % des Ausgangswertes, wenn keine Mg^{2+} -Kationen im Ansatz sind. Im Oligomer wird dieser Wert erst nach circa zweieinhalb Stunden erreicht. Nach zehn Stunden hat das aktive Zentrum des oligomeren Proteins etwas mehr Sauerstoff als das Dissoziat verloren, dieser Unterschied kann aber sicherlich durch Messfehler und geringfügige Unterschiede zwischen den verschiedenen Hämocyanin-Isolierungen erklärt werden.

Zu Versuchsbeginn reagiert das Dissoziat also empfindlicher auf SDS als das native Protein, nach langer Inkubation verhalten sich die beiden Hämocyanin-Präparationen im Hinblick auf die Oxygenierung jedoch wieder ähnlich. Hinsichtlich der Stabilität des Gesamtproteins reagiert das Dissoziat deutlich empfindlicher als das Oligomer, die Streuung ist stärker.

Mit Mg^{2+} im Ansatz fällt die Oxygenierung der Untereinheiten vergleichbar stark ab wie ohne Mg^{2+} . Die Streuung dagegen bleibt offensichtlich geringer und schwankt nur um den Anfangswert.

3.3.2.1.6 Stabilität von *E. californicum*-Hämocyanin Dimer *bc*

Die gleichen Versuche wurden auch mit dem Hämocyanin-Dimer *bc* von *E. californicum* durchgeführt. Dieses Dimer besteht aus phylogenetisch eng verwandten Untereinheiten, deren Entwicklung sich schon sehr früh von der anderer Untereinheiten abgespalten hat ^[6]. Es ist beim Spinnen-Hämocyanin für die Phenoloxidase-Aktivität verantwortlich.

Inkubations- dauer	<i>Pandinus</i> 0mM Mg ²⁺		<i>Pandinus</i> 30mM Mg ²⁺		<i>Eurypelma bc</i> 0mM Mg ²⁺		<i>Eurypelma bc</i> 30mM Mg ²⁺	
	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.	O ₂	Streu.
0 min	100	0	100	0	100	0	100	0
5 min	65,4	9,5	41,8	1,2	95,7	0,9	95,0	0
10 min	50,0	8,9	43,4	-2,1	97,0	1,8	90,6	-0,7
15 min	47,4	11,4	33,7	-4,8	96,4	1,5	89,8	-0,3
30 min	41,1	12,3	27,5	-3,1	95,6	2,0	86,0	-0,4
45 min	46,4	13,1	21,3	-4,9	93,9	1,6	80,0	-0,5
60 min	38,6	14,2	12,8	-4,1	94,8	2,1	74,4	0,3
90 min	41,6	12,8	52,4	-5,7	93,6	1,8	69,5	-0,3
120 min	36,1	16,3	30,1	-6,0	93,5	2,0	67,0	-0,9
9 h	32,2	32,3	22,7	-2,2	103,0	9,6	49,9	5,3
10 h	32,6	34,6	34,4	-0,6	103,0	10,4	48,2	6,3

Tabelle 21: Relative Oxygenierung und Streuung (in %) von dissoziiertem Skorpion-Hämocyanin und den isolierten Spinnen-Hämocyanin-Untereinheiten *bc* gegenüber SDS und Mg²⁺.

Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen. Legende siehe Tabelle 20. Kinetik siehe Abbildung 115.

Analog zu den vorherigen Versuchen wurde das Dimer in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml über einen Zeitraum von 12 h inkubiert; der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ dient als Maß für die Stabilität des Hämocyanins.

Wie in Tabelle 21 zu sehen, verändert sich die Oxygenierung des Hämocyanin-Dimers *bc* kaum und ist damit wesentlich stabiler als die der *P. imperator*-Untereinheiten. Auch hier hat Mg²⁺ Auswirkung auf die langfristige Oxygenierung des aktiven Zentrums, die mit Mg²⁺ und SDS stetig absinkt und nach circa neun Stunden nur noch 50 % des Ausgangswerts beträgt. Natives *E. californicum* braucht zwölfteinhalb Stunden bis es ebenso weit deoxygeniert ist.

Für die Gesamtstruktur der Untereinheiten *bc* ist Anwesenheit von Mg²⁺ wiederum günstig, die Streuung nach zehn Stunden ist geringer.

Weitere strukturelle Veränderungen außer der Deoxygenierung lassen sich qualitativ nur schlecht feststellen. Andere Versuchsanordnungen können darüber eventuell Aufschluss geben: Die Funktionalität eines Enzyms kann leicht durch seine Funktion überprüft werden. Die hochspezifische Reaktion des Mono- beziehungsweise Diphenolumsatzes kann nicht durch ein deoxygeniertes Hämocyanin oder gar ein denaturiertes Enzym katalysiert werden. Der Substratumsatz von mit SDS inkubiertem Hämocyanin wird in Kapitel 3.7 untersucht.

3.3.2.2 Stabilität gegenüber SDS in höheren Konzentrationen

Das aktive Zentrum als sensibelster Bestandteil des Hämocyanins verliert bereits bei geringen Mengen an denaturierendem Detergenz die Fähigkeit, Sauerstoff zu binden. Dies wird durch die beschriebenen spektroskopischen Untersuchungen belegt. Sie sagen allerdings nur wenig über die generelle Stabilität der Quartärstruktur des Proteins aus.

Aus diesem Grund wurden höhere Konzentrationen des anionischen Detergens SDS mit 100 µg Hämocyanin (3,3 mg/ml) von *Pandinus imperator* inkubiert. Dabei wurden Hämocyanin und SDS entweder in Pandinus-Puffer (0,1 M Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, pH 7,8)

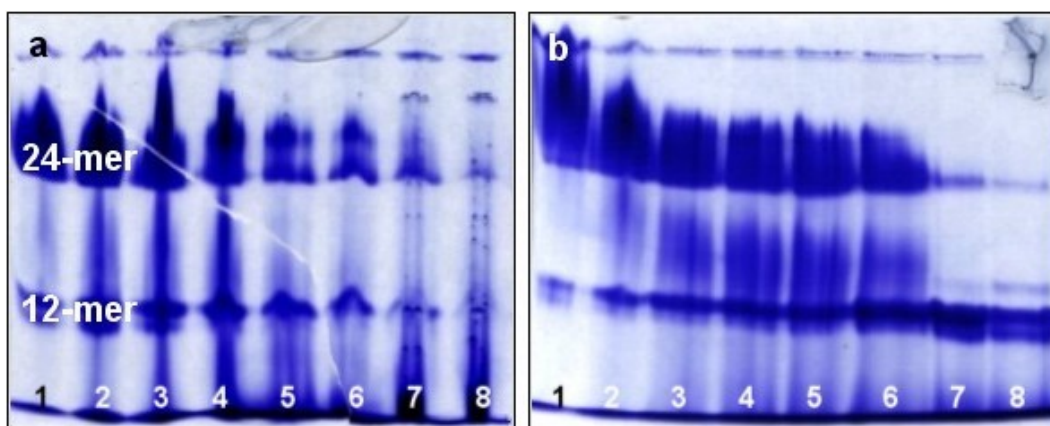


Abbildung 31: Native PAGE (5 %, pH 7,5) mit denaturiertem Hämocyanin von *P. imperator*.

Natives Hämocyanin wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Denaturierungsmittel SDS (links) oder Guanidin-Hydrochlorid (rechts) für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 60 µg der Probe auf ein natives Gel aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Durch die Überladung der Gele wird nicht nur die Zerstörung der Quartärstruktur (Zunahme der 12-mer-Bande) sichtbar, sondern auch der Zerfall des Hämocyanins in zahlreiche Bruchstücke unterschiedlicher Größe, die zur Verschmierung der Spuren führen.

a Hämocyanin mit Denaturierungsmittel SDS (Natriumdodecylsulfat) in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8). Spur 1: natives 24-meres Hc; Spur 2-8 mit SDS in Konzentrationen von Spur 2: 1 mM; Spur 3: 2 mM; Spur 4: 5 mM; Spur 5: 10 mM; Spur 6: 12,5 mM; Spur 7: 15 mM; Spur 8: 20 mM SDS.

b Hämocyanin mit Denaturierungsmittel Gdn (Guanidin-Hydrochlorid) in Pandinus-Puffer. Spur 1: natives 24-meres Hc; Spur 2-8 mit Gdn in Konzentrationen von Spur 2: 0,1 M; Spur 3: 0,25 M; Spur 4: 0,5 M; Spur 5: 0,75 M; Spur 6: 1 M; Spur 7: 1,5 M; Spur 8: 2 M Gdn.

oder in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) gemischt. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurden die Proben auf native 5-prozentige Gele aufgetragen und mit intakten 24-meren verglichen (Abbildung 31a).

Natives Hämocyanin, das 24 h ohne Detergenzien bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, zeigt keine Anzeichen von Denaturierung. Es zerfällt zwar auf dem Gel wie üblich teilweise in Halbmoleküle, dies ist aber auch bei frischen und gekühlten Proben der Fall und kein Zeichen von Denaturierung. In Tris-Puffer scheinen SDS-Konzentrationen von 1 mM bis 2 mM kaum Auswirkung auf das Protein zu haben. Der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Sauerstoffverlust bei Inkubation mit 2 mM SDS rührt also nur von der Deoxygenierung des aktiven Zentrums, nicht von Denaturierung des Gesamtproteins her, wie bereits die Streudaten (Absorptionsquotient $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$) nahelegen. Bei Proben, die mit 5 mM SDS oder mehr inkubiert worden waren, nimmt die Stärke der 24-meren Bande ab. Das SDS sorgt für eine Dissoziation und / oder Denaturierung in Monomere und weitere niedermolekulare Hämocyanin-Partikel. Ähnlich, wie die Stärke der Proteinbande des 24-meren Hämocyanins abnimmt, verringert sich auch die Menge an 12-merem Protein, während die Menge an niedermolekularen Partikeln zunimmt (besonders deutlich zu sehen bei Überbeladung des Gels). Bei einer Konzentration von 20 mM SDS ist das oligomere Hämocyanin praktisch nicht mehr vorhanden.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommt man auch bei einer Inkubation des Hämocyanins in Pandinus-Puffer.

3.3.2.3 Stabilität gegenüber Guanidin

Ebenfalls untersucht wurde die Stabilität der Hämocyanin-Struktur gegenüber dem Denaturierungsmittel Guanidin-Hydrochlorid. Es bindet an die Peptidbindung, erhöht die Löslichkeit dieser Bindung und linearisiert so das Protein ^[197]. Wiederum wurden verschiedene größere Mengen an Guanidin mit 100 µg Hämocyanin (3,3 mg/ml) für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und auf 5-prozentigen nativen Gelen untersucht (Abbildung 31b). In Pandinus- wie auch in Tris-Puffer scheint das Hämocyanin zum größten Teil bis zu einer Guanidin-Hydrochlorid-Konzentration von circa 1 M stabil zu sein. Bei Inkubation in einfachem Tris-Puffer wird ein Verlust in der 24-meren Bande dann bei niedrigeren Guanidin-Konzentrationen sichtbarer als bei Inkubation in Pandinus-Puffer mit zusätzlich je 10 mM MgCl₂ und CaCl₂ in der Lösung. Bei einer Guanidin-Hydrochlorid-Konzentration von 2 M geht die native Struktur des Hämocyanins vollständig verloren, es liegt nicht mehr als 24-mer, sondern als 12-mer oder in kleineren Teilen vor. Der Denaturierungsprozess beginnt allerdings schon früher, was sich wie bei den Versuchen mit SDS durch die Entstehung von niedermolekularen Fragmenten abzeichnet (Kapitel 3.3.2.2).

3.3.2.4 Stabilität in Borat-Puffer mit Harnstoff und Methanol

Mitte 2006 veröffentlichten Morioka et al. ^[198] eine Untersuchung zu der Stabilität von *Octopus vulgaris*-Hämocyanin in Borat-Puffer (pH 9,0) mit 8 M Harnstoff und 10 % Methanol. In Anwesenheit dieser hohen Harnstoff-Konzentration dissoziiert das Protein zwar in seine Untereinheiten, wird aber laut Morioka et al. in seinem Oxygenierungsgrad nur unwesentlich beeinflusst.

Diese Versuche wurden mit Hämolymphe von *Octopus vulgaris* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Beltramini, Universität Padua, Italien) und Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* wiederholt (Abbildung 32). Dabei stellt sich das Cheliceraten-Hämocyanin als relativ stabil dar (Abbildung 32a und b): Es kommt zu keiner mit dem Auge erkennbaren Aggregatbildungen oder sonstigen Denaturierungserscheinungen. Das Hämocyanin wird allerdings deoxygeniert, der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ nimmt bereits nach zwei Minuten sichtbar ab und fällt weiter (Abbildung 32d). Bei beiden Hämocyaninen von *E. californicum* und *P. imperator* ist der Verlust der Absorptionsbande bei 340 nm vergleichbar. Hämocyanin von *O. vulgaris* reagiert deutlich weniger empfindlich als das der Cheliceraten, allerdings kommt es auch hier, im Gegensatz zu den Versuchen von Morioka et al. ^[198] zu einem Sauerstoffverlust.

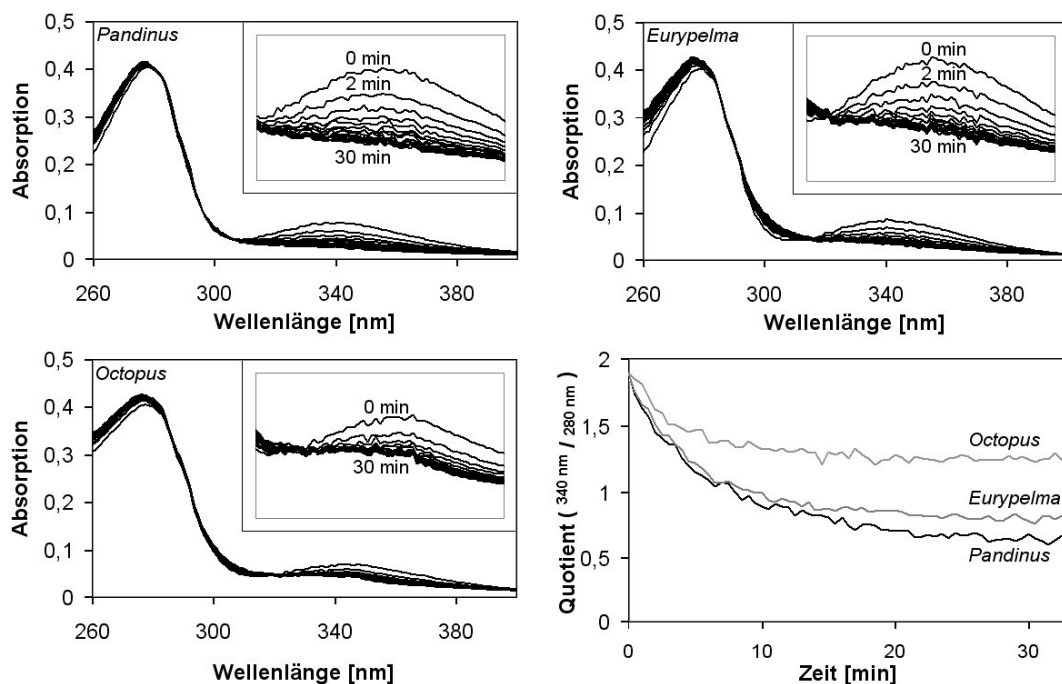


Abbildung 32: Stabilität von Hämocyanin in Borat-Puffer mit Harnstoff und Methanol.

Verschiedene Hämocyanine wurden für 30 min in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 0,5 M Borat-Puffer (pH 9,0) mit 8 M Harnstoff und 10 % Methanol inkubiert. Über einen Zeitraum von 30 min wurden alle 30 s Absorptionsspektren aufgenommen.

a Hämocyanin von *Pandinus imperator*.

b Hämocyanin von *Eurypelma californicum*.

c Hämolymphe von *Octopus vulgaris* (zur Verfügung gestellt von Prof. Beltramini, Universität Padua, Italien).

d Kinetik zur Stabilität: abgebildet ist der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ aus a bis c.

Die Inkubation und Stabilität von Hämocyanin in Borat-Puffer mit Harnstoff und Methanol ist dahingehend von Interesse, da Morioka et al. ^[198] nach Zugabe von 16 mM Methylphenol (*p*-Cresol) eine Abnahme der Absorption bei 340 nm und eine Zunahme an Catechol (4-Methyl-1,2-Dihydroxybenzol) feststellten. Diese Beobachtungen werden von Morioka et al. dahingehend interpretiert, dass der Harnstoff für eine partielle Konformationsänderung verantwortlich ist, die, ähnlich wie bereits durch Decker, Tuzek und Jaenicke ^[86, 199] beschrieben, den Zugang zum aktiven Zentrum für das Substrat ermöglicht.

Als Vorgriff auf das nächste Kapitel ist bei einer Wiederholung dieser Versuche mit Hämolymphe von *Octopus vulgaris* tatsächlich ein schwacher Umsatz von 4-Methylcresol zu beobachten (Abbildung 33). Die Färbung ist allerdings sehr schwach und beginnt ohne jede Verzögerungsphase. Die Enzymcharakteristik der Cresolase-Aktivität von *O. vulgaris*-Hämocyanin unterscheidet sich damit, wie noch zu sehen sein wird, deutlich von der des Cheliceraten-Hämocyanins.

Diese absorptionsspektroskopischen Ergebnisse können nicht bei einer Aktivitätsfärbung nach Gelelektrophorese wiederholt werden. Auch Cheliceraten-Hämocyanin in Borat-Puffer mit Harnstoff und 10 % Methanol ist weder bei spektroskopischen Versuchen frei in Lösung noch nach Gelelektrophorese zu einem Monophenolumsatz unter diesen Versuchsbedingungen in der Lage.

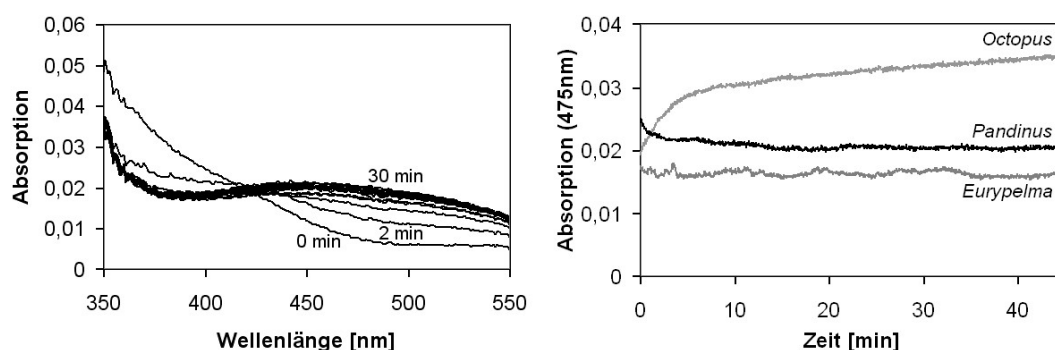


Abbildung 33: Monophenolumsatz in Borat-Puffer mit Harnstoff und Methanol.

Verschiedene Hämocyanine wurden für 30 min in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 0,5 M Borat-Puffer (pH 9,0) mit 8 M Harnstoff, 10 % Methanol und 1 mM *p*-Cresol inkubiert.

a Iterative Spektren des Substratumsatzes durch Hämolymphe von *Octopus vulgaris*.

b Kinetiken für die Monophenolhydroxylase-Aktivität von Hämolymphe von *Octopus vulgaris* und Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum*.

Fazit

Der Skorpion *P. imperator* ist als Bewohner der tropischen Wälder Westafrikas Temperaturen bis wenigstens 40°C ausgesetzt. Inkubation mit hohen Temperaturen gefährdet zwar die Stabilität des Hämocyanins, zeigt aber auch, dass die Widerstandsfähigkeit des Proteins gegenüber der Temperatur für den Lebensraum des Skorpions ausreichend ist. Das Medium, in dem sich das Hämocyanin befindet, ist entscheidend für die Beständigkeit der Struk-

tur. Die in Hämolymphe und im Pandinus-Puffer enthaltenen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen stabilisieren die Struktur des Proteins. Unter diesen Bedingungen kann die Temperaturstabilität von etwa 40°C ohne Ionen auf etwa 80°C mit je 10 mM $MgCl_2$ und $CaCl_2$ fast verdoppelt werden.

Liegen die aktiven Zentren nun nur noch partiell in korrekter Faltung vor, oder sind die Kupferkomplexe einiger Untereinheiten zerstört und anderer Untereinheiten nicht? Diese Frage kann auch bei eingehender Betrachtung (Kapitel 3.3.2) nicht geklärt werden. Ein aktives Zentrum ist entweder vollständig oxygeniert oder hat keinen Sauerstoff gebunden.

3.4 Enzymatische Aktivität von Hämocyanin

Insekten besitzen zur Aushärtung und Färbung ihres Exoskeletts sowie zur Immunabwehr Phenoloxidasen. Auch Crustaceen besitzen diese Phenoloxidasen, sie liegen gemeinsam mit den Sauerstoff-transportierenden Hämocyaninen in der Hämolymphe, zum Teil auch in den Hämocyten, vor.

Bei Verwundung oder Pathogenkontakt wird die inaktive Vorstufe der Phenoloxidase aktiviert [96, 103, 107, 116, 122, 147]. Die *in vivo*-Aktivierung erfolgt durch Prophenoloxidase-aktivierende Enzyme PPAE [97] oder Prophenoloxidase-aktivierende Proteine PAP [200], bei denen es sich in der Regel um Serinproteasen handelt. So wird beispielsweise beim Signalkrebs *Pacifastacus leniusculus* eine 81 kDa schwere Prophenoloxidase durch eine 36 kDa Serinprotease Trypsin-ähnlich hinter einem Arginin gespalten und damit aktiviert [79, 97]. Tatsächlich können zahlreiche Prophenoloxidasen *in vitro* durch Trypsin aktiviert werden [97, 201, 202].

Dieser proteolytischen und physiologischen Aktivierung steht die nicht-physiologische Aktivierung der latenten Phenoloxidasen durch Detergenzien gegenüber. Aktivierung vor allem mit dem anionischen Detergenz SDS hat eine mehr als vierzigjährige Tradition: Bereits

Organismus	Aktivatoren	Referenz	Jahr
Phenoloxidase			
<i>Agaricus bisporus</i>	SDS	[117]	1991
<i>Marinomonas sp.</i>	SDS	[203]	2002
Pflanzen	SDS	[204-206]	1958
zB <i>Dolichos lablab</i>	SDS, Säuren, Basen	[207]	2006
<i>Pyrus pyrifolia</i>	Oxalsäure, CaCl ₂ , Salicylsäure	[208]	2006
<i>Spinacia sp.</i>	Fettsäuren	[209]	1981
<i>Vicia faba</i>	SDS, Säuren, Basen, Pepsin, Harnstoff, Detergenzeien, Fettsäuren	[204, 205, 210-213]	1957
<i>D. melanogaster</i>	Alkohol	[214]	1993
<i>Periplaneta americana</i>	SDS, CPC	[215]	1990
<i>Sarcophaga bullata</i>	CPC	[78]	2000
<i>Astacus astacus</i>	SDS, Hitze (58°C)	[201]	1984
<i>Homarus americanus</i>	Ethanol, Aceton	[214]	1993
	SDS	[117]	1991
<i>Palinurus elephas</i>	SDS	[75]	2003

Tabelle 22: Auswahl an unphysiologischen Reagenzien zur Aktivierung der Phenoloxidase-Aktivität in latenten Tyrosinasen.

Organismus	Aktivatoren		Referenz
Hämocyanin			
<i>Octopus vulgaris</i>	SDS Harnstoff	DPO MPO	[111] [198]
<i>Sepia officinalis</i>	Subtilisin	DPO	[110]
<i>Helix pomatia</i>	Subtilisin	DPO / MPO	[110]
<i>Megathura crenulata</i>	SDS	DPO / MPO	[216]
<i>Haliotis tuberculata</i>	Trypsin SDS	DPO / MPO DPO	eigene Untersuchungen
<i>Astacus leptodactylus</i>	SDS Trypsin	DPO / MPO DPO	[114] [217]
<i>Bathynomus giganteus</i>	SDS	DPO	[218]
<i>Calappa granulata</i>	SDS	DPO	[217]
<i>Cancer pagurus</i> / <i>C. magister</i>	SDS	DPO	[65, 219]
<i>Carcinus maenas</i> / <i>C. aestuarii</i>	SDS, Trypsin Perchlorat	DPO	[217] [112]
<i>Homarus americanus</i>	SDS, Trypsin Perchlorat	DPO	[112]
<i>Palinurus elephas</i>	SDS, Trypsin	DPO	[217]
<i>Panulirus interruptus</i>	SDS, Trypsin	DPO / MPO	[217]
<i>Paralithodes camtschaticae</i>	SDS, Trypsin	DPO	[217]
<i>Penaeus japonicus</i> *	SDS	DPO / MPO	[113, 220, 221]
<i>Potamon potamion</i>	SDS	DPO	[217]
<i>Tachypleus tridentatus</i>	SDS	DPO	[107]
<i>Limulus polyphemus</i>	SDS, CPC, Lipide	DPO	diese Arbeit [115]
<i>Eurypelma californicum</i>	SDS, CPC und andere Trypsin	DPO / MPO	diese Arbeit Kapitel 3.6.1.1 und ^[106]
<i>Pandinus imperator</i>	SDS, CPC und andere	DPO / MPO	diese Arbeit Kapitel 3.6.1.1

Tabelle 23: Auswahl an unphysiologischen Reagenzien zur Aktivierung der Phenoloxidase-Aktivität in Arthropoden-Hämocyaninen.

Bei der Beschreibung der Hämocyanin-Aktivierung in der Literatur muss beachtet werden, ob nur eine Diphenoloxidase oder eine 'echte' Tyrosinase mit Monophenolhydroxylase-Aktivität nachgewiesen wurde.

* Eine Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde von Adachi et al. [113] beschrieben; unserer Meinung nach ist diese jedoch auf eine Verunreinigung zurückzuführen.

1964 beziehungsweise 1966 aktivierten Robb ^[211] und Swain ^[204] in *Vicia faba* durch SDS eine Tyrosinase. SDS ahmt die Aktivierung durch natürliche Substanzen wie zum Beispiel Fettsäuren nach ^[117]. Aufgrund leichter Verfügbarkeit und einfacher Handhabung wird SDS den natürlichen Aktivatoren bei *in vitro*-Untersuchungen vorgezogen und ist ein gängiges Mittel zur Aktivierung von Proenzymen (siehe Tabelle 22).

Die Aktivierung durch SDS ist vor allem deswegen interessant, weil sich nur wenige andere Enzyme durch SDS aktivieren lassen (die Pyruvat-Oxidase oder Xenopus-Tyrosinase ^[222, 223]), während die meisten Proteine dadurch denaturiert werden.

Eine Phenoloxidase-Aktivität bei einem anderen Enzym als einer 'echten' Phenoloxidase wurde erstmals 1938 beim Hämocyanin von *Cancer pagurus* und *Helix pomatia* durch Bhagvat und Richter nachgewiesen ^[219]. 1983 wurde von der Phenoloxidase-Aktivität eines weiteren Hämocyanins, diesmal vom Tintenfisch, durch Salvato et al. ^[224] und Nakahara et al. ^[225] berichtet. Die enzymatische Aktivität von Hämocyanin wurde jedoch nicht weiter untersucht und geriet in Vergessenheit, bis Zlateva et al. 1996 die Möglichkeit beschrieb, im Hämocyanin von *Carcinus maenas* und *Homarus americanus* durch SDS eine Diphenoloxidase-Aktivität zu induzieren ^[112]. Dies konnte 1997 von unserer Arbeitsgruppe für das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* bestätigt werden ^[226]. Seitdem wurden in zahlreichen weiteren respiratorischen Proteinen von Arthropoden, vor allem in Crustaceen, Catecholoxidase-Aktivität nachgewiesen (Tabelle 23).

3.4.1 Phenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin

In der Hämolymphe von Cheliceraten wie dem Skorpion *Pandinus imperator*, der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* scheinen sich keine Phenoloxidasen zu befinden ^[107, 108, 147]. Nellaiappan und Sugumaran ^[115] ordneten die enzymatische Aktivität der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* zwar 1996 einer Phenoloxidase mit circa 70 kDa zu, mittlerweile wird diese Aktivität den Hämocyanin-Untereinheiten zugewiesen ^[65, 86, 227].

Decker und Rimke ^[106] berichteten 1998 über die Möglichkeit, sowohl Mono- als auch Diphenoloxidase-Aktivität im Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* nachzuweisen. Weiter berichteten Decker et al. ^[65] 2001 von der Möglichkeit, im Hämocyanin von *E. californicum* und *L. polyphemus* eine Diphenoloxidase zu aktivieren.

Bei diesen Cheliceraten könnte die enzymatischen Funktionen der Phenoloxidase somit vom Hämocyanin übernommen werden, sofern sie auch eine Monophenolhydroxylase besitzen.

Um die Hämolymphe des erdgeschichtlich „jungen“ Cheliceraten *Pandinus imperator* auf eine eventuell darin enthaltene Phenoloxidase zu überprüfen, wurde die Hämolymphe auf einer S-300 Sephacryl Säule gereinigt und jede Fraktion aufgefangen. Diese Fraktionen wurden daraufhin mit einem Dot Blot auf eine mögliche Phenoloxidase-Aktivität untersucht (Abbildung 34).

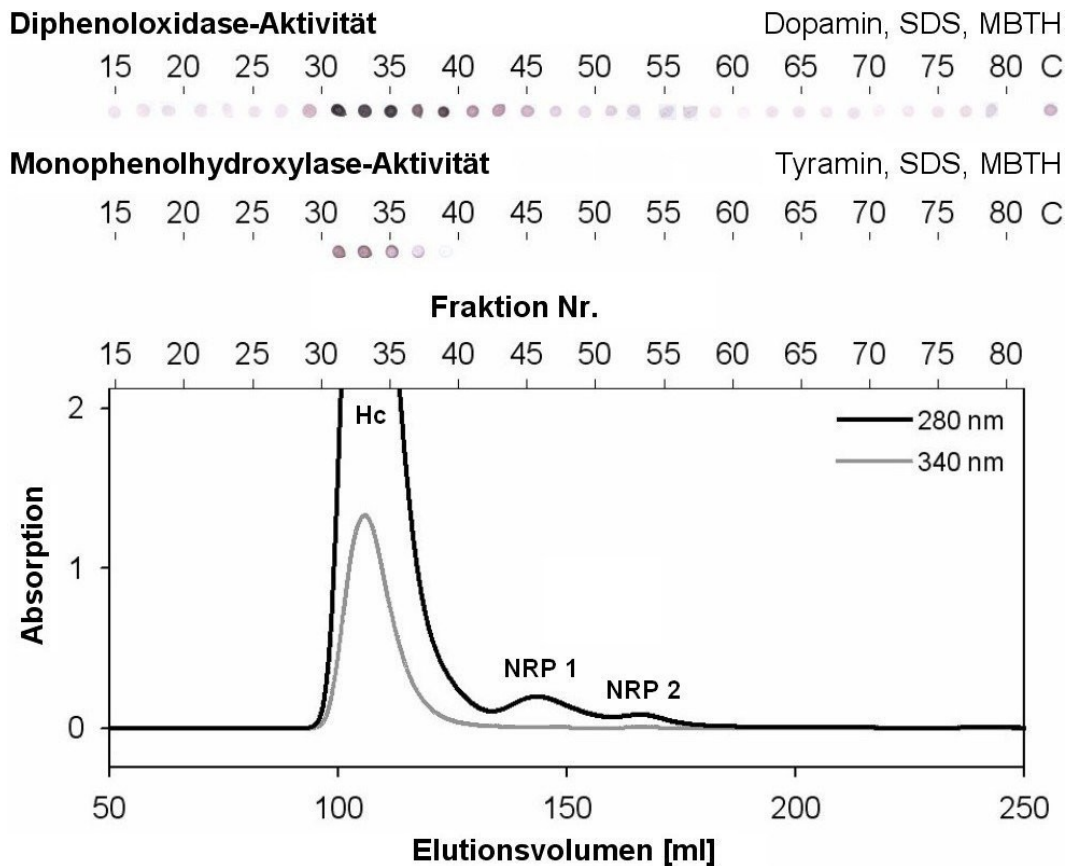


Abbildung 34: Elutionsprofil und Fraktionen der SEC-Reinigung von Hämolymphe von *Pandinus imperator*.

Die abzentrifugierte Hämolymphe wurde auf eine Sephacryl S-300 Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur mit *Pandinus*-Puffer und einer Flußrate von 0,13 cm/min eluiert. Der erste Peak im Elutionsprofil der SEC-Reinigung (Fraktionen 29 bis 40) wird durch das 24-mere Hämocyanin, die beiden weiteren Peaks (Fraktionen 40 bis 50 und 52 bis 57) durch das bisher nicht näher charakterisierte nichtrespiratorische Protein verursacht. In jeder zweiten Fraktion wurde die gereinigte Hämolymphe mittels Dot Blot auf Phenoloxidase-Aktivität untersucht: Die Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde mit dem Substrat Tyramin, die Diphenoloxidase-Aktivität mit Dopamin überprüft. Die Reaktionslösung bestand aus (Endkonzentrationen) 97 mM Tris (pH 7,8), 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 6 mM SDS, 0,22 mM MBTH und 1,6 mM Substrat. SDS dient zur Aktivierung des Hämocyanins, MBTH macht den Assay empfindlicher und verstärkt die Färbung. Die Kontrolle C stellt die Autooxidation der Färbelösung ohne Hämolympheproteine dar.

Im Dot Blot ist für das Substrat Dopamin bei den Fraktionen 29 bis 39 eine deutliche Anfärbung zu erkennen. Für die Färbung der 'Dots' ist der enzymatische Umsatz des Dopamins zu Dopachinon und dessen Verbindung mit MBTH zu einem stabilen violetten Farbkomplex verantwortlich. Die Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins ist sehr stark, selbst geringe Mengen des respiratorischen Proteins führen zu einer Färbung. Die schwache rosa Farbe der übrigen Punkte ist auf die Autooxidation (siehe 2.17) des diphenolischen Substrats zurückzuführen.

Das Monophenol Tyramin autooxidiert nicht, daher ist hier jede Anfärbung enzymatisch bedingt und keine Hintergrundfärbung vorhanden. Bei der Verwendung von Tyramin färben

sich nur die Fraktionen 31 bis 37 an. Wahrscheinlich entwickelt sich die Monophenolhydroxylase-Aktivität sehr langsam, so dass der Eindruck entsteht, dass nur wenige Fraktionen in Abbildung 34 diese Aktivität besitzen.

Die Spots mit Mono- beziehungsweise Diphenoloxidase-Aktivität können im Elutionsprofil eindeutig den Hämocyanin-haltigen Fraktionen zugeordnet werden: Nur die Fraktionen, die nicht nur Protein enthalten (Absorption bei 280 nm), sondern auch (für oxygeniertes Hämocyanin charakteristisch) bei 340 nm absorbieren, zeigen einen Substratumsatz. Dem nicht-respiratorischen Begleitprotein 1 und 2 fehlt eine enzymatische Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Es wurden keine anderen, möglicherweise inaktiven Phenoloxidasen gefunden, die mit SDS oder Trypsin zu aktivieren gewesen wären. Bei den Proben in der Aktivitätsfärbung handelt es sich nicht um Phenoloxidasen, sondern um Hämocyanin. Dies ist in Abbildung 35 anhand der nativen PAGE zu erkennen: Der erste Elutionspeak enthält nur Hämocyanin und keine weiteren Proteine. Das Hämocyanin wurde, wie aus Kapitel 3.1 zu ersehen, rein isoliert. Elutionsprofile von gereinigtem Hämocyanin zeigen nur eine Proteinspezies (Abbildung 11), desgleichen die Daten von Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie (Abbildung 12), dynamischer Lichtstreuung und Ultrazentrifugation (Abbildung 13).

Alle bisher beschriebenen Phenoloxidasen liegen maximal als Hexamer vor ^[75, 78-81], während die Hämocyanin-Fraktion nur eine Proteinspezies (zum Beispiel Abbildung 13) mit einem Molekulargewicht von 1,8 MDa in 24-merem Oligomerisierungszustand enthält. Auch anhand des Laufprofils der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 34) ist zu erkennen, dass das enzymatisch aktive Protein zum Zeitpunkt eines 24-meren Hämocyanins eluiert (als Referenz dient das ebenfalls 24-meres Hämocyanin von *E. californicum*). Eine Phenoloxidase,

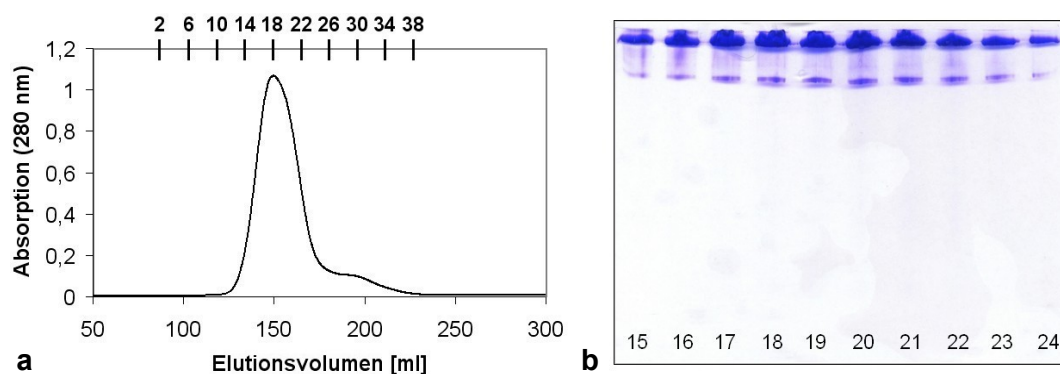


Abbildung 35: Elutionsprofil und native PAGE von Hämolymphe-Proteinen des Skorpions *Pandinus imperator*.

a Gelfiltration der Hämolymphe über eine S-300 Sepacryl Säule mit Pandinus-Puffer und einer Flussrate von 0,25 cm/min. Hier werden beide Begleitproteine in einem gemeinsamen Peak eluiert.

b Native PAGE (7,5 %, pH 7,5) mit den Elutionsfraktionen 15 bis 24. Außer Hämocyanin (natives 24-mer und 12-meres Gelartefakt) lassen sich keine weiteren Proteine nachweisen.

als Hexamer mit circa 450 kDa, würde durch seine geringere Größe zu einem deutlich späteren Zeitpunkt eluieren. Elutionsfraktionen nach dem Hämocyanin enthalten jedoch keine Aktivität mehr.

In der Regel werden Experimente zum Nachweis von Tyrosinasen in Phosphat-Puffer ^[111, 112, 115, 163-165 und andere] oder in Essigsäure- / Acetat-Puffer ^[207] durchgeführt. Die Catecholoxidase-Aktivität lässt sich in diesen Puffern auch tatsächlich sehr gut aktivieren und, aufgrund des zumeist neutralen oder leicht sauren pH-Wertes, mit weniger Autooxidation des diphenolischen Substrates nachweisen. In diesen standardgemäß verwendeten Puffer-Medien ist eine Cresolase-Aktivität bei *P. imperator*- oder *E. californicum*-Hämocyanin aber nicht möglich. Entscheidend beim Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin ist daher der verwendete Puffer. Durch die Auswahl des geeigneten Mediums ist es mir damit gelungen, zum ersten Mal eine reproduzierbare Monophenolhydroxylase-Aktivität im Hämocyanin von *Pandinus imperator* und, wie später (Kapitel 3.4.6) noch zu sehen sein wird, im Hämocyanin von *Eurypelma californicum* zu induzieren und zu charakterisieren.

Dieser Nachweis einer Monophenolhydroxylase-Aktivität stellt eine wichtige Erkenntnis für die Untersuchung des Immunsystems der Cheliceraten und Arthropoden dar. Das Fehlen einer 'echten' Phenoloxidase-Aktivität mit der Fähigkeit, sowohl mono- als auch diphenolische Substrate umzusetzen hat Zweifel an der Rolle des Hämocyanins bei der Immunabwehr aufkommen lassen. Die von mir nachgewiesene Fähigkeit zum Tyraminumsatz zeigt, dass das Cheliceraten-Hämocyanin sehr wohl monophenolische Substrate zu Melanin umsetzen kann, und das Immunsystem der Cheliceraten damit auf ähnliche Art funktionieren könnte wie das der Crustaceen und Insekten. Diese besitzen in ihrer Hämolymphe oder in den Hämocyten eine Prophenoloxidase, monomer mit einer Masse von 70 kDa bis 80 kDa, nach proteolytischer Aktivierung mit einer Masse von 60 kDa bis 70 kDa ^[79, 96, 99]. Weiterhin stützt diese Entdeckung die Hypothese von einem gemeinsamen Vorläuferprotein von Hämocyaninen und Phenoloxidasen ^[4, 6].

Die Ergebnisse zur Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin lassen sich durch Aktivitätsfärbungen im nativen Gel untermauern.

3.4.2 Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität in der nativen PAGE

Zur Untersuchung der Phenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin wurden zahlreiche native Gele angefertigt und dann die Phenoloxidasen in Anlehnung an Nellaipappan und Vinayakam ^[165] im Gel aktiviert und angefärbt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Färbelösung aus 10 ml Puffer, 5 ml Substrat

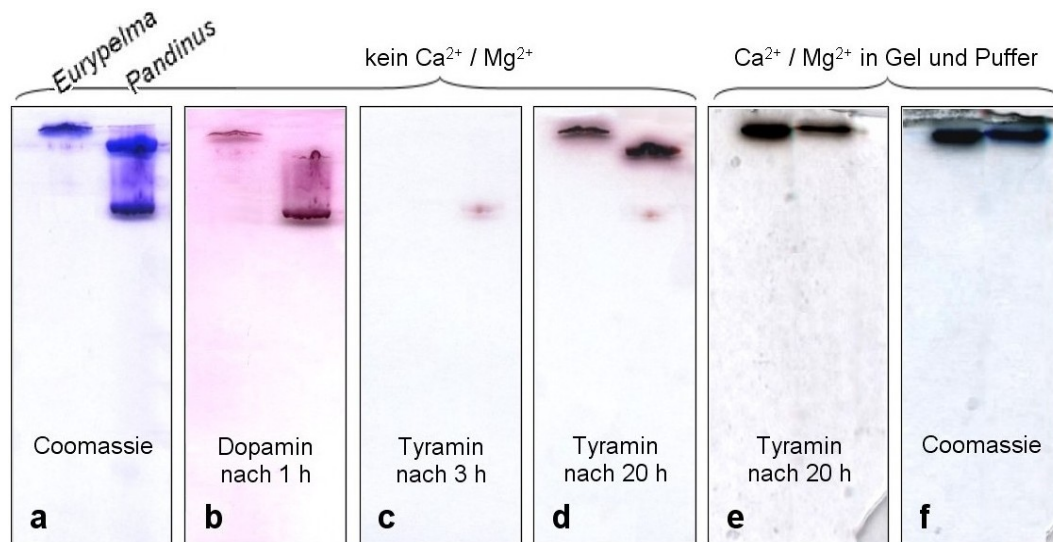


Abbildung 36: SDS-induzierte Phenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin.

Hämocyanin wurde mit nativer PAGE (7,5 %) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte in (a und f) Coomassie; (b) 0,1 M Tris-Puffer, (pH 7,8), mit je 5 mM CaCl_2 und MgCl_2 (Eurypelma-Puffer), 0,1 mM SDS, 0,1 mg/ml MBTH und 3 mM Dopamin nach 1 h; (c) 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit je 5 mM CaCl_2 und MgCl_2 , 0,1 mM SDS, 0,1 mg/ml MBTH und 3 mM Tyramin nach 3 h und (d) nach 20 h; (e) 0,66 M Tris-Puffer, pH 7,8, mit je 3 mM CaCl_2 und MgCl_2 , 0,1 mM SDS und 3 mM Tyramin nach 20 h.

Linke Spur: Hämocyanin von *E. californicum* nativ 40 μg (a-d) bzw. 20 μg (e-f); rechte Spur: Hämocyanin von *P. imperator* 30 μg (a-d) bzw. 19 μg (e-f).

In einem Gel mit pH-Wert von 7,5 und ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen in Laufpuffer und Gel (a-d) zerfällt das 24-mere Hämocyanin von *P. imperator* zum Teil in sein Halbmolekül. Der pH-Wert von 8,8 im Gel rechts (e und f) begünstigt die Dissoziation von Hämocyanin. Die Zugabe von je 10 mM CaCl_2 und MgCl_2 zu Gel und Laufpuffer kann den Zerfall des Proteins jedoch verhindern.

(10 mM), 0,5 ml MBTH (0,3 % in Ethanol) und 0,5 ml Aktivator inkubiert. Dabei kamen verschiedene Puffer und Aktivatoren zur Verwendung.

Die Ergebnisse zur Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin im Dot Blot lassen sich durch Aktivitätsfärbungen im nativen Gel bestätigen (Abbildung 36): Auch in der nativen PAGE färben sich bei einer Färbung mit Dopamin, SDS und MBTH nur solche Banden an, die später dem Hämocyanin zugeordnet werden können und damit die Dot Blot-Ergebnisse untermauern.

Das native Skorpion-Hämocyanin zerfällt in der nativen PAGE zum Teil in dodekamere Halbmoleküle (beschrieben in Kapitel 3.1.8) (Abbildung 36a). Bei Zugabe von Calcium-Ionen und Magnesium-Ionen zu Gel und Laufpuffer erhält man eine einzige 24-mere Bande, die etwas weniger schnell einläuft als in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} (Abbildung 36f). Dies könnte auf eine Abschwächung der negativen Ladung (die Kationen aus Gel und Puffer besetzen und neutralisieren diese Ladungen) oder eine Konformationsänderung des Moleküls zurückzuführen sein, die zu einer anderen Oberflächenladung führt.

In Abwesenheit von Calcium und Magnesium färben sich mit Dopamin beide Banden an (Abbildung 36b und Abbildung 37a); sowohl das 24-mere als auch das 12-mere Hämocyanin von *P. imperator* besitzen eine Diphenoloxidase-Aktivität. Dabei ist die Diphenoloxidase der 24-meren Bande, bei Vergleich der Protein-Konzentration anhand des Coomassie-gefärbten Gels, etwas schwächer als die der 12-meren Bande.

Bei der Färbung mit Tyramin entsteht zuerst eine lange Phase ohne sichtbare Aktivität. Nach drei Stunden beginnt sich die 12-mere Hämocyanin-Bande aufgrund der Monophenolhydroxylase einzufärben, später auch die 24-mere Bande (Abbildung 36c und d und Abbildung 39).

Die Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 zu Gel und Laufpuffer verhindert wie beschrieben den Zerfall des Proteins (Abbildung 36f). Das *P. imperator*-Hämocyanin behält dann seinen Oligomerisierungsgrad bei und setzt sowohl Dopamin (Diphenoloxidase-Aktivität, Gel nicht gezeigt) als auch Tyramin (Monophenolhydroxylase-Aktivität) (Abbildung 36e) als 24-mer um.

Der pH-Wert des Acrylamidgels (7,5 oder 8,8) hat keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität und die Färbung des Hämocyanins.

Untersuchungen zur Diphenoloxidase-Aktivität der Hämocyanin-Untereinheiten in der nativen PAGE anhand von Dissoziat zeigen nur sehr schwache Aktivität (Abbildung 37). Konzentrationen von *P. imperator*-Dissoziat, die bei einer Coomassie-Färbung gut angefärbt werden können, zeigen bei der Aktivitätsfärbung keine sichtbaren Banden. Erst bei Überladung des Gels mit circa 60 μg Dissoziat pro Spur und mehr können in der PAGE mittels Aktivitätsfärbung Proteinbanden erkannt werden, dann vor allem bei den Untereinheiten *f*, *e* und *a*. Zur enzymatischen Aktivität scheint also als kleinste Einheit nicht das Dodekamer, sondern bereits einzelne Untereinheiten ausreichend zu sein.

Auch das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* zeigt eindeutig sowohl Di- als auch Monophenolhydroxylase-Aktivität (Abbildung 36 und Abbildung 37). Wie beim Hämocyanin von *P. imperator* ist dabei der pH-Wert des Acrylamid-Gels unerheblich. Im Gegensatz zu dem Skorpion-Hämocyanin reagiert dieses Protein jedoch weniger empfindlich auf einen Kationen-Mangel und zerbricht bei der mechanischen Belastung im Gel nicht. Bei der Untersuchung des Dissoziats zeigt sich, dass auch hier wie bei dem Skorpion-Hämocyanin und anderen Hämocyaninen nicht alle Untereinheiten eine Diphenoloxidase-Aktivität besitzen. Bei *E. californicum* sind die beiden Monomere *b* und *c* enzymatisch aktiv, bei höherer Konzentration wird auch eine Aktivität der Untereinheit *f* sichtbar (Abbildung 37a). Beim Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* können die Untereinheiten II, V und VI als für die enzymatische Aktivität verantwortlichen Monomere ausgemacht werden ^[65]. Bei einer Erhöhung der Hämocyanin-Konzentration wird auch die schwache Aktivität der Untereinheit *f* des Spinnen-Hämocyanins sichtbar. In ihrer topologischen

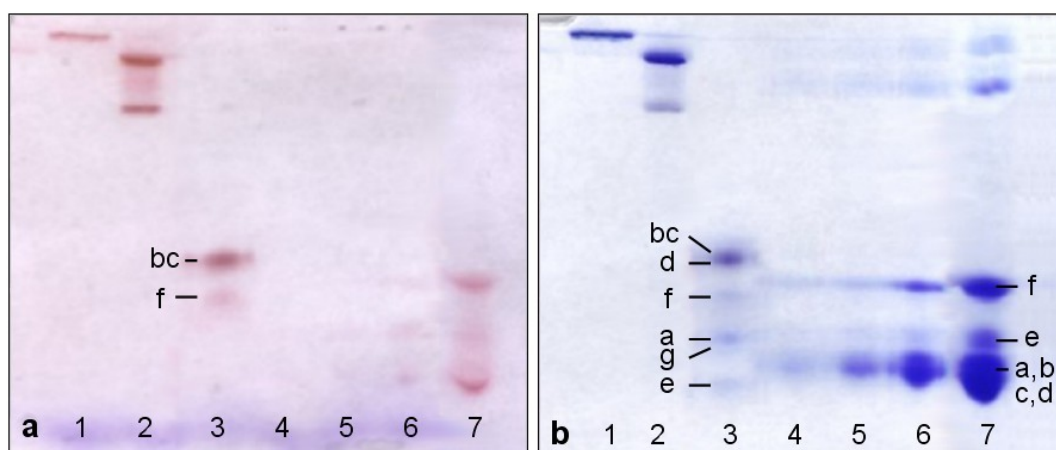


Abbildung 37: Native PAGE zum Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin.

Hämocyanin wurde mit nativer PAGE (7,5 %, pH 8,8) aufgetrennt. Beladung mit Hämocyanin von Spur 1: *E. californicum* nativ 20 µg, Spur 2: *P. imperator* nativ 20 µg, Spur 3: *E. californicum* dissoziiert 21 µg, Spur 4-7: *P. imperator* dissoziiert 19 µg, 32 µg, 63 µg, 120 µg. Die Färbung erfolgte in:

a 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,8, mit 0,1 mM SDS, 0,1 mg/ml MBTH und 3 mM Dopamin.

b Coomassie.

Lage entsprechen sich die Untereinheiten VI und *b* beziehungsweise V und *c*. Die Pfeilschwanzkrebs-Untereinheit II hat kein enzymatisch aktives Äquivalent im Spinnens-Hämocyanin. Bei den Untereinheiten V und VI (*L. polyphemus*) beziehungsweise den Untereinheiten *b* und *c* (*E. californicum*) handelt es sich um die sogenannten 'Linker'-Untereinheiten, die für eine stabile Verbindung zwischen den Hexameren sorgen. Ein verwandtschaftlicher Abgleich der enzymatisch aktiven *P. imperator*-Untereinheiten mit Antikörper gegen das katalytisch aktive *E. californicum*-Dimer *bc* oder mit Antikörper gegen die *L. polyphemus*-Monomere V, VI und eventuell II wäre wünschenswert.

Die Eigenschaften und enzymatische Aktivität dieses Vogelspinnen-Hämocyanins wurden bereits gut untersucht. Als verwandtes Hämocyanin aus der gemeinsamen Klasse der Spinnentiere (Arachnida) dient es deshalb bei vielen der kommenden Experimente als Vergleichsobjekt.

3.4.3 Aktivität der isolierten Untereinheiten

Aus dem Dissoziat von *P. imperator*-Hämocyanin können mehrere Untereinheiten identifiziert werden, die Diphenoloxidase-Aktivität besitzen (Abbildung 37). Allerdings muss dazu die Protein-Konzentration im Vergleich zu Monomeren von *E. californicum*-Hämocyanin oder zu nativem Hämocyanin deutlich erhöht werden.

Mit einer anderen Strategie sollte erneut nachgewiesen werden, welche Untereinheitentypen im Hämocyanin von *P. imperator* für die Phenoloxidase-Aktivität verantwortlich sind.

Dazu wurde ein Dot Blot mit jeder zweiten Fraktion einer Untereinheiten-Elution (ähnlich wie Abbildung 34 mit einer DEAE-Ionenaustauschchromatographie nach Elutionsversion 9) durchgeführt. Leider war dabei die Hämocyanin-Konzentration in den Fraktionen zu gering, um überhaupt eine deutlich sichtbare Diphenoloxidase-Aktivität zu zeigen. Fraktionen, die einem bestimmten Peak im Elutionsdiagramm der Untereinheitentrennung zugeordnet werden, unterschieden sich in ihrer Färbung nicht signifikant von anderen Peaks oder Fraktionen, die nur den 'Hintergrund' zwischen den Untereinheiten darstellen.

Um die eingesetzte Hämocyanin-Menge zu erhöhen, wurde der gleiche Versuch daher nochmals mit den gepoolten und aufkonzentrierten Fraktionen durchgeführt (Abbildung 38).

Monophenolhydroxylase-Aktivität kann für keine der isolierten Untereinheiten nachgewiesen werden. Diphenoloxidase-Aktivität ist nur in den Peaks J, F und etwas schwächer in Peak G zu sehen. Fraktion J enthält vermutlich die Untereinheiten-Typen e und f, Fraktion F die

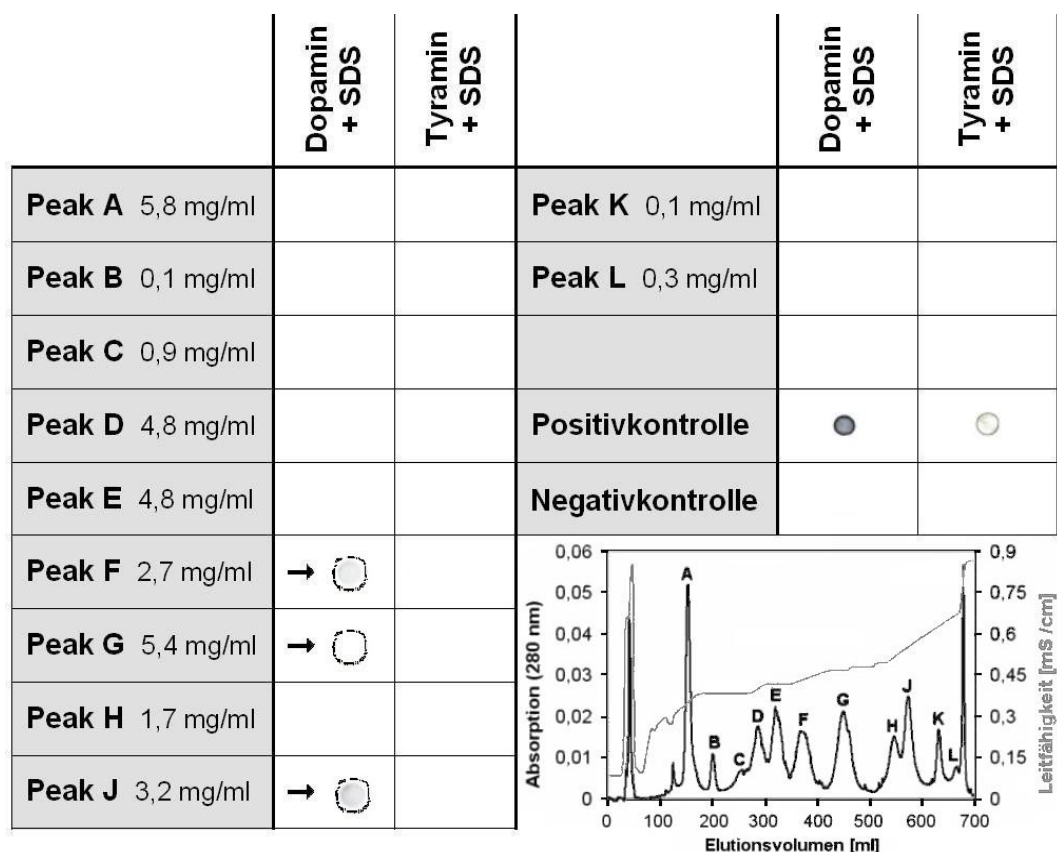


Abbildung 38: Dot Blot mit konzentrierten Untereinheitenfraktionen von *Pandinus imperator*.

Die gepoolten Peaks A-L (Hämocyanin-Konzentration 0,1 mg/ml bis 5,8 mg/ml) der Untereinheiten-Trennungen wurden im gleichen Verhältnis mit Reaktionslösung aus 3,3 mM Substrat und 12 mM SDS als Aktivator in 93 mM Tris-Puffer (pH 7,8) vermischt.

Insert: Elutionsprofil der Untereinheiten-Reinigung von *P. imperator*-Hämocyanin nach Version 9. DEAE-Säule mit dissoziiertem Hämocyanin. Die Absorption wurde bei 280 nm (—) aufgenommen und der KCl-Gradient (—) anhand der Leitfähigkeit verfolgt. Die Buchstaben über den Absorptionsmaxima dienen zur Kennzeichnung der Protein-Peaks. Weitere Informationen in Kapitel 3.2.

Untereinheit *e* und eventuell ebenfalls *f*, Fraktion G die Untereinheiten-Typen *e* und mindestens einen Monomer-Typen aus dem Gemisch *a*, *b*, *c* und *d*. Nach diesen Daten sind wenigstens die Untereinheiten *e* und *f* enzymatisch aktiv.

3.4.4 Geschwindigkeit der Farbentwicklung

Die Catecholoxidase- und die Cresolase-Aktivität von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin können in der nativen PAGE, sowohl bei nativen 24-mer als auch beim dodekameren Halbmolekül zweifelsfrei nachgewiesen werden. Bei Aktivitätsfärbung mit dem Diphenol Dopamin entstehen die Banden innerhalb von 15 min bis 30 min, beim Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität benötigt das Hämocyanin einen Zeitraum von Stunden, um das Substrat Tyramin umzusetzen. Interessant ist dabei, dass sich bei *P. imperator*-Hämocyanin zuerst die dodekamere Bande einfärbt. Dies geschieht nach circa 1½ h, während die Bande mit dem 24-meren Hämocyanin sich erst nach etwa drei Stunden ausbildet, dafür aber stärker gefärbt ist (Abbildung 36c und d und Abbildung 39).

Obwohl es sich beim Auseinanderbrechen des Hämocyanins um ein Laborartefakt handelt, wäre es sicherlich interessant gewesen, diesen Umstand weiter zu untersuchen. Isolierte Hämocyanin-Halbmoleküle (Dodekamere) bieten die Möglichkeit für weitere Versuchsansätze, die zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus beitragen. Allerdings lassen sich keine stabilen Halbmoleküle außerhalb der Gelmatrix herstellen; die 12-mere reassoziieren sofort wieder zu ihrer nativen 24-meren Struktur.

3.4.5 Weitere Nachweismethoden für die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin

3.4.5.1 Spektroskopie

Eine weitere Methode, mit der die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyaninen nachgewiesen werden kann, ist die Spektroskopie. Mittels Absorptionsspektroskopie wird die Bildung von Melanin beziehungsweise seiner Zwischenprodukte photometrisch verfolgt.

Zum Nachweis von Phenoloxidasen sind der Dopachrom- und der MBTH-Assay gängige Methoden (Kapitel 2.17) ^[163-165]. Dabei wird die Bildung des rötlichen Dopachroms bei 475 nm oder die Michael-Addition von MBTH und Dopachinon bei 505 nm verfolgt.

Sowohl die Diphenoloxidase- als auch die Monophenolhydroxylase-Aktivität des Skorpion-Hämocyanins konnten durch iterative Spektren klar belegt werden (Abbildung 40).

Der Diphenolumsatz beginnt sofort nach Mischung der Substrate und zeigt eine für die Dopachrombildung charakteristische Absorptionszunahme bei 475 nm. Für diese Absorptionszunahme ist der Substratumsatz verantwortlich, sie beruht nicht auf Streuung. Bei Streu-

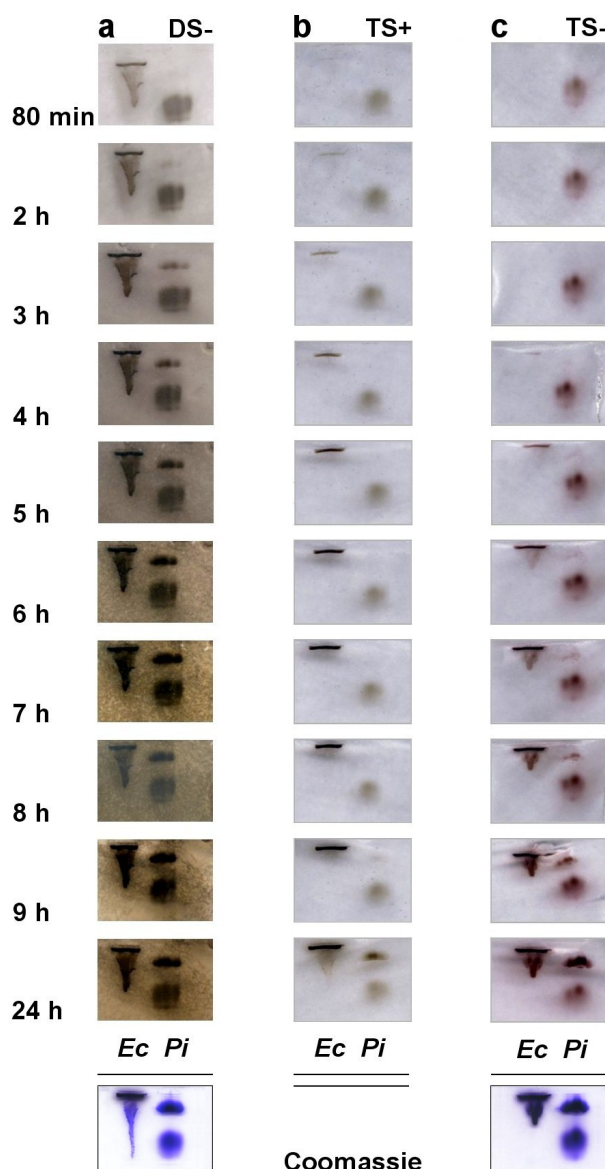


Abbildung 39: Entwicklung der Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität nach Gelelektrophorese.

Hämocyanin wurde mit nativer PAGE (7,5 %, pH 7,5) aufgetrennt. Beladung mit Hämocyanin von: linke Spur: *E. californicum* nativ 26 µg; rechte Spur: *P. imperator* nativ 20 µg. Die Gele wurden über Nacht (16 h) mit geringer und konstanter Stromstärke von 2 mA laufen gelassen, dadurch werden die Proteinbanden unscharf. Die Gele wurden in Färbelösung inkubiert und das Ergebnis der Aktivitätsfärbung dokumentiert. Die Färbung erfolgte in Eurypelma-Puffer und SDS mit

a Dopamin für die Diphenoloxidase-Aktivität (DS-).

b Tyramin für die Monophenolhydroxylase-Aktivität (TS-).

c Tyramin mit MBTH für die verstärkte Monophenolhydroxylase-Aktivität (TS+).

phänomenen nimmt die optische Dichte über alle Wellenlängenbereiche und umso stärker zu, je kürzer die Wellenlänge ist (die Streuintensität nimmt mit der vierten Potenz der Wellenlänge ab). Wie in Abbildung 40a zu sehen ist, steigt die Absorption jedoch nur in einem bestimmten Wellenlängenbereich, der für die Absorption von Dopachrom kennzeichnend ist.

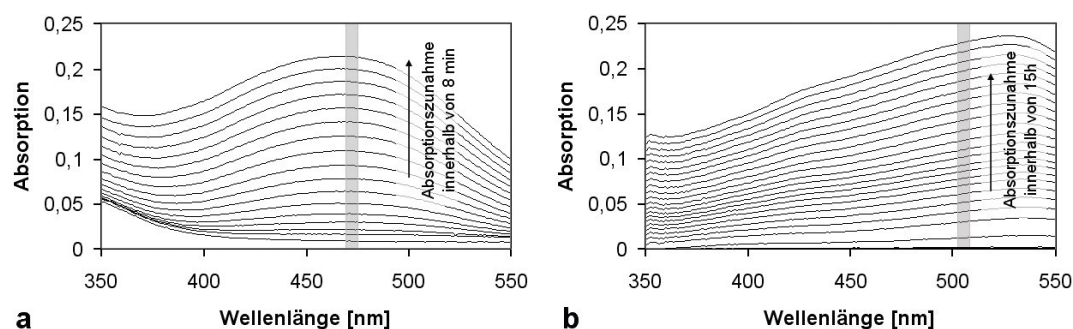


Abbildung 40: Spektroskopischer Nachweis der Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin.

a Dopachrom-Assay zum Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität: Umsatz von 1 mM Dopamin in 0,1 M Tris-Puffer, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml Hämocyanin. Die Autooxidation von Dopamin wurde abgezogen. Absorptionsbande bei 350 nm durch das oxygenierte Kupferzentrum; Absorptionszunahme um 350 nm durch Chinonmethid.

b MBTH-Assay am Beispiel der Monophenolhydroxylase-Aktivität: Umsatz von 3,3 mM Tyramin in Eurypelma-Puffer mit 1,3 mM SDS, 0,05 mM MBTH und 0,5 mg/ml Hämocyanin (Messung bei Raumtemperatur).

Für kinetische Versuche wird beim Dopachrom-Assay die Absorption bei der Wellenlänge 475 nm (grau unterlegt) beobachtet, beim MBTH-Assay die Wellenlänge 505 nm (ebenfalls grau unterlegt). Absorptionszunahme um 350 nm durch Chinonmethid.

Auch bei Versuchen mit Monophenol steigt trotz der langen Inkubationsdauer die Absorption nur in einem bestimmten Wellenlängenbereich, der für den MBTH-Assay charakteristisch ist. Bei meinen Versuchen liegen die Absorptionsmaxima nicht genau bei den in der Literatur angegebenen Wellenlängen 475 nm (Dopachrom-Assay) beziehungsweise 505 nm (MBTH-Assay), sondern sind leicht verschoben. Dies fällt vor allem beim MBTH-Assay, bei dem das Maximum bei meinen Versuchen bei circa 520 nm liegt, auf. Daher wurde die Tyrosinase-Aktivität auch von einer echten Tyrosinase (Mushroom) mit und ohne MBTH mit den Substraten Tyramin, Tyrosin, Dopamin und L-Dopa zum Vergleich aufgenommen (Spektren nicht gezeigt, Daten in Tabelle 24). Diese iterativen Spektren besitzen jeweils zwei Absorptionsmaxima, die in ihrer Lage um bis zu 30 nm schwanken. Ohne MBTH liegen die Maxima bei etwa 303 nm und 474 nm, mit MBTH bei circa 339 nm und bei circa 490 nm. Diese Maxima werden verursacht durch Chinone (305 nm), Chinonmethide (350 nm), Kopplungsprodukte wie Di-Catechole (420 nm) und natürlich Dopachrom (475 nm) und Chinonamine (500 nm) [163-165, 168, 170].

Die Wellenlängenwerte der Absorptionsmaxima, sowohl bei der Mushroom-Tyrosinase, bei der mit Sicherheit Monophenole und Diphenole zu Melanin werden, als auch beim Hämocyanin, sind beide nicht deckungsgleich mit den Literaturwerten, sondern leicht verschoben.

Substrat	Absorptionsmaxima der Mushroom-Tyrosinase		
	ohne MBTH		mit MBTH
Tyrosin	300 nm	465 nm → 480 nm	495 nm → 460 nm
Tyramin	300 nm	475 nm / 480 nm	470 nm → 490 nm
Dopamin	300 nm	470 nm → 452 nm	465 nm → 454 nm
L-Dopa	300 nm	485 nm → 450 nm	482 nm → 513 nm

Substrat	Absorptionsmaxima von <i>P. imperator</i> -Hämocyanin		
	ohne MBTH		mit MBTH
Dopamin	300 nm	459 nm → 475 nm	505 nm / 508 nm
L-Dopa	300 nm	475 nm	492 nm / 513 nm

Tabelle 24: Absorptionsmaxima von Mushroom-Tyrosinase und *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

Die Phenoloxidase-Aktivität der Mushroom-Tyrosinase in einer Endkonzentration von 206 Units/ml und *P. imperator*-Hämocyanin (0,2 mg/ml) wurde in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit verschiedenen Substraten bei 25°C spektroskopisch verfolgt; dazu wurde der Dopachrom-Assay (Kapitel 2.17.1, ohne MBTH) und der MBTH-Assay (2.17.2) eingesetzt. Die Datenaufnahme erfolgte von 250 nm bis 700 nm über einen Zeitraum von 15 min.

Die Substrate Tyramin, Tyrosin, Dopamin und L-Dopa haben ein Absorptionsmaximum zwischen 272 nm und 278 nm. MBTH (Endkonzentration 6 mM) absorbiert stark ab 320 nm und überdeckt eventuell vorhandene weitere Absorptionsbanden im kurzwelligen Bereich. Im Gegensatz zum Dopachrom-Assay ist daher nur ein Maximum zu sehen.

Der Absorptionspeak um 300 nm wird durch Chinone verursacht^[168, 169]. Der Dopachrom-Assay hat laut Literatur sein Absorptionsmaximum bei 475 nm, der MBTH-Assay bei 505 nm^[163-165]. Bei meinen Untersuchungen sind die Maximalwerte leicht verschoben. Sie beginnen bei einer Wellenlänge und verschieben sich dann zu einer anderen Wellenlänge (gekennzeichnet durch →). Zur Vergleichbarkeit der Daten wurden bei Kinetiken weiterhin die Wellenlängen aus der Literatur benutzt.

In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Farbqualität der Phenoloxidase-Aktivität unter anderem vom gewählten Puffer abhängt (Kapitel 3.8.1.2). Nellaiappan et al.^[165] führten ihre Versuche zur Aktivierung der Phenoloxidase in Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 durch, Winder et al.^[163, 164] ihre Versuche in 50 mM Phosphat-Puffer, 2 % DMF, optional mit 0,05 % Triton X-100, bei einem pH-Wert von 6,9. Die Unterschiede in der Farbqualität und Abweichung von den Literaturwerten können also sicherlich durch den abgewandelten Versuchsansatz, die verschiedenen Substrate und eventuelle Weiterreaktion mit dem Hämocyanin begründet werden.

Zur Vereinfachung und Vergleichbarkeit der Daten untereinander wurde in weiteren Versuchen, vor allem bei Kinetiken, die Absorption bei den Wellenlängen aus der Literatur, bei 475 nm und 505 nm beobachtet.

3.4.5.2 Dynamische Lichtstreuung

Anhand der iterativen Spektren in Abbildung 40 kann bereits festgestellt werden, dass es sich bei der Absorptionzunahme der Ansätze aus Hämocyanin, Aktivator SDS und Substrat (Tyramin oder Dopamin) nicht um Streuung, sondern um enzymatische Aktivität handelt. In photometrischen Versuchen kann Bakterienwachstum beim Verzicht auf iterative Spektren eine Färbung vortäuschen: Durch das Bakterienwachstum nimmt die Absorption durch ansteigende Streuung zu. Eventuell könnte die enzymatische Aktivität auch durch Verunreinigung der Küvette oder durch Bakterien verursacht werden, insbesondere, da die Versuche zur Monophenolhydroxylase-Aktivität bei 25°C inkubiert werden und sich über einen Zeitraum von bis zu sechzehn Stunden erstrecken. Mittels dynamischer Lichtstreuung konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sich in den Reaktionsansätzen keine Bakterien befanden.

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird Größenverteilung von Teilchen in Lösung untersucht. Der ermittelte hydrodynamische Radius hängt von Größe und Form der Moleküle ab. Teilchengrößen können von Nanometern bis Mikrometern bestimmt werden.

Untersuchungen mit der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 41) zeigen bei Proben, die über Nacht bei 25°C inkubiert wurden, nur eine Partikelpopulation. Mit einer Größe von circa 20 nm entspricht diese den Dimensionen von 24-merem Hämocyanin. Bei den beschriebenen Experimenten ist ein Bakterienwachstum in der Küvette und so auch Streuung an Partikeln also auszuschließen.

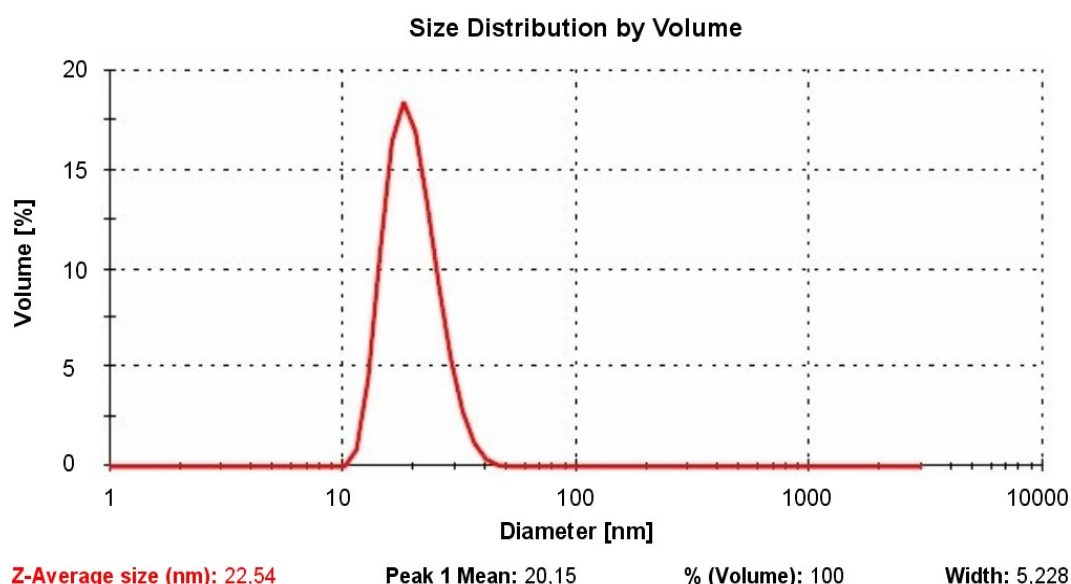


Abbildung 41: Partikelgröße im Ansatz zur Phenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin.

Ein Färbeansatz (vergleiche Abbildung 42) wurde über Nacht bei einer Temperatur von 25°C inkubiert. Danach wurde eine Größenmessung bei 25°C mit zehn Messdurchgängen von je 10 s Dauer durchgeführt. Wie erwartet stellt Hämocyanin die einzige Partikel-Population mit einer Größe von circa 20 nm. Bakterien (Partikelgröße von ≥ 1000 nm) konnten nicht nachgewiesen werden.

3.4.5.3 Visuelle Beurteilung

Als offensichtlicher Nachweis für die Bildung von Melanin kann die deutliche Anfärbung der Probe gesehen werden, die selbst mit dem bloßen Auge wahrgenommen werden kann (Abbildung 42).

Skorpion-Hämocyanin in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), das mit 2 mM SDS aktiviert wurde, entwickelt über Nacht eine ausreichend starke Braunfärbung, die einen Nachweis durch optische Geräte überflüssig macht. In Gegenwart von 30 mM Mg^{2+} ist die Färbung für das menschliche Auge zu schwach ausgeprägt, mittels Photometrie aber gut nachzuweisen.



Abbildung 42: Optischer Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin.

Hämocyanin von *P. imperator* (0,2 mg/ml) nach über Nacht-Inkubation in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit 2 mM SDS und 1 mM Tyramin. Ohne Mg^{2+} (links) ist eine deutliche Braunfärbung zu sehen, mit 30 mM Mg^{2+} (rechts) ist die Färbung sehr schwach.

3.4.6 Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität bei anderen Hämocyaninen

Das Hämocyanin von *Pandinus imperator* ist nicht das einzige respiratorische Protein, das enzymatische Aktivität aufweist. So wurde bereits vor knapp 70 Jahren bei Hämocyanin von *Cancer pagurus* und *Helix pomatia* Phenoloxidase-Aktivität festgestellt ^[219]. Bei zahlreichen Crustaceen-Hämocyaninen konnte wenigstens eine Diphenoloxidase-Aktivität festgestellt werden ^[114, 217].

Cheliceraten-Hämocyanine sind nicht im gleichen Umfang auf Phenoloxidase-Aktivität untersucht wie die der Crustaceen. Daher wurde zur schnellen Überprüfung der Phenoloxidase-Aktivität bei verschiedenen Hämocyaninen ein Dot Blot durchgeführt (Abbildung 43). Überprüft wurden außer dem Hämocyanin von *Pandinus imperator* die respiratorischen Proteine zwei weiterer Cheliceraten, *Eurypelma californicum* und *Limulus polyphemus*, sowie Hämocyanin von *Penaeus sp.*, *Carcinus sp.* und *Astacus astacus*. Die eingesetzten Hämocyanin-Proben wurden hinsichtlich ihrer Konzentration nicht normiert, da es nicht um einen quantitativen Vergleich der Aktivität ging, sondern lediglich darum, die enzymatischen Fähigkeiten überhaupt nachzuweisen.

Die Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *P. imperator* ist deutlich zu erkennen (Abbildung 43). Bei allen anderen Hämocyaninen ist ebenfalls eine Catecholoxidase-Aktivität vorhanden, die zu einer eindeutigen Anfärbung führt. Der Dopaminsatz des Hämocyanins von *Carcinus* ist allerdings sehr schwach. Mit verantwortlich ist dafür wahrscheinlich die im Vergleich zu den anderen eingesetzten Hämocyaninen relativ geringe Konzentration. Auch im Allgemeinen ist die Catecholoxidase-Aktivität bei Crustaceen eher schwach ausgeprägt^[114]. Bei *Astacus*-Hämocyanin ist die Farbe des 'Dots' markanter, trotz der ebenfalls niedrigen Konzentration. Hier spiegelt sich vermutlich die für jede Hämocyanin-Spezies charakteristische Aktivität wieder. Die Färbung beziehungsweise der Farbton bei den verschiedenen Hämocyaninen ist überraschenderweise nicht einheitlich: Der Ansatz mit Dopamin und dem respiratorischen Protein von *L. polyphemus* verfärbt sich trotz MBTH im Ansatz braun. Die Hämocyanine von *Carcinus* und *Astacus* dagegen führen zur Ausbildung eines rosa-violetten 'Dot'. Nach der Isolierung der Hämocyanine mittels SEC befinden keine weiteren Proteine mehr in der Probe (Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3), die die Farbqualität der Ansätze beeinflussen könnten. Der Farbton der einzelnen Proben wird daher wahrscheinlich durch Wechselwirkung oder Weiterreaktion mit dem Hämocyanin beeinflusst.

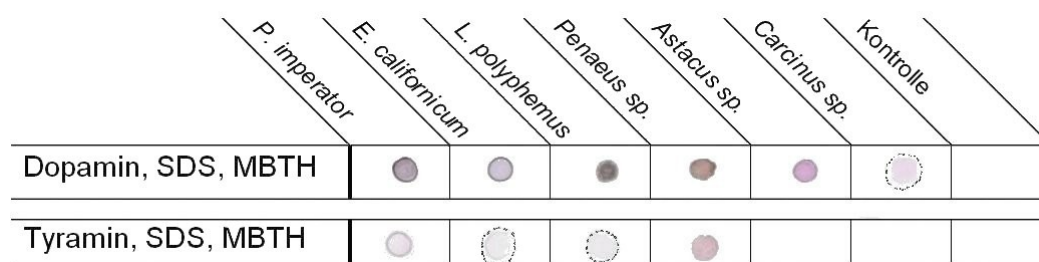


Abbildung 43: Dot Blot zur Untersuchung der Phenoloxidase-Aktivität in verschiedenen Hämocyaninen mit SDS.

Je 2 µl Reaktionslösung wurden mit je 2 ml Hämocyanin von *Pandinus imperator* (46 mg/ml), *Eurypelma californicum* (33 mg/ml), *Limulus polyphemus* (11 mg/ml), *Penaeus sp.* (13 mg/ml), *Astacus astacus* (5 mg/ml) und *Carcinus sp.* (12mer, 6 mg/ml) versetzt. Die Reaktionslösung enthält 0,1 M Tris, 1,6 mM Substrat (Tyramin für die Monophenolhydroxylase-, Dopamin für die Diphenoloxidase-Aktivität) in Puffer, 6 mM SDS und 0,22 mM MBTH. Negativkontrolle ohne Hämocyanin. 'Dots' mit sehr schwacher Färbung wurden markiert.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität betreffend ist ein schwach sichtbarer Tyraminumsatz bei den Hämocyaninen von *P. imperator* und *E. californicum*, scheinbar auch bei *Penaeus sp.* und *L. polyphemus* vorhanden. Mit photometrischen Methoden kann hier allerdings keine Cresolase-Aktivität bei dem respiratorischen Pigment von *L. polyphemus* nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist, dass bis auf das Hämocyanin von *Penaeus* alle Proben der Crustaceen keine Cresolase-Aktivität zeigen. Bei dieser Probe der Garnele handelt es sich jedoch höchstwahrscheinlich nicht um ein enzymatisch aktives Hämocyanin, sondern um geringe Mengen einer Tyrosinase, die das Hämocyanin noch immer verunreinigt. In nativer Form

liegt *Penaeus*-Hämocyanin in der Hämolymphe als 12-mer und 6-mer vor. Nach Reinigung ausschließlich mittels einer Größenausschlusschromatographie kann nicht zwischen hexamerem Hämocyanin und hexamerer Phenoloxidase unterschieden werden. Dementsprechend kritisch sollte auch die Catecholoxidase-Aktivität von *Penaeus sp.*-Hämocyanin betrachtet werden, die natürlich ebenfalls durch eine Tyrosinase hervorgerufen werden könnte. Die Fähigkeit zum Diphenolumsatz kann bei Crustaceen-Hämocyanin allerdings als allgemeine Eigenschaft betrachtet werden [75, 113, 217]. Es ist daher anzunehmen, dass sie bei dem Hämocyanin von *Penaeus sp.* auch vorhanden ist.

Diese Ergebnisse aus dem Dot Blot lassen sich mit Aktivitätsfärbung in der nativen PAGE wiederholen und bestätigen. In Abbildung 36 ist diese beispielhaft für das Atmungsprotein

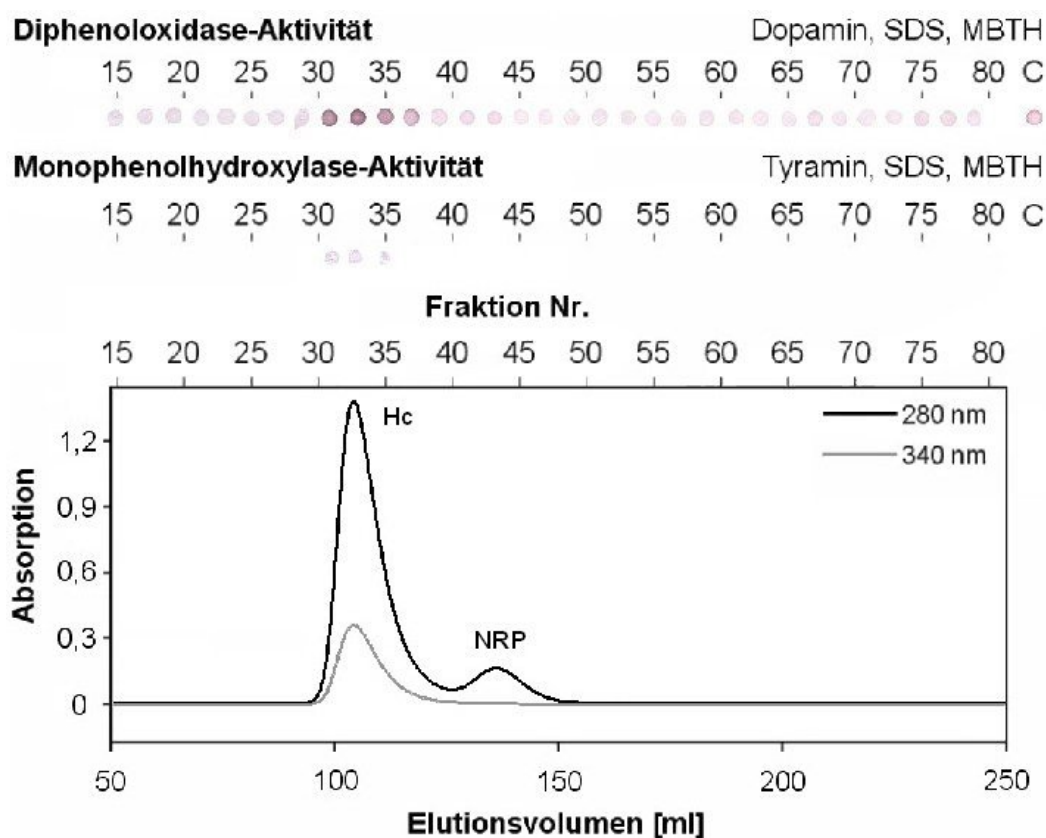


Abbildung 44: Elutionsprofil und Fraktionen der SEC-Reinigung von Hämolymphe aus *Eurypelma californicum*.

Die abzentrifugierte Hämolymphe wurde auf eine Sephacryl S-300 Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur mit Eurypelma-Puffer und einer Flußrate von 0,13 cm/min eluiert.

Der erste Peak im Elutionsprofil der SEC-Reinigung (Fraktionen 29 bis 40) wird durch das 24-mere Hämocyanin, der zweite Peak (Fraktionen 40 bis 53) durch das bisher nicht näher charakterisierte nichtrespiratorische Protein verursacht.

In jeder zweiten Fraktion wurde die gereinigte Hämolymphe mittels Dot Blot auf Phenoloxidase-Aktivität untersucht: Die Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde mit dem Substrat Tyramin, die Diphenoloxidase-Aktivität mit Dopamin überprüft; alle Lösungen wurden in Eurypelma-Puffer angesetzt. Die Kontrolle C stellt die Autooxidation der Färbelösung ohne Hämolympheproteine dar.

der Vogelspinne zu sehen. Auch hier ist im Elutionsprofil eine enzymatische Aktivität nur in solchen Fraktionen vorhanden, die das respiratorische Pigment enthalten (Abbildung 44). Eine Co-Elution einer bisher unentdeckten Phenoloxidase zusammen mit Hämocyanin ist unwahrscheinlich: Die bisher beschriebenen Phenoloxidasen liegen maximal als Hexamer vor^[75, 78-81], während die Hämocyanin-Fraktion nur eine Proteinpopulation mit einem Molekulargewicht von 1,8 MDa in 24-merem Oligomerisierungszustand enthält.

3.4.7 Substrate für den Nachweis der Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin

Enzyme wirken substratspezifisch, das heißt sie sind nur auf ein Substrat oder eine Substratgruppe spezialisiert, katalysieren aber nicht die Reaktion eines substratähnlichen Moleküls. Durch die Bindung und korrekte Koordination am aktiven Zentrum wird das richtige Substrat erkannt.

Neben verschiedenen Hämocyanin-Spezies und unterschiedlichen Testmethoden wurden beim Nachweis der Catecholoxidase- und vor allem der Cresolase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin diverse Substrate untersucht. In der Regel wurden im Rahmen dieser Arbeit die sehr gut wasserlöslichen Substrate Dopamin und Tyramin benutzt. Weiterhin kamen aber auch L-Dopa, Tyramin, Tyrosin, 4-*tert*-Butylphenol, 2,4-*di-tert*-Butylphenol und Methylphenol (*p*-Cresol) zum Einsatz (Abbildung 45).

Vorteile der Substrate Methylphenol und Butylphenol sind, dass sie aufgrund ihrer Seiten-

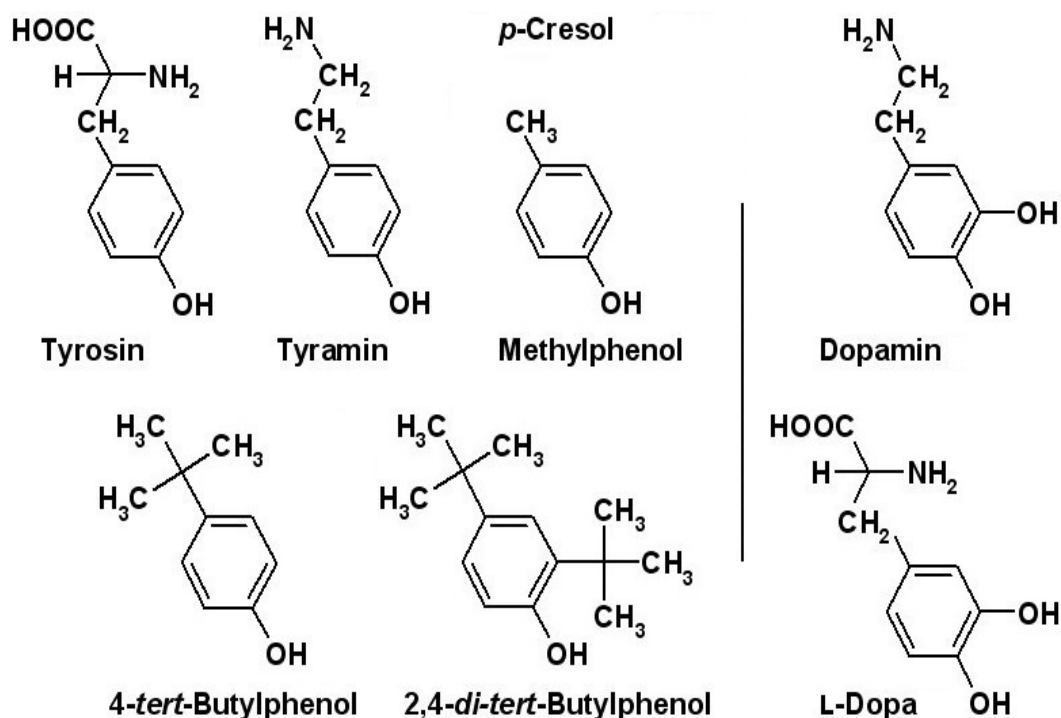


Abbildung 45: Verschiedene Substrate für die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin.

kette nicht zu Dopachrom zyklisieren können, so dass dieses nicht weiter zu Melanin reagieren kann. Die Hintergrundabsorption bleibt damit gering.

Bei diesen Untersuchungen ist zu bemerken, dass die verwendeten Substrate zwei verschiedenen Substratgruppen zugeordnet werden müssen: Dopamin und L-Dopa gehören zu den Diphenolen, während Tyramin, Tyrosin, 4-*tert*-Butylphenol, 2,4-*di-tert*-Butylphenol und Methylphenol monophenolische Substrate sind.

Bei den Untersuchungen des 'Enzyms' Hämocyanin zur Spezifität wurde lediglich die Fähigkeit untersucht, verschiedene Substrate umzusetzen. Da aus diesem Grund nur die Aktivität mit einer Substratkonzentration betrachtet wurde, ist eine Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration und eine Auswertung nach dem Michaelis-Menten-Formalismus nicht möglich. Die Substrathalbsättigungs-Konzentrationen (K_M) für die einzelnen Substrate wurden nicht bestimmt. Eine Aussage über die Substrataffinität und Umsatzgeschwindigkeit kann daher nur anhand des Kurvenverlaufs gemacht werden.

Wie in Kapitel 3.6.2 noch zu sehen ist, ergeben sich bei der Aktivierung des Hämocyanins Abhängigkeiten der enzymatischen Aktivität von der SDS-Konzentration. Diese komplexen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Aktivator erschwert zudem die Ermittlung von enzymkinetisch relevanten Daten.

3.4.7.1 Substratspezifität der Phenoloxidase von *P. imperator*-Hämocyanin

Die beiden Diphenole Dopamin und L-Dopa werden von *P. imperator*-Hämocyanin gut umgesetzt (Abbildung 46a und b). Da bei dieser Versuchsreihe immer die gleiche Hämocyanin-Isolierung verwendet wurden, kann die enzymatische Aktivität mit den verschiedenen Substraten direkt miteinander verglichen werden: Dopamin wird circa zehnmal so gut umgesetzt wie L-Dopa.

Bei den monophenolischen Substraten führen Tyramin und 4-Methylphenol (*p*-Cresol) zu einer deutlichen Abfärbung des Versuchsansatzes und Absorptionszunahme (Abbildung 46c und d). Bevor der Umsatz beginnt, ist bei beiden Substraten die "Verzögerungsphase" zu sehen; sie ist offensichtlich nicht substratabhängig. Tyramin ist hinsichtlich der Stärke der Aktivität ein besseres Substrat als Methylphenol, es wird fast doppelt so gut umgesetzt (Abbildung 47b). Da dieses zudem leicht giftig ist, wurde für weitere Versuche auf Tyramin zurückgegriffen.

Tyrosin (Daten nicht gezeigt) und 4-*tert*-Butylphenol (Abbildung 46f) dagegen können durch *P. imperator*-Hämocyanin nicht umgesetzt werden. Sowohl bei 4-*tert*-Butylphenol als auch bei 2,4-*di-tert*-Butylphenol (Abbildung 46e und f) fällt auf den ersten Blick die Abnahme der Absorption um 340 nm auf. Die Absorption an der Stelle des aktiven Zentrums fällt deswegen deswegen unter Null, da es im Lauf der Reaktion zu einer Deoxygenierung kommt (; das erste Spektrum aller iterativen Spektren wurde als Leerwert von allen weiteren Spektren

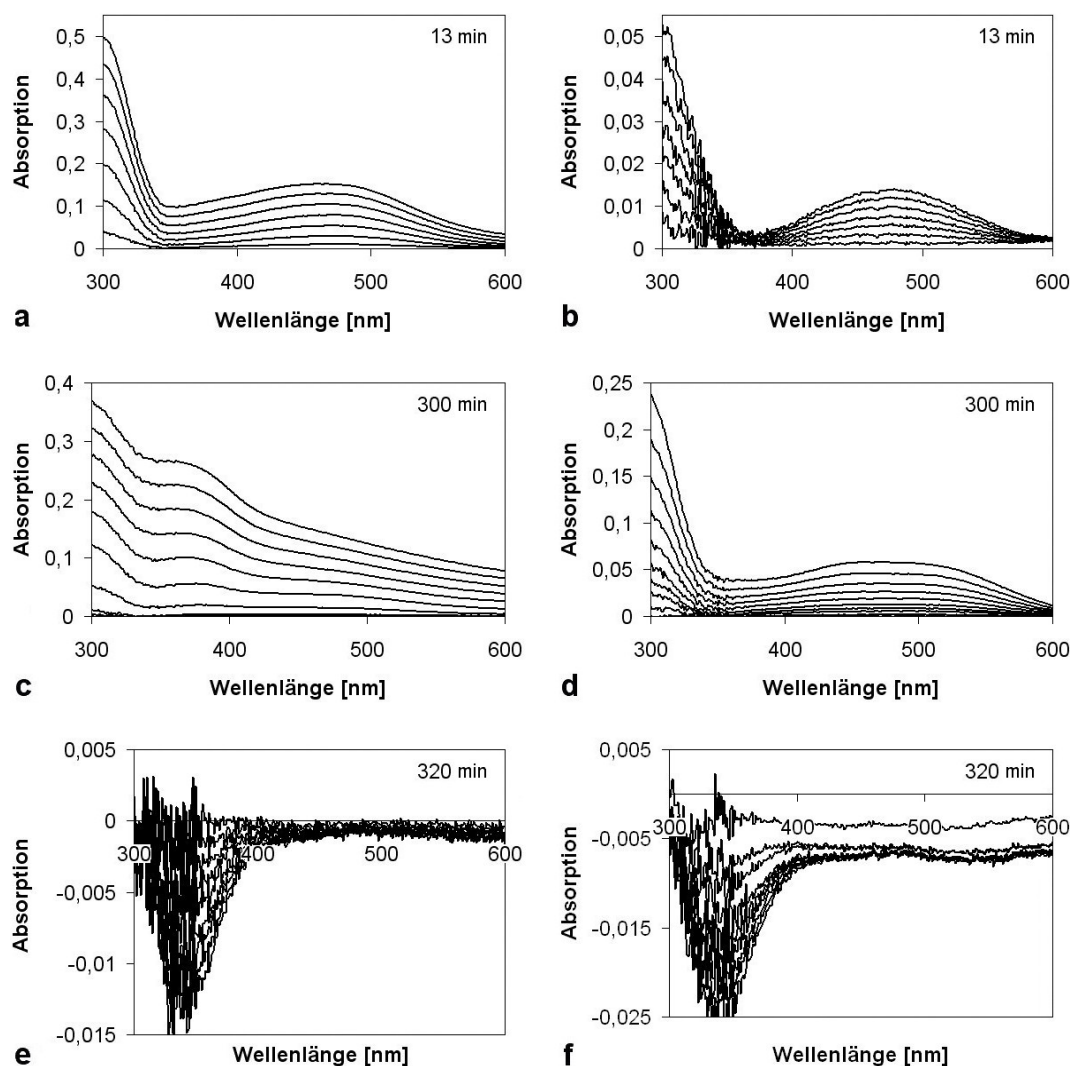


Abbildung 46: Enzymatische Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

Hämocyanin von *P. imperator* in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer aktiviert. Die enzymatische Aktivität wurde mit Substraten (Strukturformeln in Abbildung 45) in einer Endkonzentration von 1 mM bei einer Temperatur von 25°C anhand von Spektren verfolgt. Als Baseline diente das erste Spektrum.

Diphenoloxidase-Aktivität mit **a** Dopamin und **b** L-Dopa. Jede zweite Minute wurde über einen Zeitraum von 13 min ein Spektrum gemessen. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen. **c** Monophenolhydroxylase-Aktivität mit Tyramin und **d** 4-Methylphenol (*p*-Cresol). Alle 30 min wurde über einen Zeitraum von 5 h ein Spektrum gemessen. Monophenolhydroxylase-Aktivität mit **e** 2,4-*di-tert*-Butylphenol und **f** 4-*tert*-Butylphenol. Alle 40 min wurde über einen Zeitraum von 5,3 h ein Spektrum gemessen.

abgezogen). In Abbildung 48a wird der schwache Substratumsatz nochmals dokumentiert: Im Fall von 2,4-*di-tert*-Butylphenol kommt es nach circa 8 h zu einer sehr geringen Zunahme der Absorption bei 475 nm; 4-*tert*-Butylphenol wird gar nicht umgesetzt.

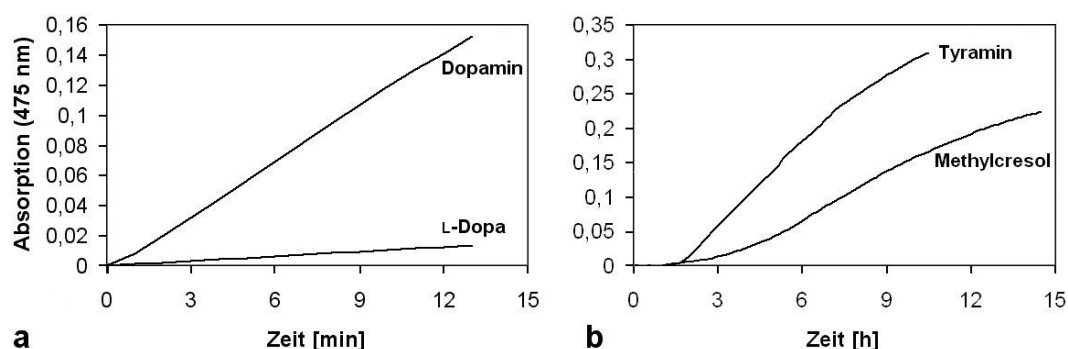


Abbildung 47: Kinetiken zur enzymatischen Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

a Umsatz von Diphenolen.

b Umsatz von Monophenolen

Versuchsbedingungen siehe Legende Abbildung 46.

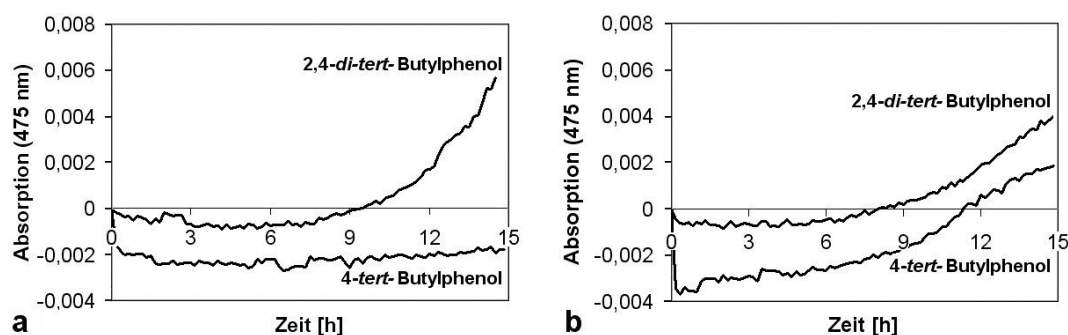


Abbildung 48: Kinetiken zur enzymatischen Aktivität von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

Hämocyanin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer aktiviert. Die Aktivität wurde mit den Substraten 2,4-di-tert-Butylphenol und 4-tert-Butylphenol in einer Endkonzentration von 1 mM bei einer Temperatur von 25°C Spektren untersucht. Alle Kinetiken beginnen bei einer Absorption von Null. Weitere Erklärungen siehe Abbildung 46.

a Absorptionskinetik mit dem Hämocyanin von *P. imperator*.

b Absorptionskinetik mit dem Hämocyanin von *E. californicum*.

3.4.7.2 Substratspezifität der Phenoloxidase von *E. californicum*-Hämocyanin

Auch bei der Versuchsreihe mit dem Hämocyanin von *E. californicum* (Abbildung 49) ist durch die Verwendung von Protein aus einer Hämocyanin-Isolierung eine Vergleichbarkeit gegeben. Mit den Diphenolen Dopamin und L-Dopa ist ein guter Substratumsatz zu verzeichnen. Auch hier wird Dopamin deutlich besser umgesetzt als L-Dopa, wenn auch nur um den Faktor 3,5 (Abbildung 49a und b und Abbildung 50a).

Die Monophenole Tyramin, 4-Methylphenol, 4-tert-Butylphenol und 2,4-di-tert-Butylphenol (Abbildung 49c, d, e und f, Abbildung 48b) werden alle umgesetzt. Vor allem mit Methyl-

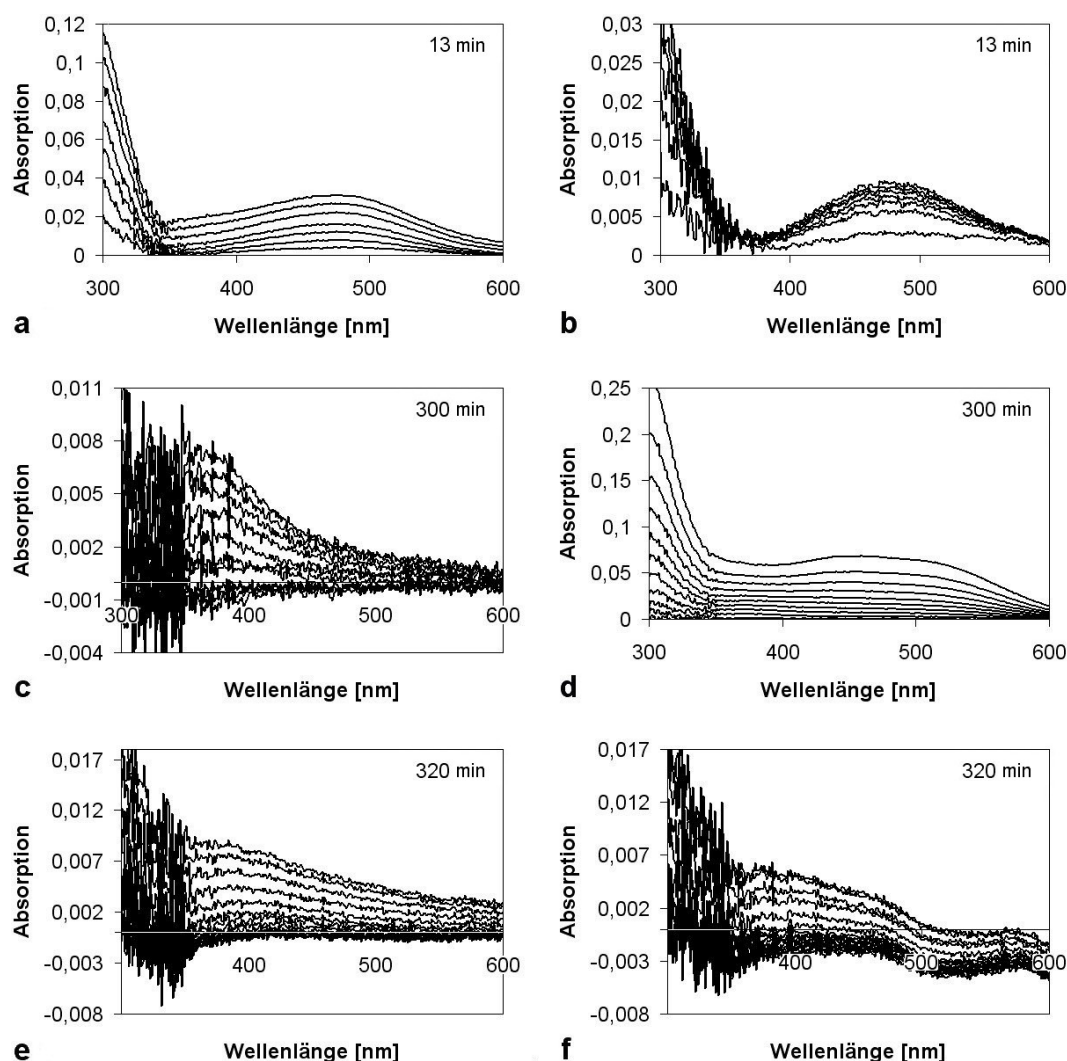


Abbildung 49: Enzymatische Aktivität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

Hämocyanin von *E. californicum* in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer aktiviert. Die enzymatische Aktivität wurde mit Substraten in einer Endkonzentration von 1 mM bei einer Temperatur von 25°C anhand von Spektren verfolgt. Als Baseline diente das erste Spektrum.

Diphenoloxidase-Aktivität mit **a** Dopamin und **b** L-Dopa. Jede zweite Minute wurde über einen Zeitraum von 13 min ein Spektrum gemessen. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen. **c** Monophenolhydroxylase-Aktivität mit Tyramin und **d** 4-Methylphenol (*p*-Cresol). Alle 30 min wurde über einen Zeitraum von 5 h ein Spektrum gemessen. Monophenolhydroxylase-Aktivität mit **e** 2,4-*di-tert*-Butylphenol und **f** 4-*tert*-Butylphenol. Jede Stunde wurde über einen Zeitraum von 15 min ein Spektrum gemessen.

phenol kommt es zu einer extrem starken Reaktion und Anfärbung der Probe (Abbildung 50b). Auch beide Butylphenole zeigen bei iterativen Spektren eine Absorptionszunahme. Wie bei Betrachtung der Kinetik in Abbildung 48b zu erkennen ist, beginnt die enzymatische Reaktion nach etwa sechs Stunden, ist insgesamt aber sehr schwach. Diese lange "Verzögerungsphase", die genauso bei Hämocyanin von *P. imperator* mit 2,4-*di-tert*-Butylphenol auftritt, ist für monophenolische Substrate typisch.

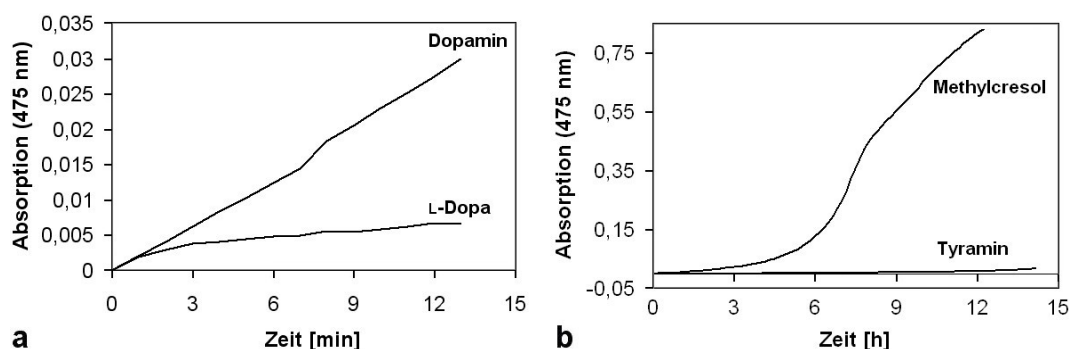


Abbildung 50: Kinetiken zur enzymatische Aktivität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit verschiedenen Substraten.

a Umsatz von Diphenolen.

b Umsatz von Monophenolen

Versuchsbedingungen siehe Legende Abbildung 49.

Fazit

Die beiden Hämocyanine von *P. imperator* und *E. californicum* können mehrere mono- und diphenolische Substrate umsetzen, darunter 4-Methylphenol, Tyramin, 4-*tert*-Butylphenol, 2,4-*di-tert*-Butylphenol, Dopamin und L-Dopa. Warum Tyrosin nicht umgesetzt werden kann, ist nicht klar: Wie in Abbildung 45 zu sehen, besteht der Unterschied zwischen Tyramin und Tyrosin lediglich in der Anwesenheit der Aminosäure-typischen Carboxylgruppe. Dadurch wird der Raumbedarf dieses Substrates zwar insgesamt größer, aber vor allem an der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite des Substrates. Die gleiche Carboxylgruppe macht den Unterschied zwischen Dopamin und L-Dopa aus; hier wird der Substratumsatz nicht verhindert. Möglicherweise kann die schlechte Löslichkeit von Tyrosin für die ausbleibende Katalyse verantwortlich gemacht werden. 2,4-*di-tert*-Butylphenol und 4-*tert*-Butylphenol sind in ihren Umsatzraten extrem schwach. Vom Vogelspinnen-Hämocyanin werden höchstwahrscheinlich beide umgesetzt, vom Skorpion-Hämocyanin nur das 2,4-*di-tert*-Butylphenol. Möglicherweise kommt es auch hier durch den großen Raumbedarf dieser Moleküle zu sterischen Blockaden, die den Substratumsatz verhindern.

Das in diesen Versuchen am besten umgesetzte Diphenol war Dopamin, das am besten umgesetzte Monophenol war Methylphenol. Hinsichtlich seiner schlechten Wasserlöslichkeit und in Bezug auf seine Giftigkeit wurde es für weitere Versuche durch das leicht lösliche Tyramin ersetzt.

3.5 Enzymatische Aktivität in verschiedenen Hämocyanin-Präparationen

Hämocyanin ist als „biologische Probe“ einer natürlichen Variabilität unterworfen. Bei jeder Hämolymphe-Entnahme werden andere Skorpione beziehungsweise Spinnen punktiert, um den Tieren einen möglichst großen Regenerationszeitraum zu gewährleisten. Geschlecht sowie Stadium des Entwicklungs- und Häutungszyklus werden bei der Punktion nicht beachtet. Im Kapitel 3.2 ergeben sich bei den immunologischen Untersuchungen von *Pandinus imperator*-Hämocyanin sieben bis neun verschiedenen Untereinheiten; bei den chromatographischen Untersuchungen sieben (gelelektrophoretisch) beziehungsweise elf (säulenchromatographisch) unterscheidbare Untereinheiten. Die Varianz in der Fluoreszenz (3.2.1) lässt vermuten, dass das Hämocyanin von Tier zu Tier aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt ist.

Eine Varianz der Untereinheiten im Hämocyanin-Oligomer führt zu einer Variabilität der Proben untereinander und könnte letztendlich auch zu unterschiedlichen Versuchsergebnissen führen.

3.5.1 Intensität der enzymatischen Aktivität

Die Untersuchung von Hämocyanin aus verschiedenen Präparationen sowohl von *Pandinus imperator* als auch von *Eurypelma californicum* zeigt, dass der Hämocyanin-Gehalt in der Hämolymphe schwankt (beispielsweise bei fünf Tieren *E. californicum* zwischen 8 mg/ml und 35 mg/ml). Trotzdem sind bei den verschiedenen Hämocyanin-Isolationen die Quotienten der Absorption $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Sie können als Indikator für Reinheit der Probe und Funktionalität des Proteins gewertet werden.

Die enzymatische Aktivität des Hämocyanins ist allerdings von Präparation zu Präparation unterschiedlich. Da aus einem Skorpion nur etwa 400 µl Hämolymphe und aus einer Vogelspinne etwa 300 µl Hämolymphe gewonnen werden können, diese Hämocyanin-Menge für viele Experimente jedoch nicht ausreicht und die Reinigung des Hämocyanins von Einzeltieren zudem sehr arbeitsaufwendig ist, wird die Hämolymphe mehrerer Tiere vereinigt und gemeinsam gereinigt. Die Abweichungen in der Aktivität entstehen durch unterschiedlich starke Aktivitäten in der Hämolymphe jedem der fünf bis sechs Tiere, aus der sich eine Präparation zusammensetzt. Stellvertretend für die Abstufungen der enzymatischen Aktivität in den Präparationen ist der Substratumsatz beziehungsweise die Absorption nach einem bestimmten Zeitraum für beide Cheliceraten-Hämocyanine in Abbildung 51 dargestellt.

Zu sehen ist die Absorption bei 475 nm nach 10 h als Maß für die Cresolase-Aktivität und die Absorption nach 5 min für die Catecholoxidase-Aktivität von Hämocyanin.

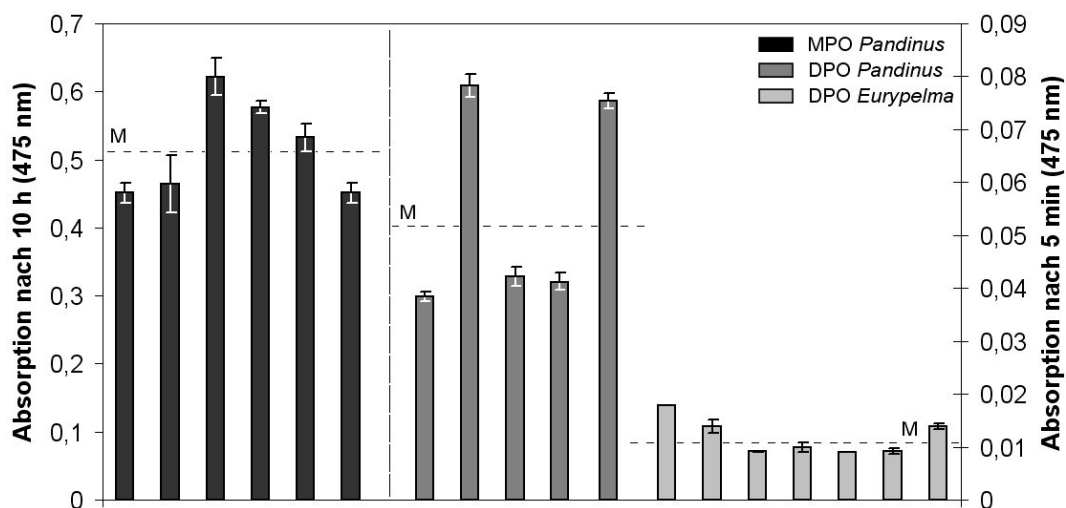


Abbildung 51: Substratumsatz von verschiedenen Hämocyanin-Präparationen.

Der Substratumsatz von verschiedenen Hämocyanin-Präparationen wurde unter den gleichen Bedingungen in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit 2 mM SDS, 1 mM Substrat (Tyramin oder Dopamin) und einer Protein-Konzentration von 0,2 mg/ml bei 25°C spektroskopisch aufgenommen. Aus Maß für die Aktivität dient die Absorption bei 475 nm nach 10 h für die Monophenolhydroxylase (linke Ordinate) und nach 5 min bei der Diphenoloxidase (rechte Ordinate). Aufgetragen sind die Autooxidation-korrigierten Durchschnittswerte (ungeordnet) (aus zwei bis vier Messungen) der Aktivität mit dem Fehler des Mittelwertes sowie der Mittelwert (M) der dargestellten Messungen.

Die Werte der Einzelmessungen unterscheiden sich stark und können nicht mehr mit Schwankungen im Rahmen der Messungenauigkeit erklärt werden. Dies gilt sowohl für die Mono- als auch für die Diphenoloxidase-Aktivität des Skorpion-Hämocyanins, bezieht sich also auf beide enzymatische Aktionen. Dies ist nicht überraschend, da beide Reaktionen am gleichen aktiven Zentrum stattfinden.

Auch beim Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* findet sich in jeder Probe unterschiedlich starke enzymatische Aktivität. Zusätzlich ist die absolute Aktivität (gemessen an der Intensität der Färbereaktion), um 50 % bis 75 % schwächer als die des Skorpion-Hämocyanins; das heißt *P. imperator*-Hämocyanin setzt drei- bis sechsmal mehr Dopamin um als die gleiche Menge *E. californicum*-Hämocyanin. Die Ursache für die schwächere Aktivität des Vogelspinnen-Hämocyanins bleibt im Dunkeln, denn in allen anderen Bezügen verhalten sich verschiedene Hämocyanin-Proben gleich. Höchstwahrscheinlich ist die Catecholoxidase-Aktivität im *P. imperator*-Hämocyanin intrinsisch stärker ausgeprägt. Damit sind jedoch einzelne Experimente wie SDS-Abhängigkeit der Aktivierung, Abhängigkeit von pH-Wert oder sonstigen Puffer-Komponenten etc. der beiden Hämocyanin-Spezies quantitativ nicht direkt miteinander vergleichbar. Ihre qualitative relative Aussage dagegen bleibt bestehen.

Entscheidend ist vor allem die Tatsache, dass die Stärke der Aktivität zwar zwischen den Chargen, aber nicht innerhalb einer Hämocyanin-Probe schwankt. Alle Messreihen dieser Arbeit wurden daher mit Hämocyanin aus einer Isolierung durchgeführt. Da es jedoch unmöglich war, zu Beginn der Arbeit einen Pool von Skorpionen beziehungsweise Spinnen

und / oder deren Hämocyanin anzulegen und sämtliche Untersuchungen ausschließlich mit diesem Protein zu bestreiten, sind die genauen Ergebnisse verschiedener Messreihen nur schwer miteinander zu vergleichen. So schwankt beispielsweise die Monophenolhydroxylase von verschiedenen Isolierungen *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit +20 % und -13 % um den Mittelwert der Aktivität. Die Catecholoxidase-Aktivität von Skorpion-Hämocyanin nimmt Werte von +27 % bis -40 %, die von Spinnen-Hämocyanin Werte von +24 % bis -50 % um den Mittelwert an. Aufgrund dieser hohen Variabilität innerhalb einer Hämocyanin-Spezies ist es freilich noch schwieriger, Hämocyanin verschiedener Spezies einander gegenüberzustellen. Auch hier können die Ergebnisse nicht absolut, sondern nur hinsichtlich ihrer Qualität interpretiert werden.

Dass die Schwankungen in der Aktivität darauf zurückzuführen sind, dass unterschiedliche unterschiedliche Mengen einer Phenoloxidase mit dem Hämocyanin ko-eluiert werden, kann ausgeschlossen werden (beispielsweise Abbildung 35). Auch eventuell existierende Effektoren oder Inhibitoren in der Hämolymphe werden bei der Reinigung des Hämocyanins durch Gelfiltration abgetrennt, da sich das Protein während der etwa drei Stunden dauernden Chromatographie ständig in „effektorfreiem“ Puffer befindet.

Die unterschiedliche enzymatische Aktivität verschiedener Hämocyanin-Proben von *Eurypelma californicum* wurde von Jaenicke ^[114] untersucht: Eine Verunreinigung des Hämocyanins durch Phenoloxidasen, Unterschiede in Tertiär- oder Quartärstruktur, Unterschiede in der Untereinheiten-Zusammensetzung oder am aktiven Zentrum, Effektoren oder gebundene Lipide konnten ausgeschlossen werden. Die Ursache für die Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Hämocyanin-Präparationen scheint also im Hämocyanin selbst zu liegen.

3.5.2 Beginn der enzymatischen Aktivität

Neben der Stärke der enzymatischen Aktivität fällt vor allem bei der Cresolase-Aktivität der Zeitpunkt ins Auge, an dem der Substratumsatz beginnt. Der Substratumsatz der Catecholoxidase-Aktivität aller untersuchten Cheliceraten-Hämocyanin beginnt in dem Moment, in dem das Enzym Hämocyanin auf die Reaktionspartner trifft; bei photometrischen Experimenten ist die Versuchsaufbau-bedingte Totzeit in der Regel so kurz, dass der Dopaminumsatz spätestens in der ersten Minute der Beobachtung sichtbar wird. Bei der Monophenolhydroxylase-Aktivität dagegen vergeht bis zum Beginn des Tyraminumsatzes eine relativ lange Zeitspanne. Diese „Verzögerungsphase“ ist wie die Stärke der enzymatischen Aktivität von der Hämocyanin-Präparation abhängig. Bei *P. imperator*-Hämocyanin schwankt sie zwischen circa einer halben und sechs Stunden, bei Hämocyanin von *E. californicum* zwischen einer und sechs Stunden.

Der Zeitpunkt, in dem der Substratumsatz beginnt, ist für eine Hämocyanin-Isolierung und eine Versuchsreihe konstant. Untersuchungen an verschieden alten Hämocyanin-Proben legen den Schluss nahe, dass die Länge der „Verzögerungsphase“ (Phase ohne Monophenolumsatz) zusätzlich von der Lagerungsdauer des Proteins abhängt. Empirische Beob-

achtungen haben gezeigt, dass sich mit zunehmenden Alter des *P. imperator*-Hämocyanins die "Verzögerungsphase" verkürzt (Tabelle 25 und Abbildung 52).

Versuchsdatum	Hämocyanin präpariert am	Beginn der Reaktion nach ...
12.01.03	26.01.02	0,25 h
12.10.03	16.10.03	6 h
12.12.03	Dezember 03	2,75 h
26.02.04	Dezember 03	1,2 h
10.03.04	Dezember 03	0,25 h
13.06.05	13.06.05	5 h
05.07.05	April 05	0,9 h
	25.05.05	1,5 h
10.10.05	13.06.05	0,4 h

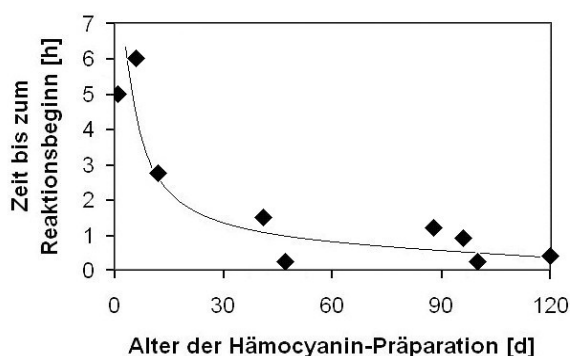


Tabelle 25 und Abbildung 52: Alter der Präparation und Beginn der Monophenolhydroxylase-Aktivität bei *P. imperator*-Hämocyanin.

Hämolymphe wurde wie in Kapitel 2.7 beschrieben nach der Punktion des Perikards in Pandinus-Puffer gesammelt und auf Eis gelagert. Zentrifugation, Säulenchromatographie und Lagerung des Hämocyanins erfolgten bei 4°C.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS und 1 mM Tyramin spektroskopisch untersucht.

Fazit

Die enzymatische Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin lässt sich mit dem geeigneten System verlässlich nachweisen. Bereits bei der Catecholoxidase-Aktivität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin wurde von Jaenicke ^[114] eine Variabilität aufgezeigt, die nicht auf Hämocyanin-Modifikationen, weder auf Ebene der Quartär- oder Tertiärstruktur, noch am aktiven Zentrum zurückgeführt oder durch gebundener Substanzen erklärt werden konnte.

Bei der Phenoloxidase-Aktivität des *Pandinus imperator*-Hämocyanins sind ebenfalls Schwankungen in der Aktivität nachzuweisen: Nicht nur die Stärke der Aktivität (Mono- und Diphenoloxidase), sondern auch der Beginn der Monophenolhydroxylase variiert. Der Zeitpunkt des Tyraminumsatzes ist mit der Lagerungsdauer der Hämocyanin-Isolation korreliert, obwohl mit den angewendeten Untersuchungen keine Unterschiede im Hämocyanin festgestellt werden konnten. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

3.6 Aktivierung der enzymatischen Aktivität

Für die Aktivierung der Phenoloxidase-Aktivität in latenten Tyrosinasen gibt es zahlreiche Möglichkeiten (Tabelle 22). Bei der Aktivierung von Hämocyaninen wurde bisher das anionische Detergenz SDS verwendet, das vor allem aufgrund einer langen Tradition und leichten Handhabung zum generellen Nachweis und für Untersuchungen von Tyrosinase und Catecholoxidasen verwendet wird. Außer SDS konnte bei Crustaceen das Hämocyanin von *C. maenas* und von *H. americanus* mit Perchlorat zu einer Catecholoxidase aktiviert werden^[112, 114]. Das Hämocyanin von *L. polyphemus* konnte ebenfalls zu einer Diphenoloxidase aktiviert werden, und zwar durch die Verwendung des kationischen Detergenz CPC (Cetylpyridiniumchlorid)^[115].

Dieses Kapitel ist der Frage gewidmet, ob weitere Aktivatoren für die enzymatische Aktivität verschiedener Cheliceraten-Hämocyanin existieren. Ein geeigneter Aktivator soll ausgewählt und dessen Anwendung optimiert werden.

3.6.1 Aktivatoren der Phenoloxidase

Für die Cheliceraten-Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* wurde untersucht, ob außer den bekannten Aktivatoren weitere Effektoren das Atmungsprotein zu einem Enzym aktivieren können.

3.6.1.1 Überprüfung verschiedener Aktivatoren

Im Dot Blot wurden die Hämocyanine in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit und ohne MBTH auf Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität untersucht. Als Aktivatoren wurden CPC, Trypsin, Chymotrypsin, Ethanol, Harnstoff, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin (beide aus Eigelb) und Phosphatidylserin (Rinderhirn) eingesetzt. Die wichtigsten Ergebnisse werden in der Diskussion in Tabelle 30 (Seite 223) zusammengefasst.

Die Diphenoloxidase-Aktivität im Dot Blot sollte nach circa 20 min Reaktionszeit ausgewertet werden. Danach ist die Autooxidation oft so stark, dass bei vielen Protein-Aktivator-Kombinationen eine enzymatische Aktivität durch ausgeprägte Färbung vorgetäuscht wird. Der 'Dot' ist zu Reaktionsbeginn rötlich (Dopachrom), ohne MBTH verfärbt er sich dann braun-schwarz (Melanin).

Bei der Positivkontrolle mit SDS setzen alle drei untersuchten Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* Dopamin (Substrat für die Catecholoxidase, Abbildung 43) um. Ebenso gut wirkt der Aktivator CPC vor allem bei den Hämocyaninen von *P. imperator* und *L. polyphemus*, etwas schwächer auch bei *E. californicum* (siehe auch Kapitel 3.6.1.2). Ein weiterer Aktivator der Diphenoloxidase ist die Protease Chymotrypsin:

	<i>P. imperator</i>	<i>E. californicum</i>	<i>L. polyphemus</i>	<i>Penaeus sp.</i>	<i>Astacus sp.</i>	<i>Carcinus sp.</i>	Kontrolle
Dopamin, Trypsin, MBTH							
Tyramin, Trypsin, MBTH							

Abbildung 53: Dot Blot zur Untersuchung der Phenoloxidase-Aktivität von verschiedenen Hämocyaninen nach limitierter Proteolyse mit Trypsin.

Je 2 µl Reaktionslösung wurden mit je 2 µl Hämocyanin von *Pandinus imperator* (46 mg/ml), *Eurypelma californicum* (33 mg/ml), *Limulus polyphemus* (11 mg/ml), *Penaeus sp.* (13 mg/ml), *Astacus astacus* (5 mg/ml) und *Carcinus sp.* (12mer, 6 mg/ml) versetzt. Die Reaktionslösung enthielt 0,1 M Tris, 10 mM Substrat (Tyramin für die Monophenolhydroxylase-, Dopamin für die Diphenoloxidase-Aktivität) in Puffer, 1 mg/ml Trypsin und 0,1 mg/ml MBTH.

Die eingesetzten Hämocyanin-Proben wurden hinsichtlich ihrer Konzentration nicht normiert, da es nicht um einen quantitativen Vergleich der Aktivität ging, sondern lediglich darum, die enzymatischen Fähigkeiten zu überhaupt nachzuweisen.

Bei Verstärkung der Färbung mit MBTH kann eine schwach positive Reaktion beim Hämocyanin des Skorpions und eventuell auch beim Pfeilschwanzkrebs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch mit der zweiten untersuchten Protease Trypsin färbt sich nach circa 20 min der Dopamin-‘Dot’ hellgrau, später rot (Abbildung 53). Beim Hämocyanin von Crustaceen ist diese Art der Aktivierung durch Trypsin sehr effektiv. Bei den überprüften Substanzen Ethanol und Harnstoff ist möglicherweise eine sehr schwache Färbung für *P. imperator*-Hämocyanin zu verzeichnen.

Bei dem Versuchsansatz mit Lipiden (Abbildung 54) kann Phosphatidylcholin bei den Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* oder *L. polyphemus* eine Catecholoxidase-Aktivität induzieren. Das Lösungsmittel der Lipide (Chloroform) kann dabei als Aktivator ausgeschlossen werden. Phosphatidyletholamin oder Phosphatidylserin sind keine Aktivatoren der Diphenoloxidase.

Bei Untersuchungen zur Monophenolhydroxylase-Aktivität können die Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum*, *L. polyphemus*, *A. astacus*, *Penaeus* und *Carcinus* durch 6 mM SDS zum Tyraminumsatz aktiviert werden (wie zum Beispiel zu sehen in Abbildung 43). Durch Trypsin (Abbildung 53) kann die Monophenolhydroxylase schwach bei den Hämocyaninen von *E. californicum* und *P. imperator* aktiviert werden. Kaum sichtbar ist die Monophenolhydroxylase-Aktivität beim Hämocyanin von *A. astacus*. Als weiterer, sehr guter Aktivator für die Cresolase-Aktivität stellt sich CPC heraus (Dot Blot nicht gezeigt; weitere Untersuchungen in Kapitel 3.6.1.2). Es wirkt besonders gut bei dem Hämocyanin des Skorpions, schwächer bei der Vogelspinne und kaum beim Pfeilschwanzkrebs. Ethanol und Harnstoff können die Cresolase nicht erkennbar aktivieren (Daten nicht gezeigt). Bei dem Versuchs-

	Dopamin				Tyramin		
	SDS	PC	PE	PS	PC	PE	PS
<i>P. imperator</i>							
<i>E. californicum</i>							
<i>L. polyphemus</i>							
Kontrolle Chloroform							

Abbildung 54: Dot Blot zur Untersuchung der Phenoloxidase-Aktivität von verschiedenen Hämocyaninen mit Lipiden.

Je 2 µl Reaktionslösung wurden mit je 2 µl Hämocyanin von *Pandinus imperator* (7,4 mg/ml), *Eurypelma californicum* (6,4 mg/ml) und *Limulus polyphemus* (7,75 mg/ml) versetzt. Die Reaktionslösung enthält 75 mM Tris, 3 mM Substrat (Tyramin für die Monophenolhydroxylase-, Dopamin für die Diphenoloxidase-Aktivität) in Puffer, 2 mg/ml Lipid (Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidyletholamin (PE) oder Phosphatidylserin (PS)) in Chloroform beziehungsweise 4 mM SDS und Chloroform für die Positivkontrolle.

Die eingesetzten Hämocyanin-Proben wurden hinsichtlich ihrer Konzentration nicht normiert, da es nicht um einen quantitativen Vergleich der Aktivität ging, sondern lediglich darum, die enzymatischen Fähigkeiten zu überhaupt nachzuweisen.

ansatz mit Lipiden (Abbildung 54) kann weder Phosphatidylcholin, das zumindest die Catecholoxidase-Aktivität zu induzieren vermag, noch Phosphatidyletholamin oder Phosphatidylserin eine Monophenolhydroxylase bei Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* oder *L. polyphemus* aktivieren.

Alle Aktivatoren der Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins sind in den Tabelle 22, Tabelle 23 (Seite 99) und Tabelle 30 (Seite 223) zusammengefasst.

3.6.1.2 Untersuchungen mit dem Aktivator CPC

Da CPC neben SDS der am besten wirksame Aktivator war, wurde seine Fähigkeit, Hämocyanin zu aktivieren, mit weiteren, besser quantifizierbaren Methoden näher untersucht.

3.6.1.2.1 Gelelektrophoretische Untersuchungen mit dem Aktivator CPC

Die Fähigkeit von CPC, Hämocyanin neben dem Dot Blot auch in der nativen PAGE zu aktivieren, wird in Abbildung 55 sichtbar. Dazu wurde Hämocyanin von *P. imperator* und *E. californicum* auf ein Gel aufgetragen und mit den Substraten Dopamin und Tyramin angefärbt.

Im Vergleich mit dem Aktivator SDS (Abbildung 55a) fällt die Diphenoloxidase-Aktivität bei Aktivierung mit CPC (Abbildung 55b) etwas schwächer aus. Nichtsdestotrotz ist CPC in der Lage, sowohl eine Catecholoxidase-Aktivität bei den Hämocyaninen von *P. imperator* und

E. californicum und eine Cresolase-Aktivität zumindest bei dem Hämocyanin von *P. imperator* zu induzieren.

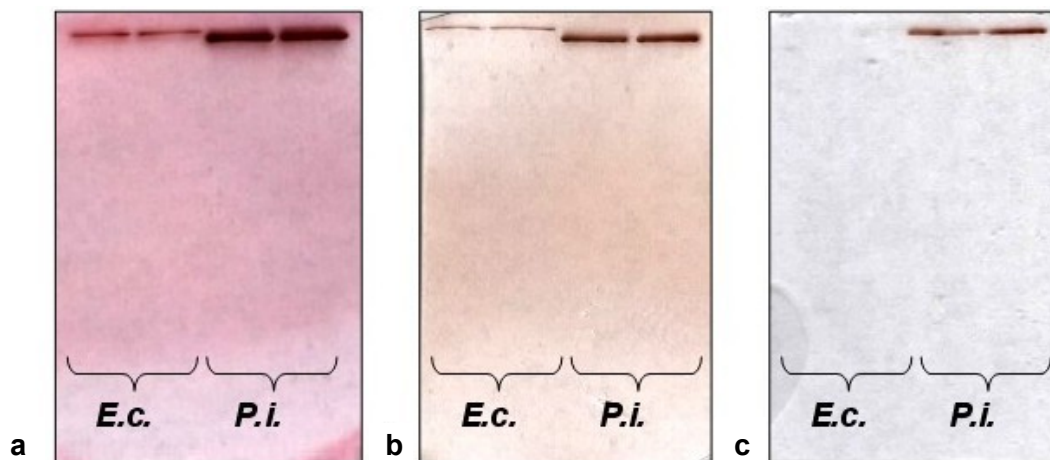


Abbildung 55: Phenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin mit dem Aktivator CPC.

Native PAGE (7,5 %, pH 8,8; je 10 mM CaCl_2 und MgCl_2 in Gel und Laufpuffer verhindern, dass *P. imperator*-Hämocyanin in Doedekamere zerfällt) mit Hämocyanin von *P. imperator*- und *E. californicum* (je 17 μg pro Spur). Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität mit

- a** Aktivator SDS, MBTH und Substrat Dopamin (Diphenoloxidase-Aktivität).
- b** Aktivator CPC, MBTH und Substrat Dopamin (Diphenoloxidase-Aktivität).
- c** Aktivator CPC, MBTH und Substrat Tyramin (Monophenolhydroxylase-Aktivität).

3.6.1.2.2 Photometrische Untersuchungen mit dem Aktivator CPC

Neben der gelelektrophoretischen Untersuchung sollte die enzymatische Aktivität durch CPC photometrisch und damit quantitativ untersucht werden. Als Problem stellte sich dabei heraus, dass CPC mit Hämocyanin eine milchige Trübung ausbildet. Dabei entstehen weder definierte Kristalle, die ausfallen oder zu Boden sinken, noch Aggregate, wie sie zum Beispiel für die Protein-Denaturierung charakteristisch wären.

Die Trübung entsteht durch CPC mit Hämocyanin; sie wird von der MgCl_2 -Konzentration beeinflusst und geht nach einem längerem Beobachtungszeitraum (> 30 min) wieder zurück.

Der Versuchsansatz enthielt *P. imperator*-Hämocyanin (0,1 mg/ml), 1 mM Dopamin und 4 mM CPC in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8). In Abbildung 56a sind die Kurven dargestellt, die lediglich um die Autooxidation korrigierten wurden (Aufnahme des Substratumsatzes mit Hämocyanin als Messwert und ohne Hämocyanin als Autooxidation). Der Startpunkt jeder Kinetik wurde auf Null korrigiert. Neben der Autooxidation wurde zusätzlich auch noch die Trübung durch CPC in Abhängigkeit der MgCl_2 -Konzentration gemessen (Ansatz ohne Substrat, mit Puffer, CPC, Hämocyanin und verschiedene Mengen an MgCl_2) (Abbildung 56b). Die Trübungszunahme in Abhängigkeit von der Zeit wurde in relativen Anteilen berechnet und diese prozentuale Absorptionszunahme von den Autooxidation-korrigierten Daten wieder abgezogen. Es ergibt sich das in Abbildung 56c dargestellte Bild.

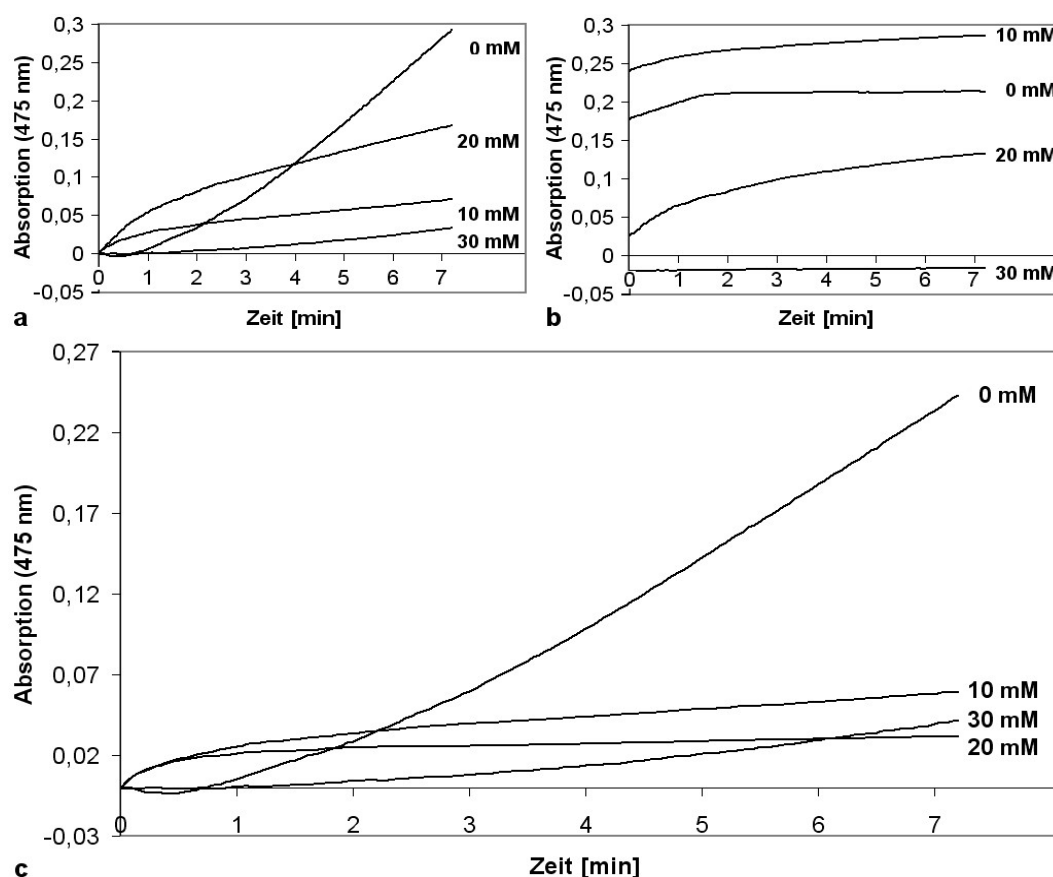


Abbildung 56: Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* mit Cetylpyridiniumchlorid und $MgCl_2$.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit CPC aktiviert. Die Diphenoloxidase-Aktivität bei unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen wurde mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. (Mittelwert aus zwei Werten.) Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,1 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit 4 mM CPC bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Weitere Erläuterungen im Text.

a Autooxidation-korrigierte Daten. Trübung nicht berücksichtigt.

b Trübung durch CPC. Ansatz mit Hämocyanin ohne Substrat Dopamin.

c Autooxidation- und Trübung-korrigierte Daten.

In Tris-Puffer ohne Zusatz von Magnesiumsalz wird das Hämocyanin trotz Eintrübung aktiviert und kann das Substrat gut umsetzen. Mit $MgCl_2$ ist die Trübung, die sich bei der Mischung von Hämocyanin und CPC ausbildet, im Allgemeinen weniger stark, die enzymatische Aktivität des Hämocyanin scheint hier allerdings durch $MgCl_2$ negativ beeinflusst zu werden. Insgesamt scheinen Mg^{2+} und CPC einen inhibitorischen Effekt (ohne proportionalen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und der Aktivitäts-Hemmung) auf die Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins zu haben.

Die Wechselwirkung von CPC mit dem Effektor $MgCl_2$ lässt es ungewiss erscheinen, dass das Hämocyanin von dieser Wechselwirkung unbeeinflusst bleibt. Zwar lässt die enzymatische Aktivität auf eine intakte Konformation zurückschließen. Mit $MgCl_2$ und CPC nimmt die Aktivität allerdings ab, während Mg^{2+} in anderen Versuchen (Kapitel 3.8.3.1) verstärkend auf

die Diphenoloxidase-Aktivität wirkt. Die eingesetzten MgCl_2 - und / oder CPC-Mengen im Reaktionsansatz bleiben nicht vollständig in Lösung, damit ist die genaue Konzentration, die auf das Protein wirkt, nicht bekannt. Die Trübung macht spektroskopische Daten kaum auswertbar. CPC ist damit ein guter, für weitere Versuche allerdings ungeeigneter Aktivator.

3.6.1.3 Aktivierung durch Liposomenvesikel

Wie in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben, kann eine Diphenoloxidase im Hämocyanin eindeutig durch Phosphatidylcholin und sehr schwach mit Phosphatidyletholamin aktiviert werden. Es stellt sich die Frage, ob die Aktivatoren dies auch in Vesikelform können. SDS beispielsweise bildet in Salz-freier Lösung ab einer Konzentration von 7,8 mM Micellen aus ^[175], wirkt aber sowohl unterhalb als auch oberhalb dieser Konzentration aktivierend. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Hämocyanins und der CMC von SDS kann nicht vollkommen von der Hand gewiesen werden, wie in Abbildung 66 (Kapitel 3.8.3.1) noch zu sehen sein wird. Eventuell können Liposomen in Vesikel-Form daher ebenso eine enzymatische Aktivität induzieren.

Die Liposomenvesikel wurden wie in Kapitel 2.19 beschrieben hergestellt. Vesikel aus Phosphatidylcholin stellten in der dynamischen Lichtstreuung eine monodisperse Population mit einer Größe von 128 nm dar. Die Vesikel aus Phosphatidyletholamin variierten in ihrer Größe zwischen 123 nm und 850 nm.

Mit beiden Vesikel-Typen kann weder eine Mono- noch eine Diphenoloxidase-Aktivität im Hämocyanin von *Pandinus imperator* induziert werden. Trotz des Aufbaus aus aktivierendem Phosphatidylcholin und Phosphatidyletholamin vermag der Vesikel keine Konformationsänderung und Aktivierung bewirken.

3.6.2 Optimierung der Aktivierungsbedingungen

Die prinzipielle Fähigkeit des Hämocyanins zum Umsatz von Mono- und Diphenolen ist eindeutig und durch zahlreiche Methoden belegt worden.

Als stärkste und verlässlichste Aktivatoren haben sich das kationische Detergenz CPC und das anionische Detergenz SDS erwiesen. Die bei photometrischen Versuchen durch CPC hervorgerufene Trübung lässt diesen Aktivator für weitere Versuche ausscheiden; alle folgenden Versuche wurden nur noch mit SDS durchgeführt.

Um die Aktivierungsbedingungen durch SDS für das Hämocyanin von *Pandinus imperator* zu optimieren, wurde das Ausmaß der Aktivierung bei unterschiedlichen SDS- und Substratkonzentrationen mit dem Dopachrom-Assay untersucht.

Als Substrat wurde 1 mM beziehungsweise 5 mM Dopamin verwendet. Die Hämocyaninkonzentration betrug 0,2 mg/ml. Das Protein wurde für zehn Minuten mit der entsprechenden SDS-Konzentration vorinkubiert, um die Aktivität zu maximieren, und die Reaktion durch

Zugabe des Substrats gestartet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) bei 25°C statt. Wie in Abbildung 19 und Tabelle 14 beschrieben, bleibt das Hämocyanin von *P. imperator* bei pH 7,8 und alkalischeren pH-Werten trotz der nur im μM -Bereich vorhandenen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen in seiner 24-meren Form.

Die Versuche mit *P. imperator*-Hämocyanin bei einer Dopamin-Konzentration von 1 mM (Abbildung 57a) zeigen, dass eine maximale Aktivierung bei einer SDS-Konzentration zwischen 2 mM und 15 mM erzielt wird. Bei höheren SDS-Konzentrationen bleibt die Aktivität zunächst unverändert und nimmt dann wieder ab. Eine Wiederholung des Versuchs bei einer Dopamin-Konzentration von 5 mM (Abbildung 57b) führt erstaunlicherweise zu einem anderen Ergebnis. Die Aktivierungskurven ähneln sich zunächst bis zu einer Konzentration von circa 4 mM SDS. Mit zunehmender SDS-Konzentration erhöht sich die Aktivität mit 5 mM Dopamin kontinuierlich, bis mit 30 mM SDS die Aktivität mehr als verdoppelt hat.

Die unterschiedlichen Formen der Aktivierungskurven bei den zwei verschiedenen Substratkonzentrationen beruhen höchstwahrscheinlich auf einer Wechselwirkung zwischen Substrat Dopamin und Aktivator SDS ^[114]. Ob es sich dabei um eine Wechselwirkung der ungebundenen Substanzen in freier Lösung oder aber um eine Wechselwirkung der gebundenen Substanzen handelt, die über die Proteinmatrix vermittelt wird, kann anhand der experimentellen Beobachtungen nicht entschieden werden.

Bei enzymkinetischen Auswertungen der Daten aus Abbildung 57 kann kein steady-state ermittelt werden; die Kurven nehmen keinen hyperbolischen Verlauf an. Eine Auftragung der Messwerte nach Lineweaver-Burk ergibt demnach auch keine linearisierten Daten. Ermittlung von enzymkinetisch relevanten Daten wie Maximalgeschwindigkeit V oder die Michaelis-Menten-Konstante K_M sind nicht möglich; die weitere Datenauswertung der enzym-

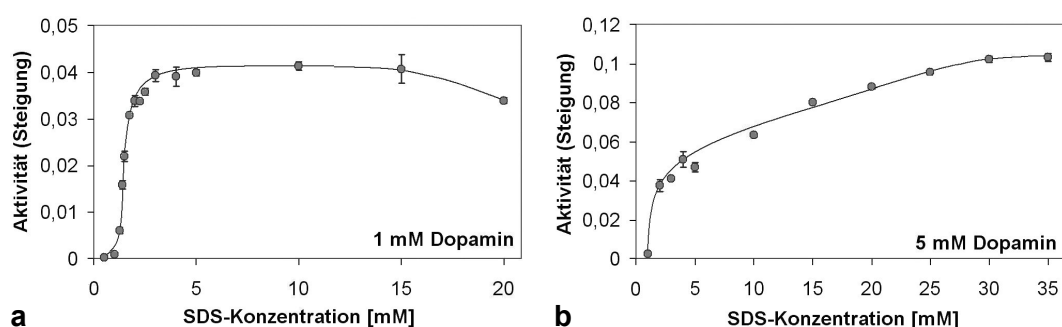


Abbildung 57: Abhängigkeit der Phenoloxidase-Aktivität des *P. imperator*-Hämocyanins von der SDS-Konzentration.

Das Hämocyanin wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) bei 25°C mit verschiedenen Mengen an Dopamin und SDS inkubiert. Der Substratumsatz wurde photometrisch bei 475 nm verfolgt. Als Maß für die Aktivität dient die maximale Steigung; in der Regel innerhalb der ersten zwei Minuten der Reaktion.

a Abhängigkeit der Phenoloxidase-Aktivität des *P. imperator*-Hämocyanins von der SDS-Konzentration mit 1 mM Dopamin und

b mit 5 mM Dopamin. Zu beachten ist die geänderte Skalierung. Aufgetragen ist der Mittelwert aus zwei bis vier unabhängigen Messungen und der Fehler des Mittelwertes.

kinetischen Messwerte kann daher nur auf einer rein deskriptiven Ebene erfolgen. Solange die Ursachen und die Gesetzmäßigkeiten der Wechselwirkung unbekannt sind, muss auf Auswertung der Daten nach dem Michaelis-Menten-Formalismus verzichtet werden.

Fazit

Die lange Historie und häufige Benutzung des unphysiologischen Detergenz SDS zur Aktivierung von Hämocyanin hat mehrere offensichtliche Gründe. Es ist einfach in Handhabung und Lagerung, ungiftig, und neben CPC der quantitativ beste Aktivator. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Substrat und SDS existieren keine allgemeingültigen optimalen Aktivierungsbedingungen, sondern es gibt für jede Substratkonzentration eine eigene optimale SDS-Konzentration, bei der die größte Aktivität messbar ist.

Als problematisch stellt sich die Suche nach dem physiologischen Pendant des SDS für eine *in vivo*-Aktivierung der Phenoloxidase im Hämocyanin dar. Erfolgreiche Aktivierung mit Proteasen lassen vermuten, dass das Hämocyanin analog zu den echten Phenoloxidase proteolytisch aktiviert werden könnte. Als weitere natürliche Aktivatoren werden Fettsäuren und lipophile Substanzen vorgeschlagen ^[117].

3.7 Stabilität des aktiven Zentrums – Überprüfung durch enzymatische Aktivität

Bei der Aktivierung zur Phenoloxidase wird Hämocyanin von dem anionischen Detergens SDS in noch unbekannter Art und Weise stimuliert. Decker et al. ^[65] postulierten schon 2001 eine partielle Auffaltung der Hämocyaninstruktur, die das respiratorische Protein aktiviert und den Zugang zum aktiven Zentrum für diphenolische Substrate freimacht.

Auf Dauer ist Hämocyanin gegenüber SDS allerdings nur mäßig stabil (Kapitel 3.3.2). Es stellt sich, vor allem hinsichtlich der langen "Verzögerungsphase" vor der Absorptionszunahme durch die Cresolase-Aktivität die Frage, ob die aktiven Zentren nur noch in partiell korrekter Faltung vorliegen, oder ob bei einem Teil der Hämocyanine das aktive Zentrum vollständig denaturiert wurde und bei dem anderen Teil nicht. Diese Stabilität des aktiven Zentrums kann neben der Fähigkeit zur Sauerstoffbindung eben auch über seine katalytische Tätigkeit untersucht werden.

Die hochspezifische Reaktion des Mono- beziehungsweise Diphenolumsatzes kann nicht durch ein deoxygeniertes oder gar denaturiertes Hämocyanin katalysiert werden. Neben Erkenntnissen zu dem Zustand des aktiven Zentrums kann eventuell auch Einsicht zum Reaktionsmechanismus der Catecholoxidase- und Cresolase-Aktivität gewonnen werden.

Für diese bei 25°C durchgeführten Versuche dient Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum*, das in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml 16,5 h mit 2 mM SDS vorinkubiert wurde. Andere zeitliche Abhängigkeiten wurden hier nicht weiter berücksichtigt. Der Puffer bestand aus 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit MgCl₂ in einer Konzentration von 30 mM oder ohne Zugabe von MgCl₂ (Ca²⁺ und Mg²⁺ allenfalls im µM-Bereich vorhanden). Dem Ansatz wurden nach 16,5 h 1 mM (Endkonzentration) Dopamin oder Tyramin zugefügt und die enzymatische Aktivität über die Absorptionszunahme bei 475 nm verfolgt.

3.7.1 Substratumsatz durch *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Das Hämocyanin von *P. imperator* ist bei normalem Sauerstoffpartialdruck voll beladen ^[194], der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ entspricht mit einem Wert um 0,242 einem Oxygenierungsgrad von 100 % (Tabelle 19). In der Anfangsphase der Inkubation mit SDS fällt die Sauerstoffbeladung nahezu linear mit einem Verlust von etwa 5 % pro Stunde ab. Im Lauf der Inkubationsdauer kommt es dann zu einer Verringerung der Verlustrate, nach fünfzehn Stunden ist das Hämocyanin nur noch zu 22 % mit Sauerstoff beladen (Tabelle 20). Trotzdem ist das Protein nach mehr als 16,5 h noch so weit intakt, dass es Dopamin oxidieren kann (Abbildung 58a). Die Kurve des Dopaminumsatzes beginnt sofort mit einem steilen Anstieg und nimmt dann eine schwächere stetige und lineare Steigung an.

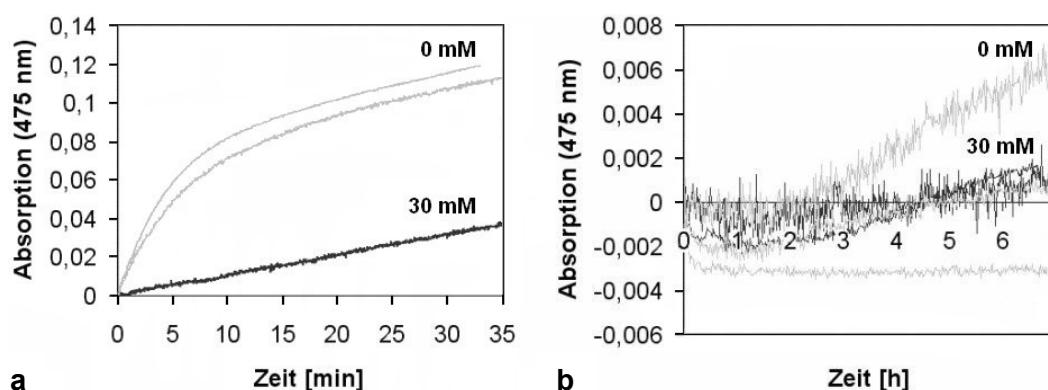


Abbildung 58: Substratumsatz von *P. imperator*-Hämocyanin nach 16,5-stündiger Inkubation mit 2 mM SDS.

Hämocyanin von *P. imperator* (0,2 mg/ml) wurde für 16,5 h bei einer Temperatur von 25°C in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit oder ohne $MgCl_2$ und einer SDS-Konzentration von 2 mM vorinkubiert. Danach wurde die enzymatische Aktivität photometrisch untersucht, indem Substrat dazugegeben und die Farbentwicklung bei 475 nm verfolgt wurde. Endkonzentrationen: Hämocyanin 0,18 mg/ml, SDS 1,8 mM, Tris 90 mM. Jeder Versuch wurde zwei- bis dreimal durchgeführt.

a Dopaminumsatz (Diphenoloxidase-Aktivität, nach Abzug der Autooxidation) ohne (grau) und mit (schwarz) 30 mM $MgCl_2$.

b Tyraminumsatz (Monophenolhydroxylase-Aktivität) ohne (grau) und mit (schwarz) 30 mM $MgCl_2$.

Mit 30 mM $MgCl_2$ zusätzlich im Ansatz deoxygeniert Hämocyanin innerhalb weniger Minuten und hat bereits nach 15 min nur noch eine Beladung von 12 %, die im weiteren Versuchsverlauf nahe 0 % sinkt (Tabelle 20). Dementsprechend ist der Dopaminumsatz im Ansatz mit $MgCl_2$ deutlich schwächer. Er stellt sich in seiner Kinetik in einer anderen Kurvenform dar: Die Diphenoloxidase-Aktivität hat eine gleichmäßige Umsatzrate (Abbildung 58a).

Die verschiedenen Kurvenformen der Kinetik sind wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Oxygenierungsgrad des Hämocyanins zurückzuführen. Möglicherweise befindet sich das aktive Zentrum in den beiden Asätzen in leicht voneinander abweichenden Zuständen, die hier in der Form des Substratumsatzes deutlich werden. Mg^{2+} hat in diesem Experiment (verstärkte Deoxygenierung während der langen Inkubation, dann Diphenolumsatz) einen hemmenden Effekt auf die enzymatische Aktivität, während es, wie noch zu sehen sein wird, bei nativem Hämocyanin die Diphenoloxidase-Aktivität verstärkt (Abbildung 66).

Neben der Diphenoloxidase-Aktivität wurde auch die Fähigkeit des Hämocyanins zur Monophenolhydroxylase überprüft: Nach der langen Inkubationszeit ist kein Tyraminumsatz mehr feststellbar (Abbildung 58b): Für diesen Versuchsansatz war es unerheblich, ob sich Mg^{2+} im Ansatz befand oder nicht. Alle Graphen bewegen sich unter starken Schwankungen um die Nulllinie. Weder mit noch ohne Magnesiumsalz kommt es innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7 h zu einer signifikanten Absorptionzunahme, die über die dritte Nachkommastelle hin ansteigt.

***Pandinus imperator*-Dissoziat**

Die dissoziierten Untereinheiten des Skorpion-Hämocyanins reagieren nach Auflösung der Oligomerstruktur extrem empfindlich auf SDS. Bereits nach 30 min ist das Protein nur noch zu weniger als der Hälfte oxygeniert (Tabelle 21).

Dissoziiertes Hämocyanin von *P. imperator* (ohne Vorinkubation mit SDS) kann Tyramin gar nicht, und Dopamin nur bei hohen Hämocyanin-Konzentrationen umsetzen (siehe Kapitel 3.4.3). Nur unter diesen Umständen lässt sich für einige Untereinheiten, insbesondere e und f, eine geringe Diphenoloxidase-Aktivität nachweisen.

Aus diesem Grund ist auch nicht zu erwarten, dass in den Monomeren nach einer längeren Inkubation mit SDS enzymatische Aktivität induziert werden kann. Tatsächlich kann das Hämocyanin-Dissoziat weder zum Mono- noch zum Diphenolumsatz aktiviert werden (Daten nicht gezeigt).

3.7.2 Substratumsatz durch *Eurypelma californicum*-Hämocyanin

Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* zeigt sich in Kapitel 3.3.2 gegenüber SDS wesentlich stabiler als das Skorpion-Hämocyanin: Auch nach fünfzehn Stunden Inkubationszeit kommt es zu keinem nennenswerten Sauerstoffverlust (Tabelle 20). Dementsprechend ist das Hämocyanin von *E. californicum* nach mehr als 16 h erwartungsgemäß in der Lage, Dopamin umzusetzen (Abbildung 59a). Dies ist, wie die nicht vorhandene

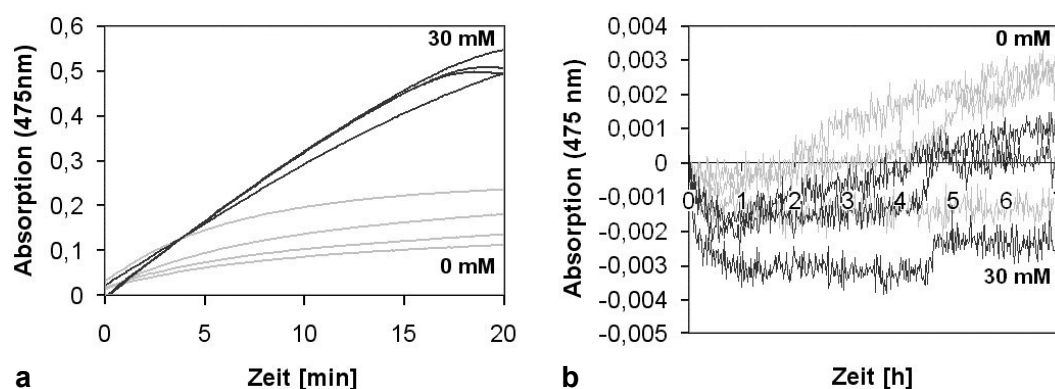


Abbildung 59: Substratumsatz von *E. californicum*-Hämocyanin nach 16,5-stündiger Inkubation mit 2 mM SDS.

Hämocyanin von *E. californicum* (0,2 mg/ml) wurde für 16,5 h bei einer Temperatur von 25°C in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8), mit oder ohne MgCl₂ und einer SDS-Konzentration von 2 mM inkubiert. Danach wurde die enzymatische Aktivität photometrisch untersucht, indem Substrat dazugegeben und die Farbentwicklung bei 475 nm verfolgt wurde. Endkonzentrationen: Hämocyanin 0,18 mg/ml, SDS 1,8 mM, Tris 90 mM. Jeder Versuch wurde zwei- bis viermal durchgeführt.

a Dopaminumsatz (Diphenoloxidase-Aktivität, nach Abzug der Autooxidation) ohne (grau) und mit (schwarz) 30 mM MgCl₂.

b Tyraminumsatz (Monophenolhydroxylase-Aktivität) ohne (grau) und mit (schwarz) 30 mM MgCl₂.

Deoxygenierung, ein Hinweis auf die extreme Stabilität des Vogelspinnen-Hämocyanins und darauf, dass so gut wie alle aktiven Zentren in ihrer funktionellen Form erhalten geblieben sind.

Die Kurve der Kinetik in reinem Tris-Puffer nimmt eine charakteristische Form an: Sie beginnt sofort mit einem steilen Anstieg und erreicht dann ein fast stabiles Niveau bei $A_{475\text{ nm}} = 0,1 - 0,2$, ist in seiner Form also mit dem entsprechenden Versuchsergebnis von *P. imperator*-Hämocyanin sehr gut zu vergleichen.

Mit MgCl_2 in einer Konzentration von 30 mM führt SDS auch bei diesem respiratorischen Protein zu einer stärkeren Deoxygenierung. Nach fünfzehn Stunden sind die Kupferzentren nur noch zu circa 46 % mit Sauerstoff beladen (Tabelle 20). Trotzdem ist der Graph des Dopaminumsatzes unter diesen Voraussetzungen nicht schwächer, wie es im Analogschluss zu den Versuchen mit *P. imperator*-Hämocyanin (Abbildung 58) zu erwarten gewesen wäre. Die Catecholoxidase-Aktivität ist stattdessen bei diesem Ansatz nach 20 min circa dreimal so stark wie ohne das Magnesiumsalz. Der Dopaminumsatz bei dem mit Mg^{2+} vorinkubiertem Hämocyanin nimmt bei *E. californicum* also zu, während im Vergleich dazu die Absorption bei mit Mg^{2+} vorinkubiertem *P. imperator*-Hämocyanin nach 20 min 80 % niedriger ist (Abbildung 58a und Abbildung 59a).

Wiederum wurde auch die Cresolase-Aktivität von vorinkubiertem Hämocyanin mit und ohne Mg^{2+} überprüft. In Abbildung 59b wird sichtbar, dass auch *E. californicum*-Hämocyanin trotz wenig ausgeprägter Deoxygenierung nach SDS-Inkubation keine Monophenolhydroxylase-Aktivität mehr besitzt, die eine nennenswerte Absorptionssteigerung zur Folge hat.

***Eurypelma californicum*-Dimer bc**

Im Hämocyanin der Vogelspinne sind die Untereinheiten *b* und *c* für die enzymatische Aktivität verantwortlich. Versuche zur Stabilität des aktiven Zentrums wurden daher auch mit dem isolierten Untereinheiten-Dimer durchgeführt.

Analog zu den vorherigen Versuchen wurde das Dimer in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml mit und ohne MgCl_2 über einen Zeitraum von 16,5 h inkubiert. Trotz des verminderten Oxygenierungsgrades durch die lange Vorinkubation (Tabelle 21) ist das aktive Zentrum ausreichen intakt, um das Substrat Dopamin umzusetzen (Abbildung 60). Der Dopaminumsatz mit MgCl_2 ist, wie auch für das 24-mere Spinnen-Hämocyanin beschrieben, stärker als der Umsatz ohne MgCl_2 .

Die Anfärbung der Probe macht den Substratumsatz deutlich, allerdings ist die enzymatische Aktivität des Hämocyanins nicht mehr so stark wie bei einem Dimer, das nicht vorinkubiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Hämocyanin während der langen Inkubationszeit mit SDS interagiert hat, was sich in der leichten Deoxygenierung äußert. Die Ergebnisse für die Diphenoloxidase-Aktivität der Untereinheiten *bc* sind von der Tendenz identisch mit den Ergebnissen für das 24-mer. Ohne Mg^{2+} entsteht eine Absorptionskurve, die nach

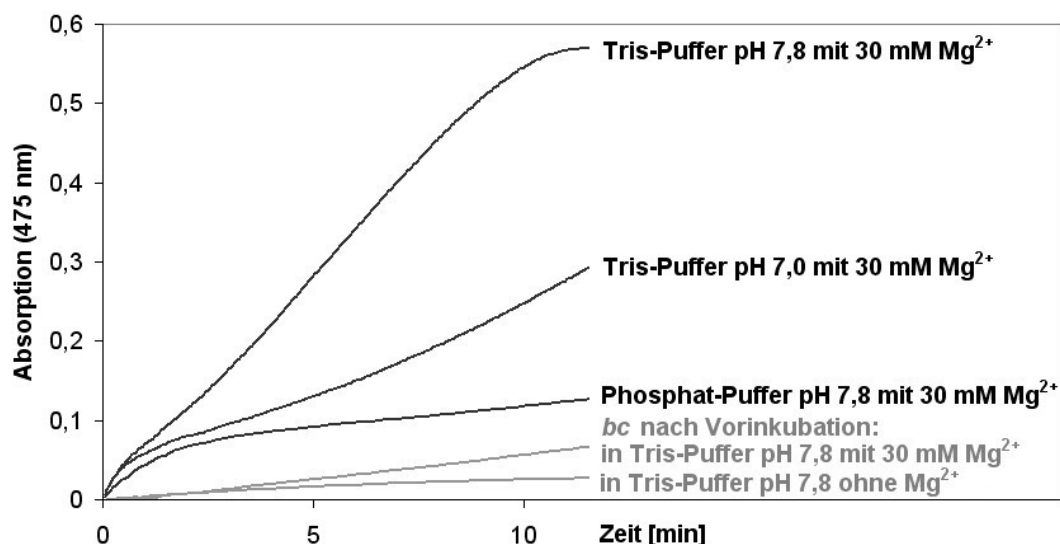


Abbildung 60: Dopaminumsatz des *Eurypelma californicum*-Hämocyanin Dimers *bc* unter verschiedenen Bedingungen.

Das Hämocyanin-Dimer (Konzentration 0,1 mg/ml) wurde in verschiedenen Puffern (0,1 M) mit und ohne 30 mM MgCl_2 bei 25°C mit 2 mM SDS und 1 mM Dopamin inkubiert. Versuche ohne Vorinkubation in schwarz, Versuche mit Vorinkubation in grau. Die Bedingungen der Vorinkubation entsprechen denen aus Abbildung 59. Die Farbentwicklung bei 475 nm wurde für 12 min beobachtet.

circa 20 min in eine stationäre Phase eintritt und nach 30 min mit Absorptionswerten von 0,035 endet. Mit Mg^{2+} nimmt die Kurve einen linearen Verlauf und endet nach 30 min bei einer Absorption von 0,18. Die Charakteristik der Kurven ist damit identisch mit denen des nativen Oligomers. Versuche zur Cresolase-Aktivität wurden nicht durchgeführt, da bereits bei nicht vorinkubiertem Hämocyanin-Dimer *bc* keine Monophenolhydroxylase-Aktivität mit Tyraminumsatz festgestellt werden konnte.

Fazit

Abgesehen von dem Laborartefakt des Auseinanderfallens in der nativen PAGE (Kapitel 3.1.8), stellt das Hämocyanin von *Pandinus imperator* ein relativ unverwundliches Protein dar. Obwohl es in seiner Stabilität bezüglich Temperatur oder Detergenzien noch von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin übertroffen wird, ist das aktive Zentrum widerstandsfähig genug, um auch nach langer Inkubation mit SDS einen Substratumsatz katalysieren zu können. In Bezug auf die Oxygenierung bleibt sowohl das Hämocyanin von *P. imperator* als auch das von *E. californicum* länger mit Sauerstoff beladen, wenn sich im Versuchsansatz kein MgCl_2 befindet. Obwohl dem bivalenten Kation Mg^{2+} eine Quartärstruktur-erhaltende Wirkung nachgewiesen werden konnte, wirkt es gegenteilig auf die Beladung und damit wahrscheinlich auf die Konformation des aktiven Zentrums.

Die untersuchten Cheliceraten-Hämocyanine reagieren während der Phase der Vorinkubation unterschiedlich stark auf MgCl_2 (Ausmaß der Deoxygenierung), und unterschiedlich stark

hinsichtlich der Stärke ihrer Diphenoloxidase-Aktivität. Die Kinetiken des Dopaminumsatzes nach Vorinkubation bei *P. imperator* und *E. californicum* nehmen eine identische Form an. Trotzdem ist die enzymatische Aktivität beim Hämocyanin von *P. imperator* mit Mg^{2+} schwächer als ohne Mg^{2+} , beim Hämocyanin von *E. californicum* ist sie stärker mit als ohne Mg^{2+} (Abbildung 114).

Beide Cheliceraten-Hämocyanin besitzen nur unter bestimmten Bedingungen Monophenolhydroxylase-Aktivität. Eine längere Inkubation in Tris-Puffer und dem Aktivator SDS ist nötig, damit ein Substratumsatz stattfinden kann. Nach einer überlangen Vorinkubation von 16,5 h ist jedoch keines der beiden Hämocyanine mehr zum Tyraminumsatz in der Lage. Dieses Ergebnis ist vor allem für das Vogelspinnen-Hämocyanin erstaunlich: Sein aktives Zentrum ist funktionell völlig intakt, es besitzt noch bis 100 % der ursprünglichen Oxygenierung. Eventuell ist es zu weiteren strukturellen Veränderung am Protein gekommen, die die enzymatische Aktivität verhindern, oder die Anwesenheit des Substrates schon während der Vorinkubation beziehungsweise "Verzögerungsphase" ist von Bedeutung.

3.8 Effektoren der enzymatischen Aktivität

Über die Phenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten ist wenig mehr bekannt als ihre Existenz. Lediglich die Diphenoloxidase-Aktivität von *Tachypleus tridentatus*-Hämocyanin wurde von Nagai et al. ^[66] auf einige Aktivatoren und Substratspezifität getestet; die Diphenoloxidase-Aktivität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin wurde im Rahmen der Dissertation von E. Jaenicke ^[114] hinsichtlich Substratspezifität, Inhibitoren und einiger Aktivatoren untersucht. Verschiedene Effektoren können die Arbeitsweise eines Enzyms beeinflussen und regulieren. Auch wenn es sich bei Hämocyanin nicht um das klassische Modellenzym handelt, kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass es sich wie ein solches verhält. Auch dieses Protein hat höchstwahrscheinlich ein pH-Optimum, Präferenzen in Bezug auf Puffer-Medium und Salz-Konzentration und besitzt vermutlich Bindungsstellen für allosterische Effektoren. Unter diesen Gesichtspunkten soll das Hämocyanin in diesem Kapitel untersucht werden. Eine umfassende Charakterisierung der Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* wird angestrebt.

3.8.1 Puffer

Der SDS-aktivierte Zustand des *Pandinus imperator*-Hämocyanins wurde hinsichtlich der Puffer-Abhängigkeit des Substratumsatzes genauer charakterisiert. Diese Untersuchung ist dahingehend relevant, dass beispielsweise in Phosphat-Puffer die Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins vollkommen unterdrückt wird, während die Puffersubstanz Tris als Effektor angesehen werden kann, der die Cresolase-Aktivität freigibt.

3.8.1.1 Vorversuche und elektrophoretische Untersuchungen

In Vorversuchen im Dot Blot (Daten nicht gezeigt) kann die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* in verschiedenen Puffer-Medien schnell untersucht werden. Der Test wurde mit den Substraten Dopamin (Diphenoloxidase) und Tyramin (Monophenolhydroxylase) durchgeführt. Das Hämocyanin wurde mit SDS aktiviert und mit MBTH und Puffer-Medium inkubiert. Als Nachteil bei diesem schnellen Test muss die Zugabe des Hämocyanins in relativ großen Volumina (50 % des Gesamtansatzes) angesehen werden. Daher ist die Puffersubstanz Tris, in der Hämocyanin standardmäßig gereinigt und gelagert wird, in einer Konzentration von 50 mM im Ansatz vorhanden. Dies erschwert natürlich eine genaue Aussage über die Pufferpräferenzen, ermöglicht jedoch in relativ kurzer Zeit einen Überblick.

Die Diphenoloxidase-Aktivität lässt sich bei beiden Hämocyaninen verlässlich in Phosphat-Puffer, Hepes-Puffer, Tris-Puffer, Tris-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , Tris-Puffer mit EDTA oder auch ungepuffert in Wasser induzieren.

Die Intensität und vor allem die Farbe der 'Dots' scheinen durch den Puffer beeinflusst zu werden. In Tris-Puffer mit je 20 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} wird das Substrat Dopamin zu einem pinkfarbenen Komplex umgesetzt. In den anderen Puffer-Medien reicht die Qualität der Färbung von rosa-beige bis dunkelbraun.

Im Dot Blot mit Tyramin kann für das Hämocyanin von *P. imperator* in den Puffer-Medien Tris und Hepes ein Tyraminumsatz gezeigt werden (Tabelle 26).

Auch in der nativen PAGE lässt sich für beide Cheliceraten-Hämocyane Catecholoxidase- und Cresolase-Aktivität nachweisen. Diphenoloxidase-Aktivität lässt sich in Eurypelma-Puffer, in 0,1 M Hepes und in Aqua dest. induzieren, die Monophenolhydroxylase-Aktivität in Eurypelma-Puffer und in 0,1 M Hepes-Puffer (Tabelle 26).

Auch hier ist wieder zu beobachten, dass Hämocyanin von *P. imperator* im nativen Gel zerfällt (beschrieben in den Kapiteln 3.1.4 und 3.1.8), und dass sich die 12-mere Hämocyanin-Bande bei der Untersuchung der Monophenolhydroxylase-Aktivität früher anfärben als die Bande des 24-mers (beschrieben in Kapitel 3.4.4, Abbildung 39).

Zu bemerken ist, dass sich während der Inkubation in Eurypelma-Puffer (enthält je 5 mM CaCl_2 und MgCl_2) nadelförmige Kristalle (aus Calciumdodecylsulfat, siehe Kapitel 3.8.3.2) in der Reaktionslösung ausbilden. Die Kristalle beeinflussen die Färbung nicht.

Puffer	Methode	<i>P. imperator</i>		<i>E. californicum</i>	
		MPO	DPO	MPO	DPO
Aqua dest.	Dot Blot	-	+	-	+
	Färbung im Gel	n.u.	+	n.u.	+
Phosphat	Dot Blot	-	+	-	+
	Färbung im Gel	-	+	-	+
Hepes	Dot Blot	+	+	-	+
	Färbung im Gel	+	+	+	+
Tris	Dot Blot	+	+	-	+
	Färbung im Gel	+	+	+	+
Tris mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	Dot Blot	-	+	-	+
	Färbung im Gel	+	+	+	+
Tris mit EDTA	Dot Blot	-	+	-	+

Tabelle 26: Puffersubstanzen als Effektoren der Phenoloxidase-Aktivität im Cheliceraten-Hämocyanin.

Abkürzungen: MPO Monophenolhydroxylase-Aktivität, DPO Diphenoloxidase-Aktivität, n.u. nicht untersucht, + Aktivierung, - keine Aktivierung.

3.8.1.2 Photometrische Untersuchungen

3.8.1.2.1 *Pandinus imperator*-Hämocyanin

In Abbildung 61 sind die Ergebnisse der photometrischen Untersuchungen zur Phenoloxidase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin in verschiedenen Puffer-Medien dargestellt. Für diese Experimente wurde Hämocyanin in 0,1 M Puffersubstanz inkubiert, die enzymatische Aktivität wurde mit dem Dopachom-Assay photometrisch verfolgt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Nachweis im Dot Blot oder in der nativen PAGE ist, dass der Puffer, in dem das Hämocyanin gelagert wurde, nur noch im μM -Bereich vorhanden ist. Weiterhin kann nicht nur das Endergebnis der Färbung aufgenommen, sondern der gesamte Reaktionsverlauf dokumentiert werden.

Bei der Catecholoxidase-Aktivität des *P. imperator*-Hämocyanins (Abbildung 61a) stellt sich Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 eindeutig als das zweckdienlichste Medium dar. Daher ist es auch nicht überraschend, dass die in der Literatur beschriebenen Tests auf Phenoloxidase-Aktivität tatsächlich in Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 ^[165] oder 7,1 ^[164] durchgeführt werden. Das Medium des zweitstärksten Dopaminumsatzes ist Tris-Puffer mit dem physiologischen pH-Wert von 7,8. Mäßige Umsatzraten werden in Hepes- und Phosphat-Puffer, beide pH 7,8, erreicht. Nur geringer Substratumsatz wird in Aqua dest. erreicht.

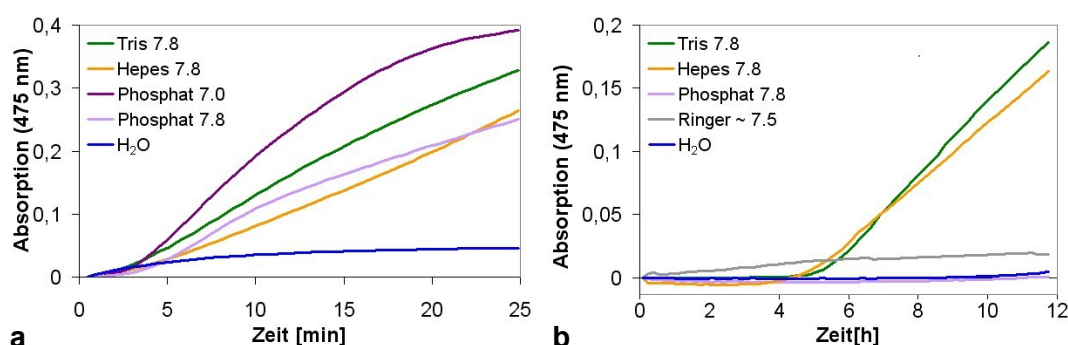


Abbildung 61: Abhängigkeit der Phenoloxidase-Aktivität des *Pandinus imperator*-Hämocyanins von verschiedenen Puffer-Medien.

Hämocyanin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS aktiviert und mit 1 mM Substrat in 0,1 M Pufferpuffersubstanz mit verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die Phenoloxidase-Aktivität wurde mit dem Dopachrom-Assay spektroskopisch bei 25°C verfolgt. Dargestellt ist die Absorptionszunahme bei 475 nm. Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Messungen.

a Diphenoloxidase-Aktivität mit Dopamin als Substrat. Für jeden Ansatz wurden in einem Abstand von 27 s iterativen Spektren von 300 nm bis 550 nm aufgenommen, aus denen dann eine Kinetik erstellt wurde. Die Autooxidation wurde abgezogen.

b Monophenolhydroxylase-Aktivität mit Tyramin als Substrat. Für diesen Versuch wurde in *Pandinus*-Ringer präpariertes Hämocyanin verwendet. Für jeden Ansatz wurden in einem Abstand von 5 min iterativen Spektren von 300 nm bis 550 nm aufgenommen, aus denen ebenfalls eine Kinetik erstellt wurde.

Bei den Messungen zur Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Puffer-Medium ist nicht nur die Rate des Substratumsatzes unterschiedlich, sondern auch die entstehende Farbe. Bei Inkubation in Tris-Puffer wird die zu Beginn farblose Dopamin-haltige Lösung durch die enzymatische Aktivität des Hämocyanins nach 25 min rötlich-braun. In Hepes-Puffer nimmt die Lösung eine blaugraue Farbe an, in Phosphat-Puffer wird sie graubraun. Lediglich bei Aqua dest. ist die Färbung zu gering, um sie mit dem bloßen Auge sehen zu können.

Zusätzlich zu der Puffer-Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität scheint es auch eine Präferenz bezüglich des pH-Wertes zu geben. Dieser Gesichtspunkt wird daher im nächsten Kapitel näher untersucht.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität zeigt ebenfalls eine eindeutige Abhängigkeit vom Puffer-Medium (Abbildung 61b). Diese Untersuchungen wurden mit Hämocyanin durchgeführt, das in physiologischer Ringer-Lösung gesammelt, gereinigt und aufbewahrt worden war. Eine eventuelle Bindung von Tris an die Proteinmatrix im Vorfeld, wie vom Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum* bekannt^[228], kann damit ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur Catecholoxidase-Aktivität ist in Phosphat-Puffer kein Umsatz des Monophenols Tyramin nachweisbar; die Reaktionslösung bleibt farblos und klar. Auch in Aqua dest. bleibt das Hämocyanin ohne enzymatische Aktivität. Bei Inkubation in Tris- oder Hepes-Puffer ist zunächst keine Reaktion zu beobachten. Nach fünf Stunden beginnt die enzymatische Aktivität mit Hydroxylierung und weiterem Umbau des Substrats Tyramin: Die Reaktionslösung färbt sich deutlich (und auch mit dem bloßen Auge sichtbar) ein.

Die vor wenigen Monaten veröffentlichte Aktivierung einer Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Octopus vulgaris* in Borat-Puffer^[198] kann mit Hämocyanin von *P. imperator* nicht wiederholt werden (Kapitel 3.3.2.4).

3.8.1.2.2 *Eurypelma californicum*-Hämocyanin

Die Catecholoxidase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanins (Abbildung 62) wurde ebenfalls auf ihre Puffer-Abhängigkeit untersucht. Sie soll hier mit der Diphenoloxidase-Aktivität des Skorpion-Hämocyanins verglichen werden.

Der Dopaminumsatz des Hämocyanins ist wie auch schon bei *P. imperator*-Hämocyanin in Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 am stärksten. Der nächststärkere Umsatz findet in Aqua dest. und in Phosphat-Puffer pH 7,8 statt. Mäßige Umsatzraten werden in Hepes- und Tris-Puffer (beide pH 7,8) erreicht.

Auch hier existiert zusätzlich zu der Puffer-Abhängigkeit eine Bevorzugung des neutralen pH-Wertes.

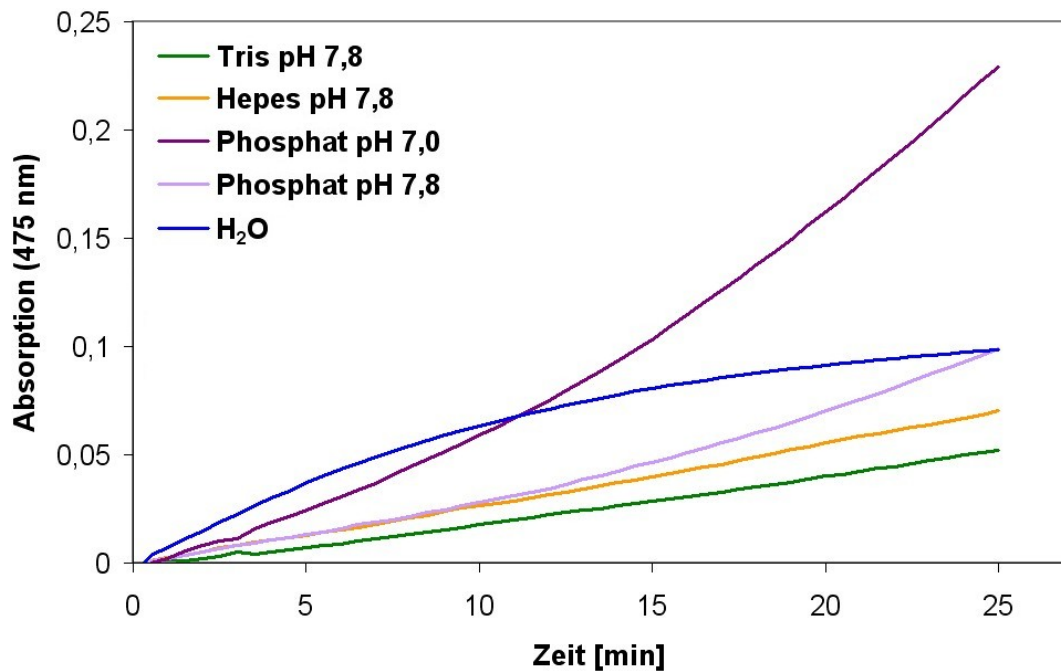


Abbildung 62: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des *Eurypelma californicum*-Hämocyanins von verschiedenen Puffer-Medien.

Hämocyanin von in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS aktiviert und mit 1 mM Dopamin in 0,1 M Puffersubstanz mit verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die Phenoloxidase-Aktivität wurde mit dem Dopachrom-Assay spektroskopisch bei 25°C verfolgt. Dargestellt ist die Absorptionszunahme bei 475 nm, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen. Die Autooxidation wurde abgezogen.

Wiederholung dieser Versuche mit den isolierten Untereinheiten *b* und *c* (Abbildung 60) zeigen den besten Dopaminumsatz ebenfalls in Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0. Etwas schwächer, ansonsten jedoch vergleichbar ist die enzymatische Aktivität mit Phosphat-Puffer pH 7,8. In Tris-Puffer pH 7,8 beginnt die Aktivität schneller und stärker, flacht dann aber auch wieder früher ab und hat nach 25 min eine etwas schwächere Absorption als in Phosphat-Puffer.

Eine weitere Modifikation im Puffer-Medium wie die Zugabe von MgCl_2 (das beispielsweise in Eurypelma-Puffer in einer Konzentration von 5 mM vorliegt) führt zu einer Steigerung des Substratumsatzes. Aus diesem Grund wurde auch die Auswirkungen verschiedener Metallkationen auf die enzymatische Aktivität (Kapitel 3.8.3) untersucht.

3.8.2 pH-Wert

Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, existiert bei der Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins außer einer Puffer-Abhängigkeit auch eine pH-Präferenz. Daher wurde der Zusammenhang zwischen der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus*

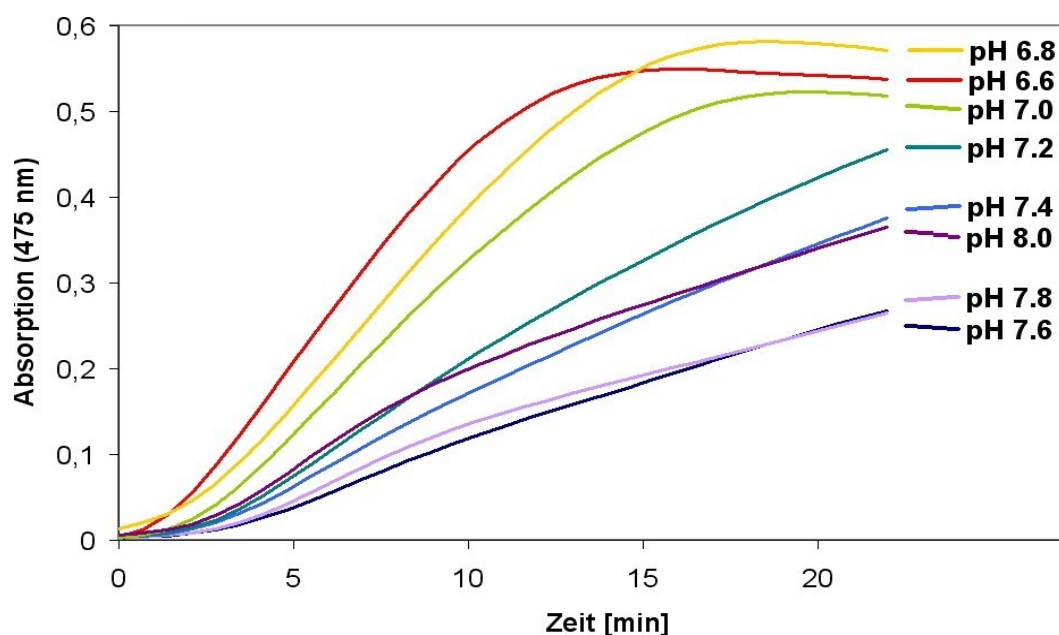


Abbildung 63: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* vom pH-Wert.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Phosphat-Puffer mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 22 min statt. Die Autooxidation des Dopamins wurde ebenfalls bei den verschiedenen pH-Werten aufgenommen und vom Messwert abgezogen.

imperator und dem pH-Wert näher untersucht. Aufgrund der optimalen Umsatzraten in 0,1 M Phosphat-Puffer (Abbildung 61a) wurde die Reaktion in eben diesem Puffer mit pH-Werten zwischen 6,6 und 8,0 durchgeführt. Die enzymatische Aktivität wurde mit dem Dopachom-Assay photometrisch verfolgt.

Wie in Abbildung 63 zu sehen, ist die Aktivität bei Werten wie 7,6 oder dem physiologischen pH-Wert von 7,8 relativ schwach. Bei einem Vergleich der maximalen Steigung über einen Zeitraum von 4,1 min (Abbildung 64) zeigt sich in der Tat eine mit steigendem pH abnehmende Aktivität und ein Aktivitätsminimum in der Reaktionslösung mit pH-Wert 7,6. Weiter zunehmende Basizität führt wieder zu einer Zunahme der Catecholoxidase-Aktivität im untersuchten pH-Bereich.

In Bereichen oberhalb von pH 8,0 puffert Phosphat nicht mehr. Für eine Vergrößerung des zu untersuchenden pH-Spektrums hätte das Puffer-Medium gewechselt werden müssen. Da die enzymatische Aktivität aber neben dem pH-Wert auch von diesem Medium beeinflusst wird, wurde auf eine Ausweitung dieser Experimente verzichtet.

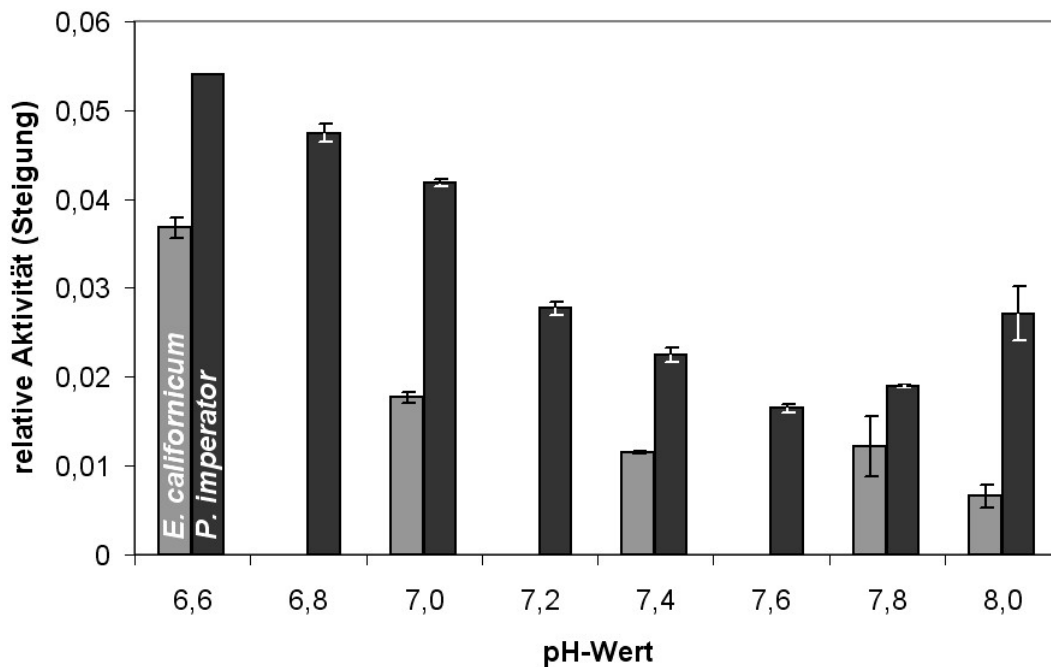


Abbildung 64: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* vom pH-Wert.

Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen pH-Werten in Phosphat-Puffer wurde anhand der maximalen Steigung über einen Zeitraum von 4,1 min errechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte von zwei bis drei Messungen und der Fehler des Mittelwertes. Versuchsbedingungen siehe Legende Abbildung 63.

Vergleich mit *Eurypelma californicum*-Hämocyanin

Bei *E. californicum*-Hämocyanin stellt sich bei gleichen Versuchsbedingungen das enzymatische Verhalten recht ähnlich dar (Abbildung 64). Auch hier hat die Diphenoloxidase-Aktivität die beste Umsatzrate bei einem pH-Wert von 6,6. Die Aktivität nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Ebenso ist der Dopaminumstz des Hämocyanin-Dimers *bc* in 0,1 M Tris-Puffer mit 30 mM MgCl₂ bei einem pH-Wert von 7,8 circa 1,7 mal stärker als bei einem pH-Wert von 7,0 (Abbildung 60).

Vergleich mit Mushroom-Tyrosinase

Als zweite Gegenüberstellung wurde die enzymatische Aktivität des Hämocyanins mit einer echten Phenoloxidase anhand Mushroom-Tyrosinase verglichen (Abbildung 65).

Die Phenoloxidase-Aktivität der Mushroom-Tyrosinase in einer Endkonzentration von 22,66 Units/ml wurde in verschiedenen Puffern mit dem Substrat Tyramin bei 25°C spektroskopisch gemessen. Die Puffer bestanden aus Phosphat (88 mM) oder Tris (78 mM), mit den pH-Werten 7,0 oder 7,8.

In Tris-Puffer ist bei diesem pH-Unterschied kaum wesentliche Veränderung in der Aktivität zu sehen. Wird der Versuch in Phosphat-Puffer durchgeführt, ist der Tyraminumsatz bei einem pH-Wert von 7,8 höher als bei einem neutralen Wert. Die 'echte' Phenoloxidase verhält sich bezüglich ihrer pH-Präferenz hier also gegensätzlich zum Cheliceraten-Hämocyanin.

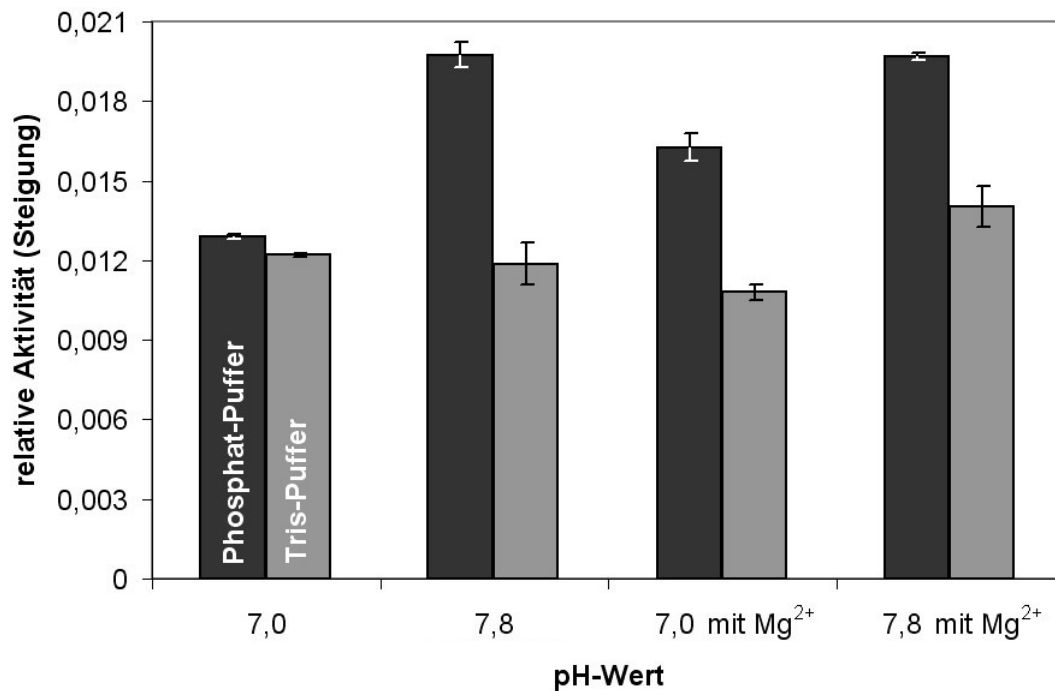


Abbildung 65: Enzymatische Aktivität der Mushroom-Tyrosinase unter verschiedenen Bedingungen.

Die Phenoloxidase-Aktivität von Mushroom-Tyrosinase in einer Endkonzentration von 22,66 Units/ml (11 µg/ml) wurde in verschiedenen Puffern mit dem Substrat Tyramin bei 25°C spektroskopisch gemessen. Die Puffer bestehen aus Phosphat (88 mM) oder Tris (78 mM), pH-Werte 7,0 oder 7,8.

Die Aktivität der Tyrosinase wurde anhand der maximalen Steigung über einen Zeitraum von 4 min errechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte von zwei bis drei Messungen und der Fehler des Mittelwertes.

Der Substratumsatz der Mushroom-Tyrosinase kann auch in Abhängigkeit vom gewählten Puffer untersucht werden. Damit dient die Mushroom-Tyrosinase als weiteres Vergleichsprotein für die in Kapitel 3.8.1.2 beschriebenen Experimente. Es kann festgestellt werden, dass hinsichtlich des Tyraminumsatzes Phosphat-Puffer bevorzugt wird.

In Bezug auf MgCl₂ zeigt die Mushroom-Tyrosinase unterschiedliche Reaktionen auf die Stärke der Aktivität; hinsichtlich des Substratumsatzes bildet sich kein eindeutiger Effekt heraus.

3.8.3 Metallionen

Der Substratumsatz von SDS-aktiviertem *Pandinus imperator*-Hämocyanin wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Metallkationen untersucht. Die Phenoloxidase-Aktivität wurde mit der anderer Cheliceraten-Hämocyanine verglichen.

Diese Abhängigkeit wurde in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS als Aktivator und 1 mM Substrat bei 25°C untersucht. In Experimenten zur Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde Tyramin, bei der Diphenoloxidase-Aktivität Dopamin als Substrat verwendet; die Au-

tooxidation des Dopamins wurde ebenfalls mit verschiedenen Salz-Konzentrationen aufgenommen und vom eigentlichen Messwert abgezogen. Nach Vorversuchen wurde die eingesetzte Hämocyanin-Menge auf Konzentrationen zwischen 0,1 mg/ml und 0,4 mg/ml eingestellt. Die Metallionen wurden in Form von Chloridsalzen zugegeben.

Eingesetzt wurde immer in Pandinus- beziehungsweise in Eurypelma-Puffer gelagertes Hämocyanin. Die so in die Reaktionslösung eingeschleppten Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen liegen in ihren Konzentrationen unterhalb von 0,1 mM. Andere Fremdionen wurden durch die Verwendung von destilliertem Wasser vermieden. Falls vorhanden, bliebe die Konzentration der Fremdionen immer gleich, und die beobachteten Effekte wären dennoch auf die neu zugeetzten Ionen zurückzuführen.

Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 2.18.2 (Auswertung der Aktivierungskinetiken von Hämocyanin) beschrieben.

3.8.3.1 Einfluss von Magnesium auf die Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin

Die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen in der Cheliceraten-Hämolymphe *in vivo* wird mit Werten zwischen 1 mM und 25 mM angegeben ^[31]. Untersuchung der Hämolymphe von vier Individuen *P. imperator* mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie ergibt einen Gehalt von 30 mg/l Magnesium, dies entspricht etwa 1,24 mM Mg^{2+} . Diese Untersuchung wurde freundlicherweise am Institut für Analytische Chemie und Anorganische Chemie (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

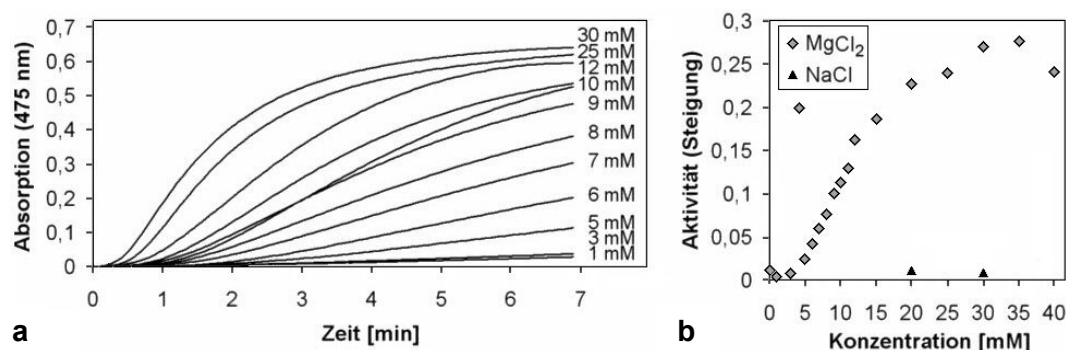


Abbildung 66: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* von der Magnesium-Konzentration.

a Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,1 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Zusätzlich wurde die Aktivität bei 20 mM NaCl und 30 mM NaCl untersucht. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei Messungen; der Fehler des Mittelwertes ist gering und wird in den meisten Fällen vom Datenpunkt überdeckt.

tooxidation des Dopamins wurde ebenfalls mit verschiedenen Salz-Konzentrationen aufgenommen und vom eigentlichen Messwert abgezogen. Nach Vorversuchen wurde die eingesetzte Hämocyanin-Menge auf Konzentrationen zwischen 0,1 mg/ml und 0,4 mg/ml eingestellt. Die Metallionen wurden in Form von Chloridsalzen zugegeben.

Eingesetzt wurde immer in Pandinus- beziehungsweise in Eurypelma-Puffer gelagertes Hämocyanin. Die so in die Reaktionslösung eingeschleppten Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen liegen in ihren Konzentrationen unterhalb von 0,1 mM. Andere Fremdionen wurden durch die Verwendung von destilliertem Wasser vermieden. Falls vorhanden, bliebe die Konzentration der Fremdionen immer gleich, und die beobachteten Effekte wären dennoch auf die neu zugesetzten Ionen zurückzuführen.

Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 2.18.2 (Auswertung der Aktivierungskinetiken von Hämocyanin) beschrieben.

3.8.3.1 Einfluss von Magnesium auf die Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin

Die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen in der Cheliceraten-Hämolymphe *in vivo* wird mit Werten zwischen 1 mM und 25 mM angegeben ^[31]. Untersuchung der Hämolymphe von vier Individuen *P. imperator* mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie ergibt einen Gehalt von 30 mg/l Magnesium, dies entspricht etwa 1,24 mM Mg^{2+} . Diese Untersuchung wurde freundlicherweise am Institut für Analytische Chemie und Anorganische Chemie (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

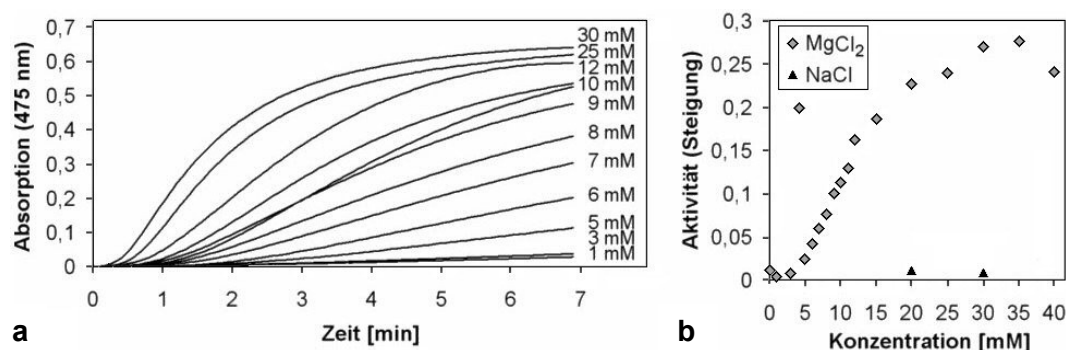


Abbildung 66: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* von der Magnesium-Konzentration.

a Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,1 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Zusätzlich wurde die Aktivität bei 20 mM NaCl und 30 mM NaCl untersucht. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei Messungen; der Fehler des Mittelwertes ist gering und wird in den meisten Fällen vom Datenpunkt überdeckt.

Magnesium kann als allosterischer Effektor die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen [2, 229]. Bei dem 24-meren Hämocyanin der Crustacee *Callinassa californiensis* werden zwei verschiedene Arten von Bindungsstellen beschrieben, an die Mg^{2+} (kompetitiv mit H^+) binden kann [229].

Die Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des *P. imperator*-Hämocyanins von der Magnesium-Konzentration wurde mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm über einen Zeitraum von 7 min verfolgt.

Wie in Abbildung 66a zu sehen, ist die Diphenoloxidase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit geringen Mengen an Mg^{2+} relativ schwach. Bei 1 mM bis 8 mM Mg^{2+} nimmt die Absorption linear mit der Zeit zu. Mit mehr Mg^{2+} sich im Ansatz beschleunigt sich die Färbereaktion weiter; die Kurve nimmt eine andere Form an, die Absorption nähert sich bei Werten von circa 0,64 einem stabilen Plateau.

Zusätzliche Versuche mit NaCl zeigen, dass tatsächlich Mg^{2+} und nicht Cl^- das ausschlaggebende Metallion ist (Abbildung 66b).

Aus den Ausgangsdaten der Kinetik wurde die Steigung für Intervalle von 3 s berechnet. Für das Zeitintervall ± 30 s um den Zeitpunkt der maximalen Steigung wurde eine lineare Trendlinie angelegt, deren Steigung den Wert für die enzymatische Aktivität wiedergibt. Aus diesen Werten kann ein Graph mit der enzymatischen Aktivität gegen die Mg^{2+} -Konzentration aufgetragen werden (Abbildung 66b). Es wird ersichtlich, dass eine Steigerung der Mg^{2+} -Menge bis zu einer Konzentration von 35 mM die Diphenoloxidase-Aktivität zunehmen lässt.

Aus empirischen Berechnung für $Mg(ClO_4)_2$ nach [175] (Kapitel 2.24) zur kritischen micellären Konzentration CMC ergibt sich, dass 2 mM SDS ab einer Konzentration von circa 2,4 mM Mg^{2+} in Micellen vorliegt (Abbildung 67). Der Zusammenhang der Aktivierungskurve von der SDS-Konzentration (Abbildung 66b) ist durch die deutliche Aktivitätszunahme oberhalb der CMC zu erkennen.

Die Abhängigkeit der Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins von *P. imperator* von der Magnesium-Konzentration wurde analog der Diphenoloxidase-Aktivität untersucht. Hämocyanin mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen inkubiert und die Melaninbildung mit dem Dopachom-Assay über einen Zeitraum von fünfzehn Stunden verfolgt.

Wie in Abbildung 68 zu sehen, findet ohne $MgCl_2$ ein deutlicher Tyraminumsatz statt. Er ist stark genug, um ihn auch mit dem bloßen Auge zu erkennen (Braunfärbung in Abbildung 42). Bei Zugabe von $MgCl_2$ kommt es zu mehreren Veränderungen in der Reaktionskinetik: Erstens nimmt die Intensität der Färbung stark ab. Steigerung der Mg^{2+} -Konzentration um je 10 mM führt zu einer Abnahme der Absorption auf nur noch 60 % des vorhergehenden Messwertes. Zweitens verkürzt sich mit ansteigender Mg^{2+} -Konzentration die Zeit, die benötigt wird, um in der Kinetik eine Plateauphase zu erreichen, in der die Absorption der Probe

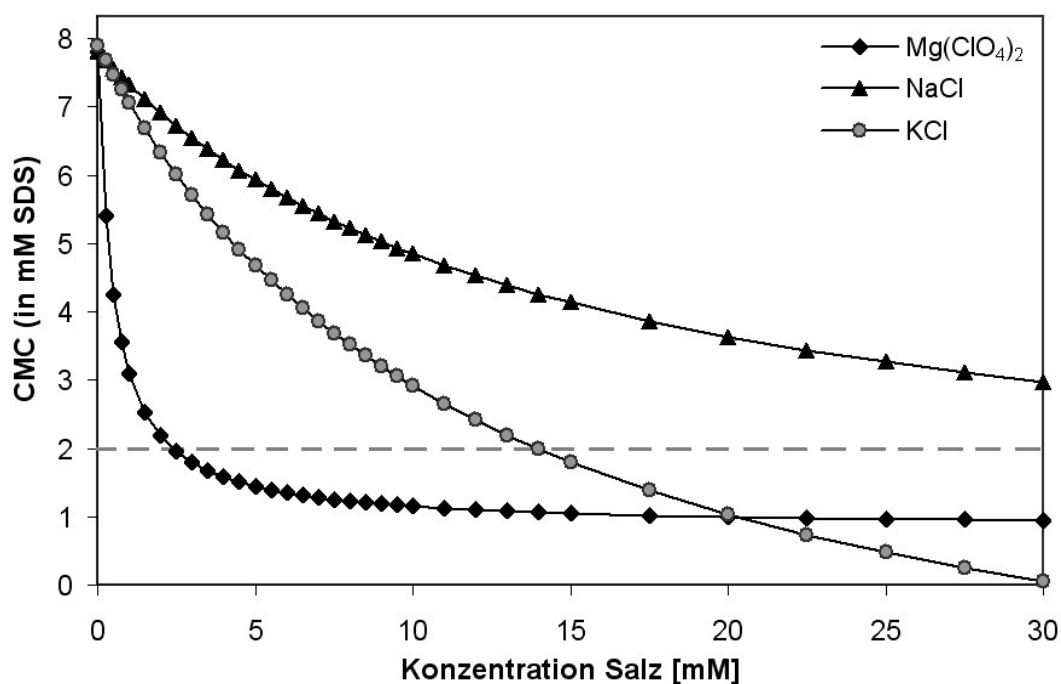


Abbildung 67: Berechnung der kritischen micellären Konzentration CMC an SDS in Abhängigkeit von verschiedenen Metallsalzen.

Berechnung der CMC nach ^[175] (Kapitel 2.24) mit $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, NaCl und KCl. Durchbrochene Linie: in dieser Arbeit zur Aktivierung verwendete Konzentration von 2 mM SDS.

also nicht mehr zunimmt, sondern konstant bleibt. Dies muss damit begründet werden, dass die zunehmende Mg^{2+} -Konzentration die Reaktion schneller beginnen lässt und die Kinetik eine stärkere Steigung bekommt. Als Drittes ist zu beobachten, dass eine Erhöhung der Mg^{2+} -Menge zu einer Vorverlegung des Reaktionsbeginns führt und damit die "Verzögerungsphase" (Phase ohne Substratumsatz) verkürzt. Die Cresolase-Aktivität des Skorpion-Hämocyanins ist demzufolge genauso wie die Catecholoxidase-Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig, jedoch mit umgekehrter Proportionalität. MgCl_2 verstärkt die Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins, bei der Monophenolhydroxylase-Aktivität führt es zu einer Verkürzung der "Verzögerungsphase", vermindert jedoch die Gesamtaktivität (Stärke der Färbung).

Sowohl die Versuche zur Catecholoxidase- als auch die zur Cresolase-Aktivität konnten mit der gleichen Charge *P. imperator*-Hämocyanin durchgeführt werden. Damit können beide enzymatischen Aktivitäten miteinander verglichen werden. Bei Betrachtung der Graphen der Ansätze mit 10 mM MgCl_2 (Abbildung 66 und Abbildung 68, als Beispiel für mittelstark gehemmte beziehungsweise geförderte Aktivität) kann festgestellt werden, dass beide Kinetiken einen ähnlichen Verlauf annehmen. Die Kurve der Cresolase-Aktivität zeichnet sich zwar durch eine lange "Verzögerungsphase" aus, nach Reaktionsbeginn nehmen beide einen annähernd sigmoidalen Verlauf mit langer Plateauphase.

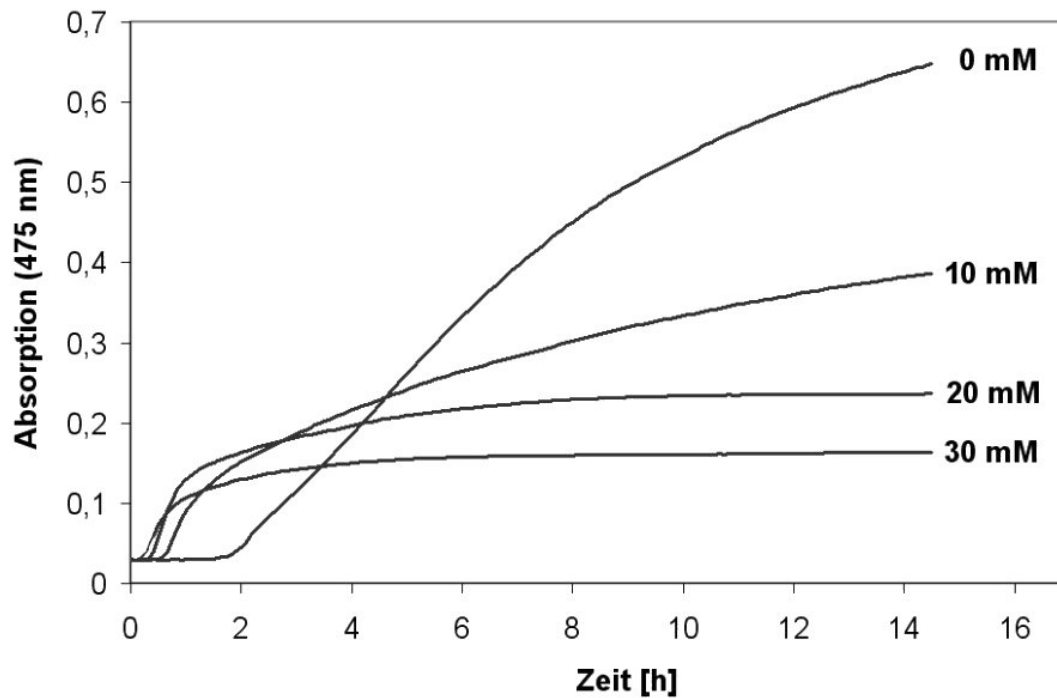


Abbildung 68: Abhängigkeit der Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* von der Magnesium-Konzentration

Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen inkubiert und die Monophenolhydroxylase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. (Mittelwerte aus je zwei Werten.) Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Tyramin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 15 h statt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

3.8.3.2 Einfluss von Calcium auf die Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin

Untersuchung der Hämolymphe von vier Individuen *Pandinus imperator* mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie ergibt einen Calciumgehalt von 180 mg/l, dies entspricht circa 4,5 mM in der Hämolymphe. Bei der Spinne *Eurypelma californicum* wird in der Hämolymphe eine Konzentration von 4 mM für Ca^{2+} gemessen ^[31]. Der Calciumgehalt von *E. californicum*- und *P. imperator*-Hämolymphe ist damit vergleichbar.

Die bivalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} stabilisieren die Quartärstruktur der Hämocyanine und beeinflussen ihr Sauerstoffbindungsverhalten durch Vermittlung zwischen den Hexameren ^[2, 229]. Bei dem Hämocyanin von *Callinassa californiensis* beispielsweise werden acht Bindungsstellen für Ca^{2+} beschrieben ^[229].

Aufgrund dieser Eigenschaften und im Anbetracht der starken Wirkung, die Mg^{2+} auf die enzymatische Aktivität von Hämocyanin hat, wäre es von großem Interesse gewesen, den Einfluss von Ca^{2+} , dem nächstschwereren Metall der gleichen Hauptgruppe als weiteres ebenfalls zweifach positiv geladenes Kation zu untersuchen.

Allerdings wird die Löslichkeit von SDS (Natriumdodecylsulfat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) in Anwesenheit von Ca^{2+} durch das Löslichkeitsprodukt von Calciumdodecylsulfat bestimmt. Das

anionische Detergens SDS kann in der Form von Kalkseife $\text{Ca}(\text{DS})_2$ ausfallen. Die Löslichkeit von $\text{Ca}(\text{DS})_2$ nimmt mit steigenden Calcium-Konzentrationen ab (Abbildung 29) ^[195].

Dies führt dazu, dass bei den verwendeten Ca^{2+} - und SDS-Konzentrationen $\text{Ca}(\text{DS})_2$ in der Reaktionslösung ausfällt (Kapitel 3.3.2.1.3). Bei dem Versuch, die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Phenoloxidase-Aktivität photometrisch zu untersuchen, entsteht sofort ein weißes Präzipitat. Wie in Abbildung 29 zu erkennen, fällt Ca^{2+} bei einer SDS-Konzentration von 2 mM schon ab einer Menge von 1,1 mM aus. Unabhängig von der Form, in der das Calcium in die Lösung eingebracht wird (CaCl_2 , CaSO_4), entsteht das Fällungsprodukt $\text{Ca}(\text{DS})_2$. Durch das ausfallende $\text{Ca}(\text{DS})_2$ kann weder die SDS- noch die Ca^{2+} -Konzentration konstant gehalten oder genau bestimmt werden. Analoge Versuche zur Ca^{2+} -Abhängigkeit wie zu denen mit Mg^{2+} können daher nicht durchgeführt werden.

Die Phenoloxidase-Aktivität selbst wird durch die Bildung von Kalkseife nicht behindert. Dies ist beim Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität nach nativer PAGE leicht festzustellen, da sich trotz des $\text{Ca}(\text{DS})_2$ -Films auf der Reaktionslösung im Gel deutliche Banden anfärben (Abbildung 36).

3.8.3.3 Einfluss von Natrium und Kalium auf *P. imperator*-Hämocyanin

Neben den Wirkungen von zweiwertigen Kationen wurden auch die Effekte monovalenter in der Hämolymphe vorkommenden Kationen auf die enzymatische Aktivität des Hämocyanins betrachtet.

Die Phenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin in Abhängigkeit von Kationen wie Na^+ oder K^+ wurde entsprechend den Versuchen mit MgCl_2 (Kapitel 3.8.3.1) durchgeführt. Der Substratumsatz von Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml für die Diphenoloxidase- beziehungsweise 0,1 mg/ml für die Monophenolhydroxylase-Aktivität wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen NaCl und KCl photometrisch verfolgt.

Die Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin ist, im Gegensatz zu dem zweiwertigen Metall-Ion Mg^{2+} , nicht von monovalenten Kationen wie Na^+ oder K^+ abhängig (Abbildung 69). Damit ist zugleich belegt, dass tatsächlich das Kation Mg^{2+} (Kapitel 3.8.3.1) für den veränderten Substratumsatz verantwortlich ist, und nicht das Gegenion Chlorid.

Da diese Versuche mit einer anderen Hämocyanin-Charge als die Versuche zur Mg^{2+} -Abhängigkeit durchgeführt wurden, können sie nicht direkt quantitativ miteinander verglichen werden. Trotzdem bleiben die Absorptionswerte der Ansätze mit NaCl und KCl bei Salzzugabe weit unterhalb den Absorptionswerten, die beim Dopaminumsatz mit MgCl_2 erreicht werden. Während nach sieben Minuten Reaktionszeit die Absorptionswerte der Ansätze mit 0 mM K^+ beziehungsweise Na^+ nur etwa 12 % unter dem von 0 mM Mg^{2+} liegen, ist der Dopaminumsatz mit 10 mM, 20 mM oder 30 mM Na^+ circa 45 % schwächer als mit nur 5 mM Mg^{2+} ; der Substratumsatz mit K^+ sogar etwa 50 % schwächer. Im Vergleich zu Mg^{2+}

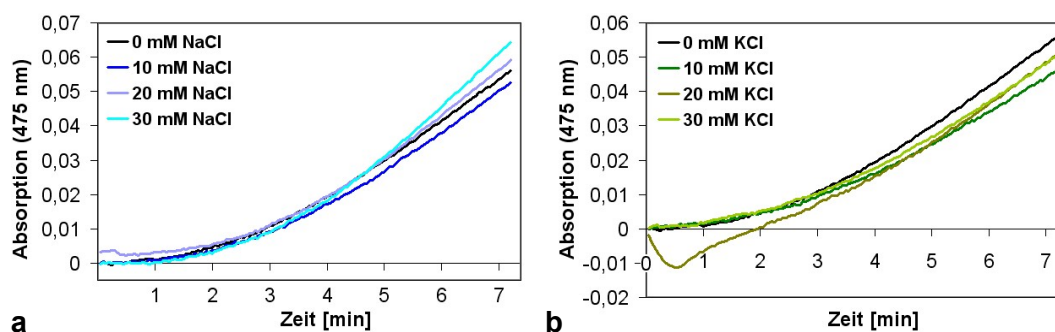


Abbildung 69: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* von der Natrium- und Kalium-Konzentration.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit unterschiedlichen Metallionen-Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachrom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,1 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

a Diphenoloxidase-Aktivität in Abhängigkeit von Na^+ .

b Diphenoloxidase-Aktivität in Abhängigkeit von K^+ .

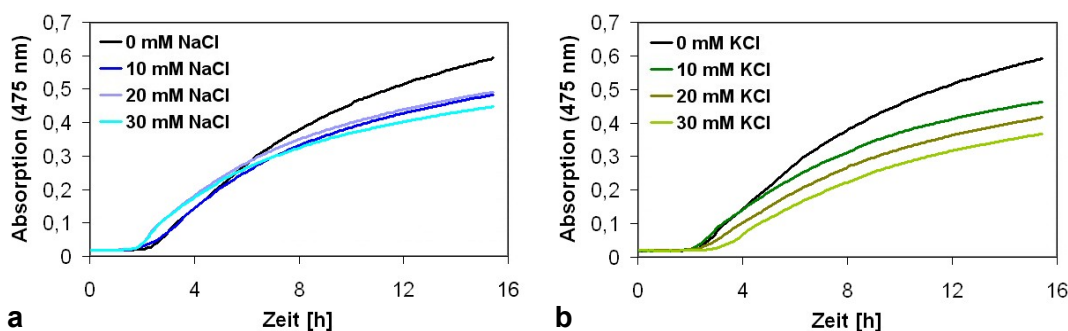


Abbildung 70: Abhängigkeit der Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins von *Pandinus imperator* von der Natrium- und Kalium-Konzentration.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde mit unterschiedlichen Metallionen-Konzentrationen inkubiert und die Monophenolhydroxylase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. (Mittelwert aus zwei bis drei Werten.) Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Tyramin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 16 h statt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

a Monophenolhydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von Na^+ .

b Monophenolhydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von K^+ .

haben Na^+ und K^+ nur wenig Wirkung auf die Aktivität. Auch Unterschiede in der Stärke des Substratumsatzes, die von der Na^+ beziehungsweise K^+ -Konzentration abhängen könnten, lassen sich nicht feststellen.

Für die beiden monovalenten Kationen Na^+ und K^+ liegt also bei der Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin keine Abhängigkeit vor; der enzymatische Umsatz wird weder gefördert noch gehemmt.

Wie in Abbildung 67 ersichtlich, liegt die zur Micellenbildung mit 2 mM SDS benötigte NaCl-Konzentration bei 64 mM. Bei den Untersuchungen zur Diphenoloxidase-Aktivität in Abhängigkeit von NaCl (Abbildung 69a) liegt SDS also immer als Einzelmolekül gelöst vor. Bei der Abhängigkeit von KCl (Abbildung 69b) bilden sich bei 10 mM KCl und 2 mM SDS Micellen, bei 20 mM und 30 mM KCl nicht. Trotzdem kann festgestellt werden, dass es hier keinerlei Auswirkungen auf die Diphenoloxidase-Aktivität von Skorpion-Hämocyanin hat, ob das SDS in Micellen oder als Einzelmolekül vorliegt.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin (Abbildung 70a) ist im Gegensatz zur Diphenoloxidase-Aktivität von der zugegebenen Menge NaCl abhängig. Der Tyraminumsatz wird durch Salzzugabe allgemein um etwa 16 % schwächer. Es ist keine Tendenz in Bezug auf die Menge des eingesetzten NaCl und die Stärke der Absorptions-Abschwächung zu erkennen.

KCl inhibiert die Monophenolhydroxylase-Aktivität ebenfalls (Abbildung 70b). Hier ist jedoch eine deutliche Beziehung zwischen der eingesetzten K^+ -Konzentration und der Inhibition des Substratumsatz festzustellen: Wie bei den Versuchen zur Monophenolhydroxylase-Aktivität mit Mg^{2+} ist der Tyraminumsatz in Abwesenheit von Kationen am stärksten. Je größer die Menge an zugegebenem K^+ ist, desto schwächer wird die Cresolase-Aktivität. Trotzdem ist der inhibierende Einfluß von K^+ nicht so stark wie der von Mg^{2+} . Obwohl das Hämocyanin bei den Versuchen aus unterschiedlichen Präparationen stammte, kann die hemmende Wirkung von $MgCl_2$ auf die Cresolase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin als doppelt so stark eingeschätzt werden wie die des KCl.

3.8.3.4 Phenoloxidase-Aktivität von *Limulus polyphemus*-Hämocyanin

Auch von einem zweiten altertümlichen Cheliceraten ist bekannt, dass sein Hämocyanin eine Diphenoloxidase-Aktivität besitzt. Das Hämocyanin von *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkrebs, wurde ebenfalls auf Phenoloxidase-Aktivität untersucht. Diese Versuche wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die vorangegangenen Experimente durchgeführt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml.

In Abbildung 71a ist, wie schon beim Skorpion-Hämocyanin, eine Abhängigkeit des Dopaminumsatzes von der eingesetzten $MgCl_2$ -Menge zu sehen. Je höher die Mg^{2+} -Konzentration ist, desto besser arbeitet die Catecholoxidase-Aktivität des Hämocyanins und umso stärker wird die Färbung. Anhand der Aktivierungs-Kinetik (Abbildung 71b) wird ersichtlich, dass die Aktivität gleichmäßig mit der Mg^{2+} -Konzentration zunimmt.

Nicht gezeigt sind die Daten für die Versuche mit NaCl und KCl. Mit den einwertigen Kationen ist die Catecholoxidase-Aktivität deutlich schwächer als mit $MgCl_2$. Im Vergleich mit Absorptionswerten des Dopaminumsatzes von *L. polyphemus*-Hämocyanin ohne Salzzusatz hat die Absorption mit 20 mM beziehungsweise 30 mM NaCl innerhalb von 7 min um 4 %

beziehungsweise um 15 % abgenommen. Mit 30 mM KCl nimmt der Dopaminumsatz um circa 26 % ab, mit 20 mM KCl dagegen um 83 % zu. ffff MgCl_2 dagegen führt in der gleichen Konzentration zu einem Absorptionsanstieg um das fünffache.

Mit NaCl und KCl ist die Aktivität damit nicht wesentlich stärker oder schwächer als die Aktivität ohne Ionen; es herrscht keine erkennbare Proportionalität vor. Von einer Abhängigkeit des Dopaminumsatzes bei *L. polyphemus*-Hämocyanin von NaCl oder KCl kann nicht ausgegangen werden.

Gleichzeitig wird auch hier belegt, dass das zweiwertige Kation Mg^{2+} und nicht das anionische Cl^- für die Steigerung der enzymatischen Aktivität verantwortlich ist.

Auf Experimente mit CaCl_2 wurde wegen des bereits beschriebenen ungünstigen Löslichkeitsproduktes von $\text{Ca}(\text{DS})_2$ verzichtet (Kapitel 3.8.3.2).

Die Existenz einer Monophenolhydroxylase-Aktivität kann beim Hämocyanin von *L. polyphemus* hier nicht mit Sicherheit festgestellt werden. in der nativen PAGE ist eine Anfärbung der Hämocyanin-Bande durch Cresolase-Aktivität nicht erkennbar. Spektren von *L. polyphemus*-Hämocyanin mit Tyramin zeigen nach zwölf Stunden eine sehr geringe Absorptionzunahme in der dritten Nachkommastelle. Eine durch SDS aktivierbare Monophenolhydroxylase beim Pfeilschwanzkrebs ist bei meinen Versuchen allenfalls rudimentär vorhanden.

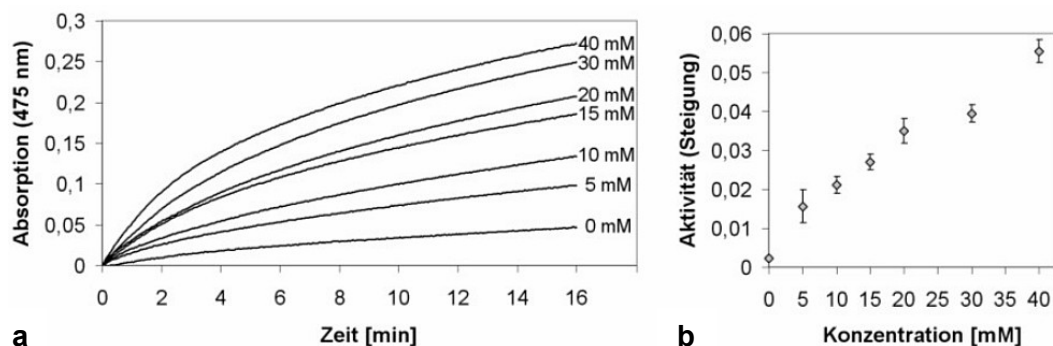


Abbildung 71: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* von der Magnesium-Konzentration.

a Hämocyanin von *L. polyphemus* wurde mit unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 16 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte von zwei bis fünf Messungen und der Fehler des Mittelwertes.

3.8.3.5 Phenoloxidase-Aktivität von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin

Ein Teil dieser Arbeit besteht darin, die Eigenschaften des Hämocyanins von *Pandinus imperator* mit denen von *Eurypelma californicum* zu vergleichen. Dies wurde bereits hinsichtlich Puffer- und pH-Präferenz erfüllt (Kapitel 3.8.1.2.2 und 3.8.2).

Eine detaillierte Beschreibung der Diphenoloxidase-Aktivität des Vogelspinnen-Hämocyanins in Bezug auf natürliche Modulatoren wie Ionen existiert nicht. Auch von der Monophenolhydroxylase-Aktivität ist bisher nur ihre Existenz bekannt. Um den Vergleich daher komplett zu machen, wird auch dieses Protein als drittes Cheliceraten-Hämocyanin auf die Abhängigkeit des Substratumsatzes von Metallionen wie MgCl_2 , NaCl und KCl untersucht. Auf Versuche mit CaCl_2 wurde verzichtet.

Diese Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen wie die vorangegangenen Versuche durchgeführt. Das Hämocyanin hatte eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml für die Messung der Diphenoloxidase- beziehungsweise 0,4 mg/ml bei den Tests auf Monophenolhydroxylase-Aktivität.

3.8.3.5.1 Magnesium bei der Phenoloxidase-Aktivität von *E. californicum*

In Abbildung 72a sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Diphenoloxidase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin mit MgCl_2 zu sehen. Ähnlich wie bei der Catecholoxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin sind bei geringen MgCl_2 -Mengen nur schwache Umsatzraten festzustellen. Während dies beim Skorpion-Hämocyanin für Konzentrationen bis 5 mM Mg^{2+} der Fall ist, bleibt die Aktivität von Spinnen-Hämocyanin bis 12 mM Mg^{2+} schwach. Bei Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen 12 mM und 15 mM sowie zwischen 17 mM und 20 mM nimmt die Aktivität plötzlich stark zu und erreicht mit Werten zwischen 30 mM Mg^{2+} und 40 mM Mg^{2+} ihre maximale Absorption (Abbildung 72b). Eine weitere Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration führt zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität.

Bei der Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin findet sich ein Bereich der MgCl_2 -Konzentration, bei der bereits eine geringfügige Erhöhung der Mg^{2+} -Menge für einen relativ starken Anstieg der enzymatischen Aktivität sorgt; dieser Bereich liegt beim Hämocyanin des Skorpions zwischen 5 mM und 12 mM Mg^{2+} , bei der Spinne zwischen 12 mM und 20 mM. Beim Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses scheinen bereits kleine Veränderungen der Mg^{2+} -Konzentration (Bereich zwischen 0 mM und 5 mM) zur größten Veränderung zu führen (Abbildung 71).

Die CMC für 2 mM SDS liegt bei circa 2,4 mM Mg^{2+} . Ein Zusammenhang der Aktivierungskurve von Spinnen-Hämocyanin mit diesem Wert besteht nicht.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin wurde ebenfalls untersucht. Die eingesetzte Hämocyanin-Konzentration war mit 0,4 mg/ml deutlich zu hoch ge-

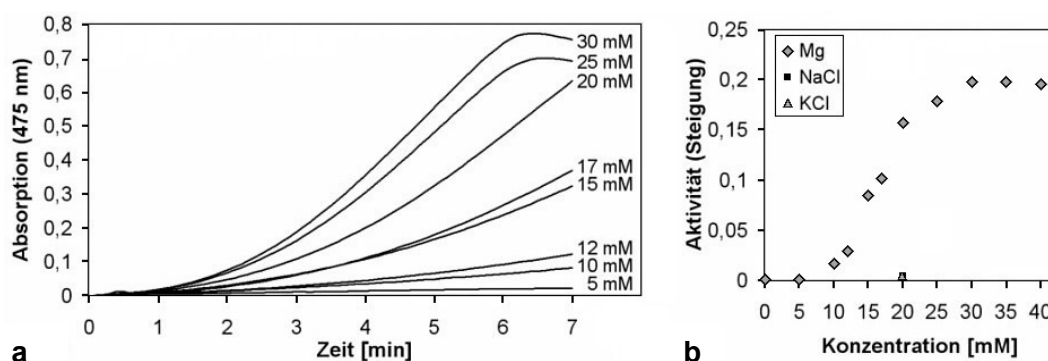


Abbildung 72: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* von der Magnesium-Konzentration.

a Hämocyanin von *E. californicum* wurde mit unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Zusätzlich wurde die Aktivität bei 20 mM NaCl und 20 mM KCl untersucht. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei Messungen. Der Fehler des Mittelwertes ist abgetragen, wird vom Datenpunkt überdeckt.

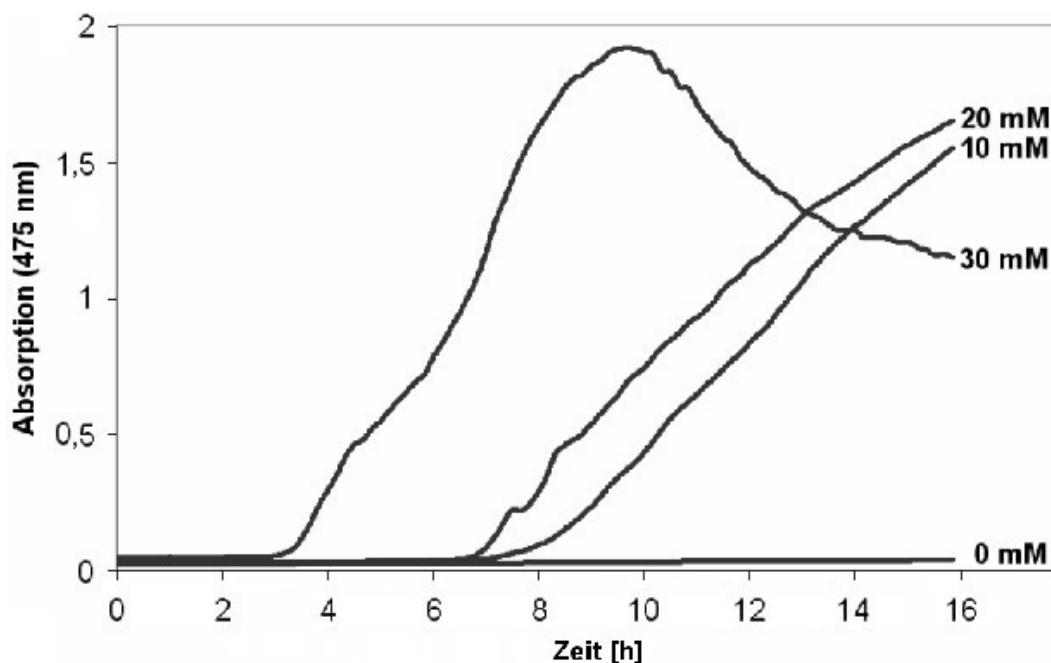


Abbildung 73: Abhängigkeit der Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* von der Magnesium-Konzentration

Hämocyanin von *E. californicum* wurde mit unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen inkubiert und die Monophenolhydroxylase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,4 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Tyramin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 16 h statt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

wählt, was die hohen Absorptionswerte in Abbildung 73 erklärt. Nichtsdestotrotz wird damit deutlich gezeigt, dass auch dieses Hämocyanin zweifellos eine Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzt, die ebenfalls von Mg^{2+} -abhängig ist. Auffällig an dieser Abbildung ist das Absinken der Absorption nach 10 h im Ansatz mit 30 mM Mg^{2+} : Dopachrom, dessen Entstehung photometrisch bei 475 nm verfolgt wird, ist in wässriger Lösung instabil und reagiert daher nichtenzymatisch weiter zu Melanin. Der Assay ist daher nur bedingt linear. (Zu dieser Absorptionsabnahme kommt es bei längerer Beobachtungszeit auch in anderen Ansätzen: siehe beispielsweise Abbildung 72a, Abbildung 78, Abbildung 79 oder Abbildung 82; siehe auch Kapitel 2.17.1.)

Im Gegensatz zu der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin nimmt bei *E. californicum* die enzymatische Aktivität mit der eingesetzten Mg^{2+} -Menge zu. Wie bei *P. imperator*-Hämocyanin verkürzt Mg^{2+} die "Verzögerungsphase" bis zum Beginn des Substratumsatzes. Zu weiteren Veränderungen in der Kinetik (beispielsweise Zunahme der Steigung) kommt es nicht. Der Effektor Mg^{2+} wirkt hier wahrscheinlich nur an der Einstellung einer zum Tyraminumsatz geeigneten Konformation mit, und hat keinen Einfluß mehr auf die enzymatische Aktivität selbst.

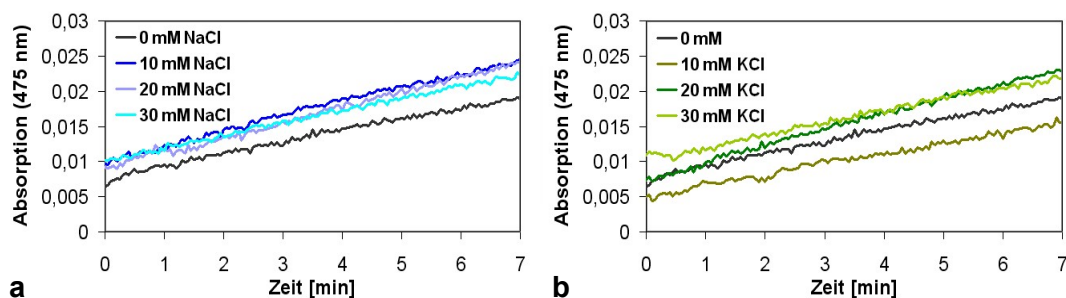


Abbildung 74: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* von der Natrium- und Kalium-Konzentration.

Hämocyanin von *E. californicum* wurde mit unterschiedlichen Metallionen-Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis sechs Messungen.

a Monophenolhydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von Na^+ .

b Monophenolhydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von K^+ .

3.8.3.5.2 Kalium und Natrium bei der Phenoloxidase-Aktivität von *E. californicum*

Neben der Mg^{2+} -Abhängigkeit von *E. californicum*-Hämocyanin wurde auch die Diphenoloxidase-Aktivität in Abhängigkeit von monovalenten Kationen wie Na^+ oder K^+ untersucht (Abbildung 74).

Im Gegensatz zu dem zweiwertigen Metall-Ion Mg^{2+} findet sich bei Reaktionsansätzen sowohl mit NaCl als auch mit KCl keine signifikante Absorptionsveränderung. Alle Kinetiken für den Dopaminumsatz bewegen sich unabhängig von der Menge der zugegebenen Metall-

kationen in einem ähnlichen Absorptionsbereich. Der enzymatische Umsatz wird weder gefördert noch gehemmt.

3.8.3.6 Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Untereinheiten

Die Auftrennung der Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin ist sehr zeitaufwendig und bringt als Ertrag nur wenige Milligramm der jeweiligen Untereinheit. Kinetische Untersuchungen an einzelnen, isolierten Untereinheiten konnten daher nicht durchgeführt werden. Es wurde stattdessen versucht, Experimente mit Dissoziat von Gesamt-Hämocyanin durchzuführen.

In der nativen PAGE lässt sich eine Catecholoxidase-Aktivität für die elektrophoretisch getrennten Untereinheiten des *P. imperator*-Hämocyanins nur dann nachweisen, wenn auf das Gel sehr große Proteinmengen ($> 60 \mu\text{g}$ Dissoziat pro Spur) aufgetragen werden. Alle Untereinheiten können das Substrat Dopamin mit schwacher Aktivität umsetzen (Abbildung 37). Bei photometrischen Untersuchungen dagegen konnte keine quantifizierbare enzymatische Aktivität festgestellt werden (eingesetzte Konzentration von *P. imperator*-Dissoziat bis $1,5 \text{ mg/ml}$).

Dementsprechend wurde auf Versuche zur Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität bei dissoziiertem Skorpion-Hämocyanin von Metallkationen verzichtet.

3.8.3.7 Diphenoloxidase-Aktivität von *E. californicum*-Untereinheiten

3.8.3.7.1 Hämocyanin-Dissoziat

Dissoziat von *E. californicum*-Hämocyanin setzt Dopamin gut um; Mg^{2+} verstärkt den Substratumsatz (Abbildung 75a). Mg^{2+} -Konzentrationen bis 15 mM führen zu einer proportionalen Verstärkung der enzymatischen Aktivität, danach pendelt sie sich bei 30 mM MgCl_2 auf eine Aktivität von circa $0,15$ ein. Eine Abhängigkeit der Aktivität des Hämocyanin-Dissoziates von der Magnesium-Konzentration ist kaum vorhanden (Abbildung 75b). Eventuell spielt Mg^{2+} als allosterischer Effektor nur beim Gesamtmolekül eine Rolle.

Die Form der Substratumsatzkurve unterscheidet sich beim Dissoziat von der des nativen *E. californicum*-Hämocyanins (Abbildung 72a). Im Fall des 24-mers beginnt der Graph nur langsam zu steigen, bis er nach etwa 6 min ein Maximum erreicht und wieder abfällt. Im Gegensatz dazu beginnt der Dopaminumsatz bei dem Untereinheiten-Gemisch sofort und strebt nach 3 min bis 4 min einer Plateauphase entgegen. Diese Unterschiede in der Kinetik lassen Rückschlüsse auf den Aktivierungsmechanismus zu. Im 24-mer ist die Quartärstruktur intakt und die Untereinheiten *b* und *c* sind im Zentrum des Proteins fest eingebunden, während das SDS beim Dissoziat leichten Zugang zu dem enzymatisch aktiven Dimer hat. Die Aktivierung kann damit viel schneller erfolgen.

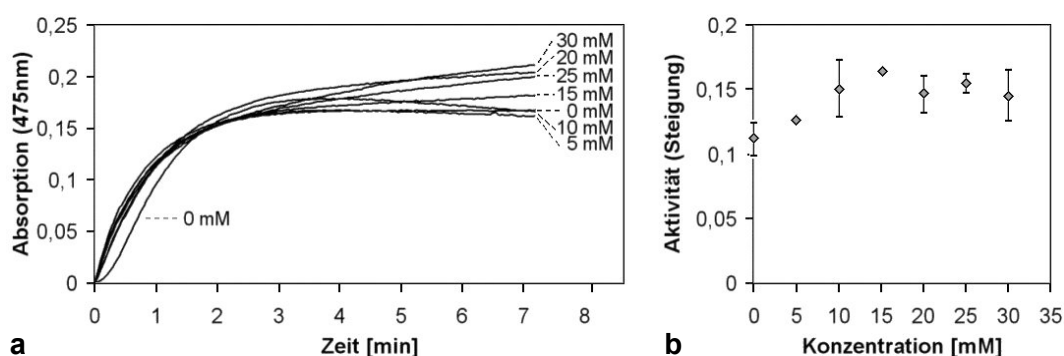


Abbildung 75: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanin-Dissoziates von *Eurypelma californicum* von der Magnesium-Konzentration.

a Hämocyanin von *E. californicum* wurde in seine Untereinheiten dissoziiert und mit unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen inkubiert. Die Diphenoloxidase-Aktivität wurde mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Da sich das Hämocyanin-Dissoziat in EDTA-haltigem Dissoziierungspuffer (0,05 M Glycin, 5 mM EDTA, pH 9,6) befindet, ist die reale MgCl_2 -Konzentration in jedem Ansatz um etwa 1 mM niedriger als angegeben. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen; der Fehler des Mittelwertes ist ebenfalls abgetragen.

3.8.3.7.2 Hämocyanin-Dimer *bc*

Die Wirkung von MgCl_2 auf die Diphenoloxidase-Aktivität von einzelnen Hämocyanin-Untereinheiten (Konzentration 0,2 mg/ml) wurde bei gleichen Versuchsbedingungen anhand der isolierten Untereinheiten *e*, *agf* und des Dimers *bc* untersucht. (Der Tyraminumsatz von *E. californicum*-Dimer *bc* wurde nicht untersucht.)

Wie erwartet sind die Untereinheiten *agf* nicht zu enzymatischer Aktivität fähig. Auch Untereinheit *e* kann kein Dopamin umsetzen. Das Monomer fällt im Reaktionsansatz sogar relativ schnell aus, der Aktivator SDS wirkt hier nur noch denaturierend.

Das Untereinheiten-Dimer *bc* besitzt wie in der Literatur beschrieben^[65] Catecholoxidase-Aktivität (Abbildung 76a). Die Kinetik des Substratumsatzes entspricht erwartungsgemäß in seiner Form der des Untereinheiten-Gemischs in Abbildung 75a. Unterschiedliche Absolutwerte in der Intensität der Färbung und Absorptionswerte sind auf unterschiedliche Hämocyanin-Chargen zurückzuführen. Weiterhin tragen in Abbildung 76a alle Untereinheiten im Ansatz zur enzymatischen Aktivität bei, während bei dem Versuch mit Hämocyanin-Dissoziat in Abbildung 75a nur ein Sechstel der eingesetzten Untereinheiten als Enzym wirken.

Die Form der Substratumsatzkurven ist identisch mit denen des Dissoziats: Er beginnt sofort und strebt eine Plateauphase an. Auch bei dem Dimer *bc* ist, wie bei dem Dissoziat, der Zugang zum aktiven Zentrum nicht durch andere Untereinheiten behindert.

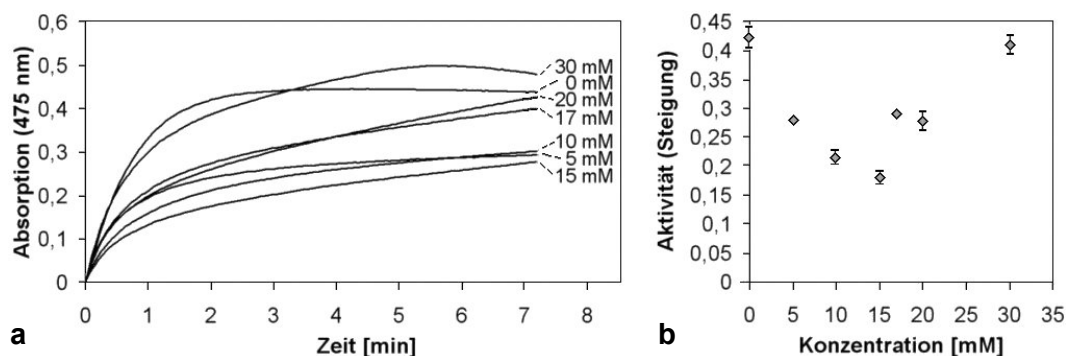


Abbildung 76: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanin-Dimers *bc* von *Eurypelma californicum* von der Magnesium-Konzentration.

a Das Hämocyanin-Dimer *bc* aus *E. californicum* wurde mit unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen inkubiert und die Diphenoloxidase-Aktivität mit dem Dopachom-Assay photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS bei 25°C über einen Zeitraum von 7 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

b Die Aktivität der Diphenoloxidase bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen wurde anhand der maximalen Steigung errechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen; der Fehler des Mittelwertes ist ebenfalls abgetragen.

Wiederum lässt sich eine MgCl_2 -Konzentration für maximale Aktivierung nicht genau festlegen (Abbildung 76b). Der Dopaminsatz des *E. californicum*-Dissoziats scheint in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Menge bei 15 mM Mg^{2+} durch ein Maximum zu gehen. Im Gegensatz dazu findet man hier für die Aktivität bei 15 mM Mg^{2+} ein Minimum.

Fazit

Hämocyanin verhält sich hinsichtlich Puffer-Medium, pH-Wert oder Ionenkonzentration wie ein echtes Enzym, das durch diese äußeren Effektoren beeinflusst werden und dessen Aktivität moduliert werden kann.

Die Diphenoloxidase-Aktivität beider untersuchten Cheliceraten-Hämocyanine von *P. imperator*- und *E. californicum* lässt sich in allen untersuchten Puffern (Phosphat-, Eurypelma-, Hepes- und Tris- Puffer) und in Wasser aktivieren. Die enzymatische Aktivität kann dabei mit verschiedenen Methoden belegt werden. Die Monophenolhydroxylase von *P. imperator*-Hämocyanin dagegen ist nur in Tris- und Hepes-Puffer vorhanden.

Die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität von respiratorischen Proteinen vom pH-Wert ist als Bohr-Effekt bekannt. Auch die enzymatische Aktivität des Cheliceraten-Hämocyanins ist pH-abhängig. Für die Catecholoxidase-Aktivität bei *P. imperator* und *E. californicum* liegt für den untersuchten Bereich das Optimum bei pH 6,6, am sauren Ende des untersuchten pH-Spektrums. Die Aktivität hat bei einem pH-Wert um 7,6 ein Minimum und steigt dann am alkalischen Ende des betrachteten pH-Bereichs wieder an. Der untersuchte pH-Bereich wurde nicht vergrößert, weil dafür eine zweite Puffersubstanz hätte eingesetzt werden müssen. Da

der Substratumsatz aber vom Puffer ebenfalls abhängig ist, wurde auf diese Experimente verzichtet.

Außer Puffer und pH-Wert hat vor allem das zweiwertige Magnesium-Ion Auswirkung auf die Stärke des enzymatischen Substratumsatzes. Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägungen der enzymatischen Aktivität in jeder Hämocyanin-Charge ist ein Vergleich jedoch nur schwer möglich. Eine Gegenüberstellung von interspezifischen Hämocyanin-Untersuchungen ist somit schwierig beziehungsweise ungenau.

Die untersuchten Hämocyanine (sowohl das 48-mere Hämocyanin vom Pfeilschwanzkrebs als auch die 24-mere Hämocyanine von Skorpion und Vogelspinne) verstärken ihren Dopaminumsatz nach Zugabe von MgCl_2 . Spinnen-Dissoziat und Untereinheiten-Dimer *bc* reagieren ebenfalls mit einer Erhöhung der Aktivität, auch wenn kein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen eingesetzter Mg^{2+} -Menge und Dopaminumsatz vorhanden ist. Auch der Tyraminumsatz von *E. californicum*-Hämocyanin wird durch Mg^{2+} erhöht, während das Kation den Monophenolumsatz von *P. imperator*-Hämocyanin konzentrationsabhängig inhibiert. Die monovalenten Kationen Na^+ und K^+ haben nur geringen inhibierenden bis gar keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Hämocyanin.

Trotz der mangelhaften Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Hämocyanin-Spezies kann festgehalten werden, dass die Catecholoxidase-Aktivität des Skorpions (bei diesen Hämocyanin-Isolierungen und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen) um ein mehrfaches stärker ist als die der Vogelspinne oder des Pfeilschwanzkrebses.

Eine umfassende Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin, vor allem von *Pandinus imperator*, ist damit gelungen.

Als wichtig kristallisiert sich die Frage heraus, wie die "Verzögerungsphase" erklärt werden kann und zu welchen Vorgängen es dabei kommt, die den Umsatz von Monophenolen letztendlich erlauben. Genauerer Untersuchungen des aktiven Zentrums und der Einflussnahme von Puffer und Magnesium auf die enzymatische Aktivität ist das nächste Kapitel gewidmet.

3.9 Regulation von Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität

Die spannendste Frage zur Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität im Häemocyanin ist die nach den genauen Abläufen am aktiven Zentrum. Feststellbar ist, dass beide Vorgänge durch das gleiche „Enzym“ katalysiert werden. Es ist unklar, ob ein monophenolisches Substrat zuerst hydroxyliert wird, sich dann vom aktiven Zentrum ablöst und danach wieder neu bindet um oxidiert zu werden, oder ob beide Reaktionen direkt nacheinander erfolgen. Bekannt ist, dass in der gelösten Röntgenstruktur der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* das CuB zur korrekten Koordination des monophenolischen Substrats an CuA benötigt wird, an dem anschließend die Hydroxylierung stattfindet ^[55].

Die entscheidende Frage zu Beginn der Arbeit war, ob die aktiven Zentren von Tyrosinase und Catecholoxidase gleich sind, oder doch chemisch verschieden; und warum extrem ähnliche aktive Zentren einmal nur Diphenole und einmal sowohl Mono- als auch Diphenole umsetzen können. Im Lauf meiner Arbeit konnte bis hier gezeigt werden, dass durch die Wahl eines geeigneten Puffers und eines geeigneten Aktivators die Diphenoloxidase-Aktivität von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Häemocyanin in eine Monophenolhydroxylase umgewandelt werden kann. Es stellt sich die Frage, ob dazu eine chemische Modifikation notwendig ist oder ob eine Konformationsänderung ausreicht. In welcher Art und Weise wird das aktive Zentrum beim Wechsel zwischen Diphenoloxidase- und Monophenolhydroxylase-Aktivität beeinflusst?

Zur genaueren Untersuchung dieser Vorgänge wurde der Substratumsatz unter verschiedenen Bedingungen und Modifikationen des aktiven Zentrums untersucht.

3.9.1 Einfluss von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität

Bei echten Phenoloxidasen wie zum Beispiel der Mushroom-Tyrosinase liegen die aktiven Zentren zum Großteil in der met-Form vor ^[88, 94]. Sie können so nur die Oxidation von Diphenolen katalysieren ^[57]. Diese Zentren werden dabei deoxygeniert und stehen nach erfolgter Reoxygenierung dann als Reaktionspartner auch für Monophenole zur Verfügung ^[230]. Die dadurch entstehende Lag-Phase ist in ihrer Dauer unter anderem von dem Enzym selbst, seiner Konzentration, der Substratkonzentration und weiteren Parametern wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke oder Puffer-Zusammensetzung abhängig. Bei der Tyrosinase von *Streptomyces antibioticus* oder *Agaricus bisporus* beispielsweise beträgt sie zwischen 20 s und 120 s ^[231].

Die Lag-Phase beim Umsatz von Monophenolen durch Tyrosinase kann durch den Zusatz von katalytischen Mengen an Diphenol eliminiert werden ^[232].

Beim spektroskopischen Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität von Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* beginnt die Färbereaktion erst nach einer längeren "Verzögerungsphase". Sie ist deutlich länger (bis zu mehreren Stunden) als die Lag-Phase bei Tyrosinasen. Diese Lag-Phase ist, in Abhängigkeit von der Tyrosinase selbst und anderen Parametern, einige Sekunden bis mehrere Minuten lang ^[231, 233, 234]. Die "Verzögerungsphase" der Hämocyanine vor dem Umsatz von Monophenolen lässt sie den 'echten' Phenoloxidasen noch mehr ähneln. Setzt man die beiden Perioden allerdings gleich, würde dies bedeuten, dass auch die aktiven Zentren des Hämocyanins im met-Zustand vorliegen. Von den Hämocyaninen von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* ist jedoch bekannt, dass sie bei normalem Sauerstoffpartialdruck vollständig oxygeniert vorliegen ^[194]. Der Grund für das verzögerte Einsetzen der Färbereaktion sollte daher durch den Aktivierungsmechanismus von Hämocyanin zur Phenoloxidadase-Aktivität bedingt sein.

Am Ende meiner Arbeit wurde der Einfluss von katalytischen Mengen Diphenol auf den Monophenolumsatz untersucht, um diese "Verzögerungsphase" besser charakterisieren zu können. Das Hämocyanin wurde dazu mit SDS aktiviert und der Tyraminumsatz spektroskopisch beobachtet. Neben dem Monophenol wurden katalytischen Mengen an Diphenol zugegeben.

***Pandinus imperator*-Hämocyanin**

Der Tyraminumsatz durch *P. imperator*-Hämocyanin verläuft wie erwartet. Nach einer "Verzögerungsphase" beginnt sich die Probe einzufärben (Abbildung 77a). Entgegen den Erwartungen lässt sich die Zeit vor dem sichtbaren Beginn der Monophenolhydroxylase-Aktivität durch die Gegenwart einer katalytischen Konzentration von Diphenol (2 μ M Dopamin) tatsächlich deutlich verkürzen: Der Tyraminumsatz beginnt mit kaum merklichem Verzug. Als Kontrolle dient der Umsatz der katalytischen Menge des Diphenols unter den gleichen Versuchsbedingungen. Er ist durch die geringe Substratkonzentration sehr schwach und allein nicht für die Färbung verantwortlich zu machen.

***Eurypelma californicum*-Hämocyanin**

In reinem Tris-Puffer kann das Spinnen-Hämocyanin nicht zur Monophenolhydroxylase aktiviert werden, wie es bereits in Kapitel 3.8.3.5.1 (Abbildung 73) beschrieben wurde. Daher befinden sich in allen Ansätzen 10 mM $MgCl_2$, um auch bei dem Hämocyanin von *E. californicum* ein Tyraminumsatz induzieren zu können. Die "Verzögerungsphase" der so aktivierten Monophenolhydroxylase-Aktivität ist extrem lang; auch bei dem Spinnen-Hämocyanin kann die "Verzögerungsphase" durch die Zugabe von katalytischen Mengen Diphenol eliminiert werden (Abbildung 77b). Die Färbung beginnt erst nach einigen Stunden.

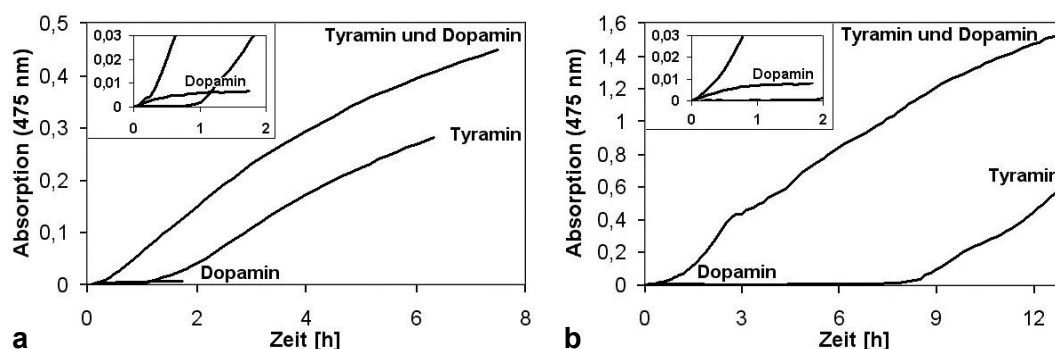


Abbildung 77: Einfluss von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität von Hämocyanin.

Der Umsatz eines Diphenols wie Dopamin wandelt bei echten Tyrosinasen met-Zentren in oxygenierte Zentren um, die dann sofort Monophenole hydroxylieren können ^[57].

Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml wurde in 0,1 M Tris-Puffer mit 2 mM SDS aktiviert und der Tyraminumsatz (1 mM) bei 475 nm gemessen. Ebenso wurde die Monophenolhydroxylase mit katalytischen Mengen an Diphenol (2 µM Dopamin) verfolgt. Mittelwerte aus zwei bis sechs Messungen.

a Hämocyanin von *Pandinus imperator*.

b Hämocyanin *Eurypelma californicum*; alle Ansätze mit 10 mM MgCl₂.

Insert: Vergrößerung des Diphenolumsatzes (2 µM Dopamin, Autooxidation-korrigiert).

Damit stellen die Schlüsse, die aus diesen Versuchen zur "Verzögerungsphase" gezogen werden, einen Widerspruch dar. Ursprünglich wurde postuliert, dass Veränderungen in der Struktur (die den Monophenolumsatz gestatten) langsam passieren. Da jedoch der Zusatz von katalytischen Mengen an Dopamin die Katalyse sofort beginnen lässt, muss dieses Ergebnis dahingehend interpretiert werden, dass eventuell notwendige Veränderungen in der Konfiguration des Proteins schnell stattfinden können, und dass das Hämocyanin in einem met-Zustand verweilt und durch Diphenole wieder restauriert wird. Dies wiederum widerspricht den Ergebnissen von Sterner ^[194] und Decker ^[28], die besagen, dass Cheliceraten-Hämocyanine bei normalem Sauerstoffpartialdruck vollständig oxygeniert vorliegen und Sauerstoff-Bindungskurven reversibel durchgeführt werden können. Auf der anderen Seite ist gerade in Verbindung mit SDS und MgCl₂ eine schnelle Verminderung der Absorption bei 340 nm, also ein Rückgang der Oxygenierung bei beiden Hämocyaninen zu beobachten.

3.9.2 Gemeinsamer Tyramin- und Dopaminumsatz von Hämocyanin

Um die Unterschiede von zum Monophenolumsatz fähigen Hämocyanin und nur zum Diphenolumsatz fähigen Hämocyanin erklären zu können, muss das Geschehen am aktiven Zentrum bekannt sein. Ein Umsatz von Diphenolen während der postulierten Konfigurationsänderung des aktiven Zentrums in der "Verzögerungsphase" (vor dem eigentlichen Beginn des Monophenolumsatzes) sollte durch diesen 'Umbau' nicht inhibiert werden, erst recht nicht, falls diese Verzögerung nur darauf beruht, dass die aktiven Zentren in met-Form vorliegen. Echte Tyrosinasen und Phenoloxidasen sind, wie bereits durch die Namensgebung induziert,

sowohl zum Umsatz von Mono- als auch von Diphenolen und zur weiteren Katalyse zu Chinonen fähig.

Die Konfiguration des aktiven Zentrums von *Pandinus imperator*-Hämocyanin wurde zur Erhellung dieses Sachverhaltes anhand des Substratumsatzes von Tyramin und Dopamin in verschiedenen Kombinationen untersucht.

3.9.2.1 *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Hämocyanin in Tris-Puffer wurde mit SDS aktiviert und der Umsatz von Dopamin und Tyramin spektroskopisch verfolgt. Nach 150 min (Zeitpunkt $t=0$ min) wurde Aqua dest. oder das zweite Substrat dazugegeben, und der weitere Reaktionsverlauf verfolgt. Die Messungen wurden bei einer Salz-Konzentration von 20 mM $MgCl_2$ durchgeführt, da sich diese Mg^{2+} -Konzentration als günstig für sowohl Monophenoloxidase- und Diphenoloxidase-Aktivität herausgestellt hat.

Erwartungsgemäß beginnt der Tyramin-Umsatz relativ langsam; nach etwas mehr als einer Stunde erreicht die Färbung ein stabiles Niveau (Abbildung 78). Im Kontrollversuch, bei dem zu der Probe nach 150 min Inkubationszeit 100 μ l H_2O gegeben werden (Kurve c), bleibt die

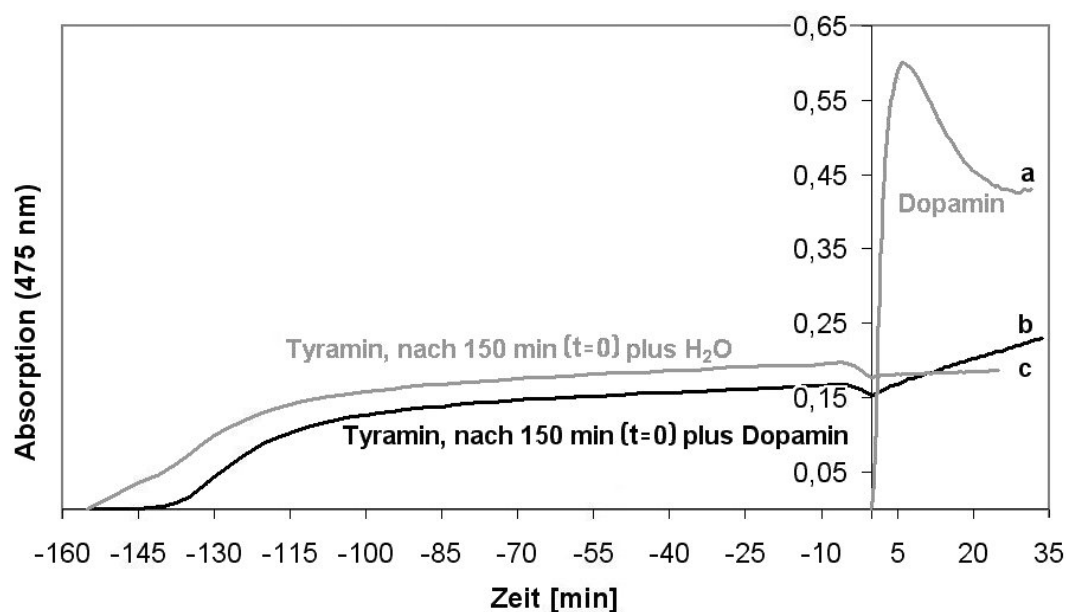


Abbildung 78: Konfiguration des aktiven Zentrums von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Umsatz von Monophenol (Tyramin) und Diphenol (Dopamin) durch Hämocyanin von *P. imperator* (0,2 mg/ml), aktiviert durch 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 20 mM $MgCl_2$. Verschiedene Kombinationen der Substrate (jeweils 1 mM) wurden überprüft; gemessen wurde die Absorption bei 475 nm bei 25°C. Mittelwerte aus je drei Messungen. Bei diesen Versuchsansätzen geht es lediglich darum, die Fähigkeit zum Substratumsatz qualitativ zu untersuchen. Quantitative Maßnahmen wie zum Beispiel Messung der Autooxidation sind daher nicht notwendig. Von allen Daten wurde der Startwert abgezogen, um die Messung bei einer Extinktion von Null beginnen zu lassen und sie so einfacher vergleichen zu können.

Absorption in etwa auf diesem Stand und nimmt bei Zugabe von Aqua dest. nur leicht ab. Hier ist also ein Verdünnungseffekt zu beobachten. Wird zu dem Ansatz mit 100 µl Dopamin-Lösung (Endkonzentration 0,9 mM) gegeben, so nimmt die Färbung durch Substratumsatz nochmals zu (Kurve b). Zum Vergleich der Reaktivität ist die Dopaminkinetik ohne vorherigen Tyraminumsatz ebenfalls abgebildet (Kurve a). Ein aktives Zentrum, das auf eine Cresolase-Aktivität eingestellt ist, kann demnach auch sofort Catechole oxidieren.

Der Kurvenverlauf dieser Reaktion (Dopaminumsatz nach Cresolase-Aktivität, Kurve b) unterscheidet sich von der Kurvenform bei Dopamin als einziges Substrat: Der Dopaminumsatz nach Cresolase-Aktivität nimmt einen gleichmäßigen Verlauf mit mäßiger Steigung, während die Dopaminkinetik (Kurve a) mit einem sehr steilen Anstieg beginnt. Diese Unterschiede in der enzymatischen Aktivität können eventuell durch die Cresolase-Einstellung des aktiven Zentrums bedingt sein, viel wahrscheinlicher ist aber der Grund bei der Inkubation mit SDS und Mg^{2+} zu suchen. Wie anhand der Tabelle 20 abzuschätzen ist, ist das aktive Zentrum zu diesem Zeitpunkt nur noch zum Teil oxygeniert und in seiner Struktur beeinträchtigt. Auch in Abbildung 58 ist zu sehen, dass die Kurve des Dopaminumsatzes mit $MgCl_2$ nach SDS-Inkubation einer langsam ansteigenden Gerade entspricht.

In der Kombination beider Substrate (Daten nicht gezeigt) kommt es zuerst zu einem sprunghaften Anstieg der Färbung durch den Dopaminumsatz, später nimmt die Absorption durch Tyraminumsatz nochmals stetig zu. Der Dopaminumsatz verhindert den Tyraminumsatz folglich nicht.

3.9.2.2 *Eurypelma californicum*-Hämocyanin

Bei den gleichen Versuchen zum aktiven Zentrum mit Hämocyanin von *Eurypelma californicum* (Abbildung 79) wurde eine etwas höhere Salz-Konzentration von 30 mM $MgCl_2$ gewählt, da hier sowohl Cresolase als auch Catecholoxidase gut arbeiten.

Wie erwartet und nahezu identisch mit den Daten von *P. imperator* verläuft die Kurve des Dopaminumsatzes (Kurve a). Ebenso verhalten sich die Graphen des Tyraminumsatzes nach Zugabe von H_2O einerseits beziehungsweise nach Zugabe von Dopamin andererseits für beide Cheliceraten-Hämocyanine identisch: Nach der Verdünnung mit Wasser (Kurve c) steigt er kaum weiter, mit Dopamin dagegen linear an (Kurve b). Auch der Umsatz von Dopamin und Tyramin gemeinsam (Kurve d) durch *E. californicum*-Hämocyanin verläuft ähnlich wie bei Skorpion-Hämocyanin.

Beide Cheliceraten-Hämocyanine verhalten sich also hinsichtlich ihrer Substratspezifität in Bezug auf Mono- und Diphenole gleich. Die 'Catecholoxidase-Konformation' kann als die Standard-Konformation des enzymatisch aktiven Hämocyanins betrachtet werden, da nach Aktivierung des Hämocyanins das Diphenol problemlos und schnell umgesetzt wird. Diese 'Catecholoxidase-Konformation' verhindert einen Monophenolumsatz nicht. Ebenso kommt

es nach Einstellung der 'Cresolase-Konformation' nicht zu einer Inhibierung des Diphenolumsatzes; auch wenn die Kinetiken des Substratumsatzes selbst leicht unterschiedliche Formen annehmen

Die Kernfrage, ob das Hämocyanin sowohl Mono- als auch Diphenole am „gleichen“ aktiven Zentrum umsetzt, kann hier zwar noch nicht vollständig beantwortet werden. Es ist aber so, dass ein aktives Zentrum, das Tyramin als Monophenol umsetzt, auch in der Lage ist, sofort Dopamin als Diphenol zu oxidieren. Ein „Umbau“ des aktiven Zentrums in eine andere Konfiguration ist hier nicht nötig.

Der umgekehrte Fall ist schwieriger und durch diesen Versuchsaufbau nicht komplett zu beantworten. Ob ein aktives Zentrum mit der richtigen Konformation zum Diphenolumsatz auch instantan Monophenole umsetzen könnte, kann hier nicht festgestellt werden. Nur wenn die Farbreaktion sofort beginnen würde, könnte diese Frage bejaht werden. Beim Tyraminumsatz mit katalytischen Mengen Dopamin ist diese Situation in Grundzügen gegeben. Es kommt nicht zu einer "Verzögerungsphase", die durch einer Reorientierung von Di- auf Monophenol resultiert.

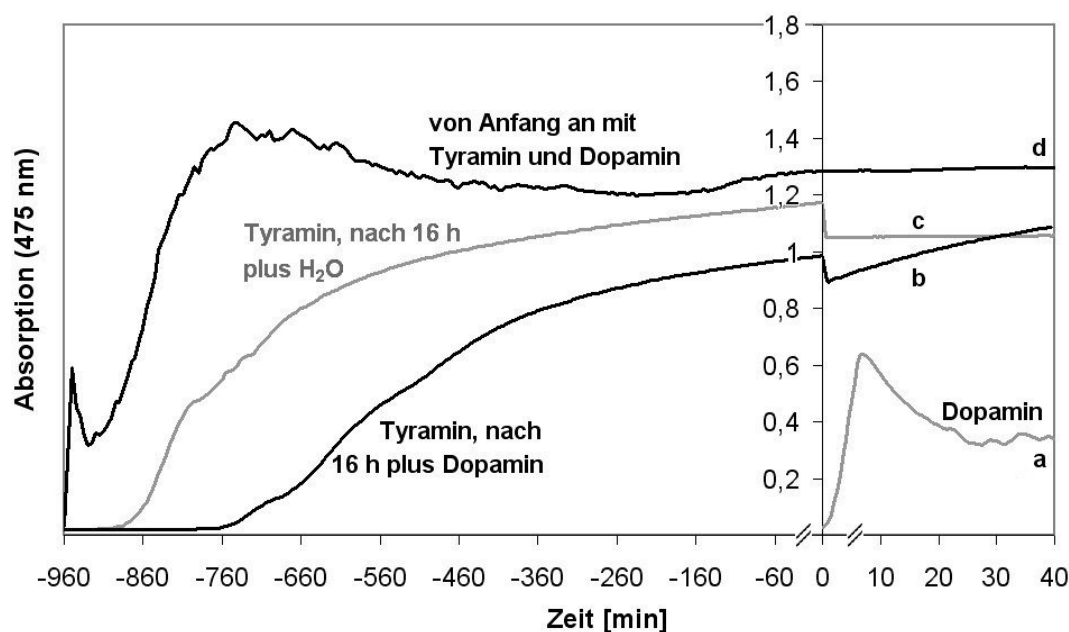


Abbildung 79: Konfiguration des aktiven Zentrums von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin.

Umsatz von Monophenol (Tyramin) und Diphenol (Dopamin) durch Hämocyanin von *E. californicum* (0,2 mg/ml), aktiviert durch 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) und 30 mM MgCl_2 . Verschiedene Kombinationen der Substrate (jeweils 1 mM) wurden überprüft; gemessen wurde die Absorption bei 475 nm bei 25°C. Mittelwerte aus je zwei bis vier Messungen. Die Autooxidation wurde nicht abgezogen; weitere Erklärungen in Legende zu Abbildung 78. Unterschiedliche Skalierung der Abzisse.

3.9.3 Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Der Mechanismus, der es dem Hämocyanin von *Pandinus imperator* ermöglicht, unter bestimmten Bedingungen eine Monophenolhydroxylase-Aktivität zu entwickeln, ist noch im Unklaren. Für diese Aktivität im Hämocyanin wurden zwei Effektoren postuliert: Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan), das im Gegensatz zu Phosphat-Puffer den Substratumsatz erst ermöglicht, und Mg^{2+} , das aber, im Gegensatz zu anderen Untersuchungen an weiteren Cheliceraten-Hämocyaninen, die Aktivität verringert.

Ähnlich zu der Vorgehensweise in den vorangegangenen Versuchen soll hier durch die unterschiedlichen Kombinationen der Effektoren versucht werden, die verschiedenen Substratspezifischen Konfigurationen zu untersuchen und damit das Geschehen am aktiven Zentrum besser zu verstehen.

3.9.3.1 Tris-Phosphat-Switch von Hämocyanin

In der Regel werden Phenoloxidasen in Phosphat-Puffer untersucht ^[163-165]; dieser verhindert allerdings bei Hämocyanin sowohl von *P. imperator* als auch von *E. californicum* die Cresolase-Aktivität.

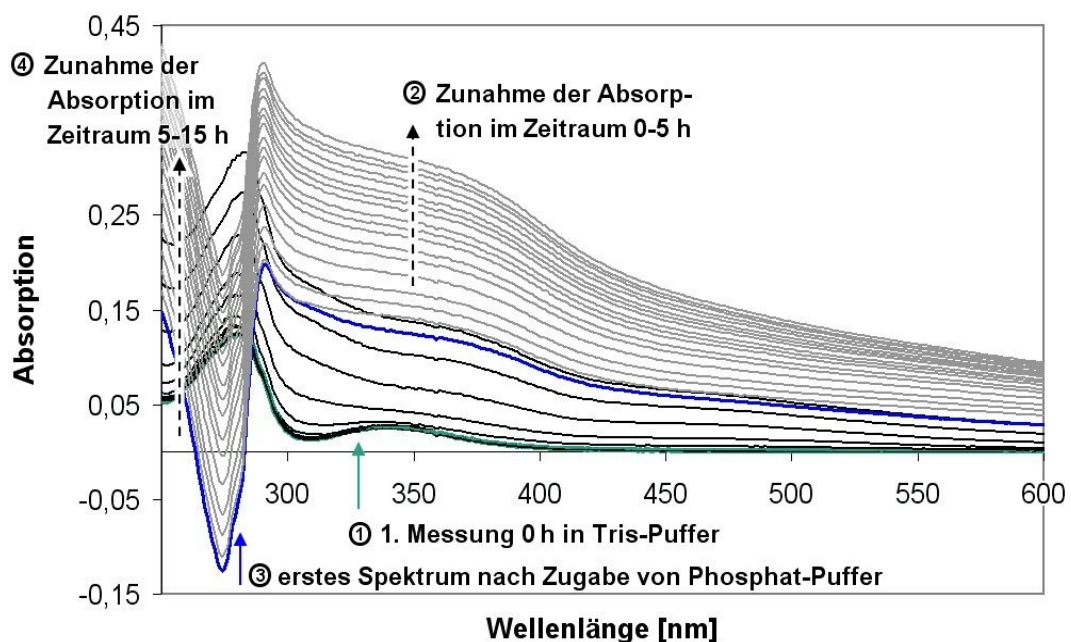


Abbildung 80: Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin in Tris-Puffer, mit Zugabe von Phosphat-Puffer nach fünf Stunden.

Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS, 1 mM Tyramin und 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) für 5 h bei 25°C inkubiert und Spektren von 250 nm bis 600 nm aufgezeichnet (schwarze Spektren). Danach wurde Phosphat-Puffer dazugegeben (blau) und für weitere 10 h Spektren aufgenommen (grau). Endkonzentrationen: 75 mM bei beiden Puffern, 1,5 mM SDS, 0,75 mM Tyramin und 0,15 mg/ml Hämocyanin.

Daher wurde Hämocyanin von *P. imperator* mit SDS und dem Monophenol Tyramin inkubiert, und zwar entweder in Tris- oder in Phosphat-Puffer. Alle fünf Minuten wurden Spektren aufgenommen (Abbildung 80). Nach fünf Stunden Reaktionszeit wurden 300 µl des jeweiligen anderen Puffes dazupipettiert und die enzymatische Aktivität weitere 10 h beobachtet. Beide Puffersubstanzen hatten damit eine Endkonzentration von 75 mM. Aus den Spektren konnte dann eine Kinetik der Farbentwicklung bei 475 nm erstellt werden (Abbildung 81).

Erwartungsgemäß setzt Skorpion-Hämocyanin in Phosphat-Puffer kein Monophenol um, der Graph verläuft in Absorptionsbereichen nahe Null. Dies ist ebenso der Fall, wenn nach 5 h zu dem Phosphat-Puffer-Ansatz Tris-Puffer dazugegeben wird: Es findet kein Substratum-satz statt. Bei Inkubation in Tris-Puffer über fünfzehn Stunden entsteht das gewohnte Bild eines eindeutigen und andauernden Substratumsatzes. Nach Zugabe von Aqua dest. in den Ansatz mit Tris-Puffer sinkt die Absorption etwas ab. Nach Korrektur des Verdünnungseffekts wird ersichtlich, dass diese Aqua dest.-Zugabe die enzymatische Aktivität in unklarer Weise beeinflusst: Die Absorptionzunahme steigt weiter linear an, anstatt wie die Ausgangskurve (Tris-Puffer) in eine Plateauphase überzugehen. Nach der Zugabe von

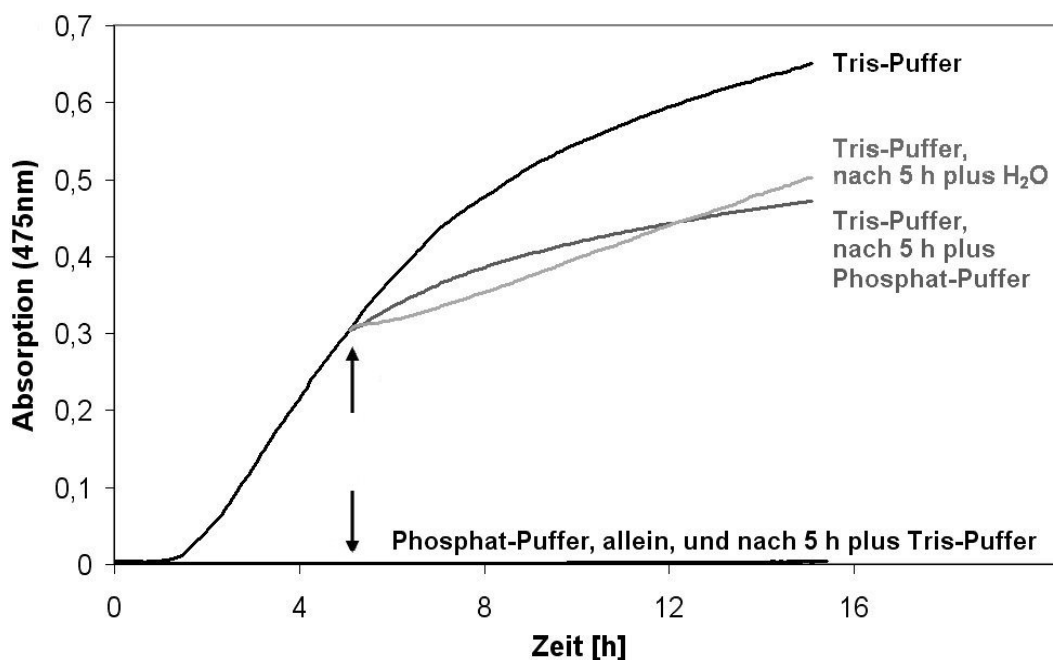


Abbildung 81: Phosphat-Tris-Switch der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Hämocyanin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS zum Umsatz von 1 mM Tyramin aktiviert. Um die eventuellen Einwirkungen der Puffersubstanz auf die enzymatische Aktivität zu untersuchen, wurde der Versuch in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) oder in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,8) angesetzt. Nach 5 h Reaktionszeit bei 25°C wurde der jeweilige andere Puffer dazugegeben (Pfeil) (Endkonzentration beider Puffersubstanzen 75 mM). Wasser dient zur Abschätzung des Verdünnungseffektes.

Obwohl immer Hämocyanin aus derselben Isolierung verwendet wurde, schwankt die Aktivität (Stärke und Beginn der enzymatischen Reaktion). Um diese Unregelmäßigkeiten im Substratumsatz auszugleichen, wurden die Verdünnungseffekte (Zugaben von H₂O oder Phosphat-Puffer) herausgerechnet und die Kurven auf die Werte von Tris-Puffer ohne Zusatz umgerechnet und normiert.

Phosphat-Puffer in den Tris-Ansatz kommt es dagegen lediglich zu einem Verdünnungseffekt, die Form der Kinetik ändert sich kaum.

Phosphat-Puffer wirkt bei der einmal entwickelten Monophenolhydroxylase-Aktivität demzufolge nicht als Inhibitor. Eventuell wird die Aktivität etwas abgeschwächt; dies kann, nach Betrachtung der Versuche mit Aqua dest., auch andere Gründe als die Puffersubstanz haben. Tris ist andererseits nicht in der Lage, das Hämocyanin beziehungsweise das aktive Zentrum so zu beeinflussen, dass bei vorhergehender Inkubation in Phosphat-Puffer eine Monophenolhydroxylase-Aktivität angeschaltet werden kann.

Das Hämocyanin scheint nach SDS-Aktivierung ohne Entfernung des ersten Effektors (erster Puffer) nicht in der Lage zu sein, auf eine späte Veränderung (zweiter Puffer) mit einer Konformationsänderung zu reagieren.

3.9.3.2 Regulation der Phenoloxidase durch Mg^{2+}

Als nächstes soll der Einfluss von $MgCl_2$ auf die Phenoloxidase-Aktivität untersucht werden. Bei der Catecholoxidase-Aktivität verstärkt $MgCl_2$ die Aktivität. Die Cresolase (nur in Tris- oder HEPES-Puffer aktivierbar) ist in der Stärke ihrer Reaktion umgekehrt proportional zu der Mg^{2+} -Konzentration (Abbildung 68). Ebenso verkürzen zunehmende Mg^{2+} -Konzentrationen die Zeit, die benötigt wird, um in der Cresolase-Kinetik eine Plateauphase zu erreichen, in der die Absorption der Probe nicht mehr zunimmt, sondern konstant bleibt. Weiterhin führt eine Erhöhung der Mg^{2+} -Menge zu einer Vorverlegung des Reaktionsbeginns.

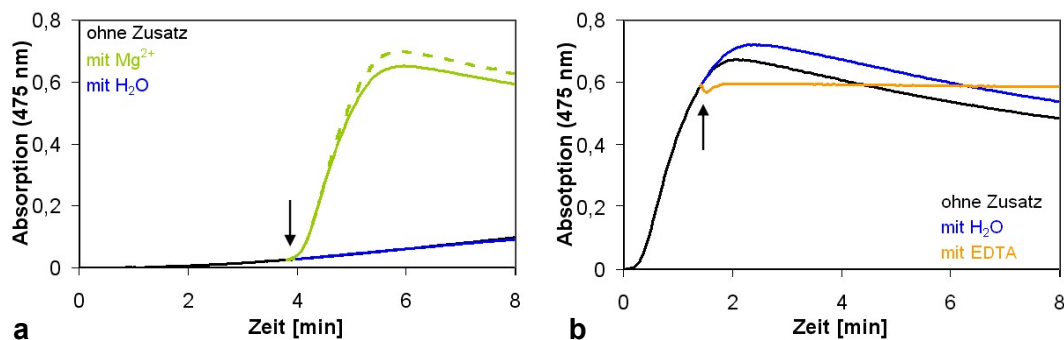


Abbildung 82: Regulation der Diphenoloxidase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin durch Mg^{2+} und EDTA.

Hämocyanin von *P. imperator* in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml wurde in 0,1 M Tris-Puffer und 1 mM Dopamin mit 2 mM SDS aktiviert und der Substratumsatz bei 25°C bei 475 nm gemessen. Alle Graphen wurden auf die Kurve der Kinetik 'ohne Zusatz' normiert. Mittelwerte aus zwei Messungen.

a Nach 3,5* min Zugabe von 100 µl $MgCl_2$ (Endkonzentration 33 mM) oder Aqua dest.. Gestrichelte Kurve: Kinetik mit $MgCl_2$ von Beginn an (aus b), um 4 min verschoben.

b Ansatz mit 33 mM $MgCl_2$. Nach 1* min Zugabe von entweder 100 µl EDTA (Endkonzentration 66 mM) oder Aqua dest..

* Die Zugabe erfolgte nach 3,5 min (a) beziehungsweise 1 min (b), allerdings startet die Beobachtung erst wieder nach weiteren 30 s.

Im Experiment zur Regulation der Catecholoxidase-Aktivität von *P. imperator* durch Mg^{2+} wurde Hämocyanin zur Diphenoloxidase aktiviert und der Substratumsatz spektroskopisch gemessen. Während der Reaktion wurden entweder Aqua dest., $MgCl_2$ oder EDTA (Endkonzentration 30 mM) dazugegeben. Wie in Abbildung 82 zu sehen ist, wird die Färbereaktion durch die Verdünnung mit Wasser kaum gestört. Wie erwartet verstärkt $MgCl_2$ die Aktivität und führt zu einer vergleichbar starken Absorption, als ob Mg^{2+} schon von Anfang an im Reaktionsansatz gewesen wäre. Zugabe von EDTA bringt die Reaktion sogar vollständig zum Stillstand (keine Steigung mehr in Abbildung 82b).

$MgCl_2$ und EDTA regulieren die Diphenoloxidase-Aktivität wie erwartet. Wie stellen sich die Auswirkungen bei der Monophenolhydroxylase-Aktivität dar? Die Vorstellung ist, dass Mg^{2+} und / oder Tris in der "Verzögerungsphase" zu einer geringfügigen Konformationsänderung führen, die dann einen Monophenolumsatz am aktiven Zentrum zulässt. Da alle bisherigen Untersuchungen mit einer konstanten Mg^{2+} -Konzentration durchgeführt wurden, sollte nun die Inkubation in Tris und mit Mg^{2+} zeitlich getrennt werden.

3.9.3.2.1 Regulation der Monophenolhydroxylase durch Zugabe von Mg^{2+}

Im ersten Versuch wurde Hämocyanin von *P. imperator* analog zu den Versuchen zur Diphenoloxidase-Aktivität in Tris-Puffer mit Tyramin durch SDS aktiviert. Nach fünf Stunden wurden entweder 100 μ l Aqua dest. oder $MgCl_2$ (Endkonzentration 30 mM) dazugegeben.

Wie in Abbildung 83 zu sehen ist, beginnen alle drei Kurven mit einer Phase ohne Substratumsatz. In dieser "Verzögerungsphase" wird die Konformation so modifiziert, dass das Monophenol Tyramin am aktiven Zentrum umsetzen kann. Der Graph 'ohne Zusatz' nimmt einen erwarteten Verlauf an: Nach einer Phase ohne Absorptionszunahme steigt die optische Dichte bei 475 nm kontinuierlich an.

Bei einer Zugabe von Aqua dest. sollte sich, vom Verdünnungseffekt abgesehen, der Reaktionsverlauf nicht ändern. Um diesen Effekt auszugleichen, wurden die Daten der Messungen mit zusätzlichem Wasser und $MgCl_2$ -Lösung auf ihre ursprünglichen Konzentrationen zurückgerechnet und zusätzlich auf den Graphen 'ohne Zusatz' nach fünf Stunden normiert. Trotz der Normierung verringert der Graph mit Wasser seine Steigung. Am Ende der Messreihe ist die Absorption in diesem Ansatz circa 28 % geringer als im Ansatz ohne Aqua dest.. Bei dem Diagramm des Versuchs mit zusätzlichem Mg^{2+} ist der Verlauf nach der Normierung ebenfalls flacher, die Absorption weicht um circa 2,2 % ab.

Bei den Tyraminkinetiken zur $MgCl_2$ -Abhängigkeit in Kapitel 8.3.1 hat sich Mg^{2+} als Inhibitor der Cresolase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin herausgestellt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen findet hier durch das nach fünf Stunden zugesetzte Magnesium keine eindeutige Inhibition statt: Die Steigung der Kinetik flacht sich zwar ab, nimmt aber insgesamt weiter zu. Warum diese Versuchsergebnisse nicht den Erwartungen entsprechen (Verlangsamung / Inhibition des Tyraminumsatzes durch Mg^{2+}), kann nicht festgestellt werden.

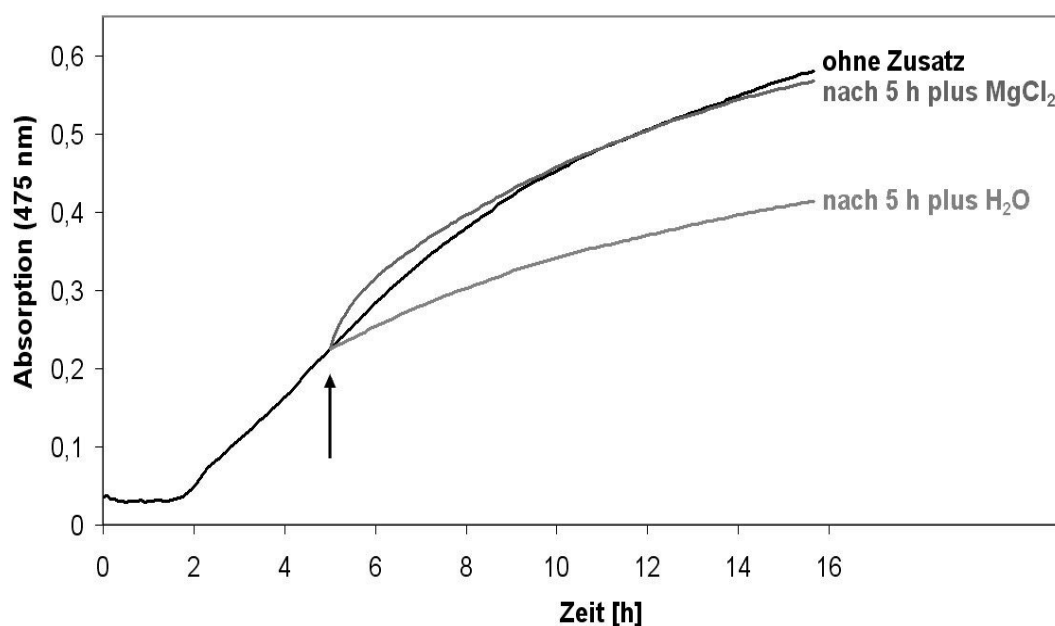


Abbildung 83: Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin durch Mg^{2+} .

Hämocyanin von *P. imperator* (0,2 mg/ml) wurde in 0,1 M Tris-Puffer und 1 mM Tyramin mit 2 mM SDS aktiviert und der Substratumsatz bei 25°C und 475 nm gemessen. Nach 5 h wurden entweder Aqua dest. oder $MgCl_2$ dazugegeben (Pfeil). Trotz der Verwendung derselben Hämocyanin-Probe schwankt die enzymatische Aktivität. Daher wurden Verdünnungseffekte herausgerechnet und die Kurven auf die Werte des Graphen 'ohne Zusatz' nach 5 h normiert (siehe auch Legende zu Abbildung 81). Endkonzentrationen: Hämocyanin 0,18 mg/ml, 0,9 mM Substrat, 1,8 mM SDS, 90 mM Tris, 30 mM $MgCl_2$. Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

3.9.3.2.2 Regulation der Monophenolhydroxylase durch Entfernen von Mg^{2+}

In einem zweiten Versuch wird wiederum die Cresolase-Aktivität des Hämocyanins durch SDS aktiviert. Der Substratumsatz des Hämocyanins mit 33 mM $MgCl_2$ wird spektroskopisch gemessen. Nach fünf Stunden werden diesmal Aqua dest. oder EDTA (Endkonzentration 60 mM) dazugegeben, um alle Mg^{2+} -Ionen aus dem Ansatz zu entfernen. Zur Überprüfung des Verdünnungseffektes werden die Kurven wieder normiert.

Nach der Zugabe von EDTA und der Entfernung der Mg^{2+} -Ionen aus dem Versuchsansatz wäre eine Zunahme der Monophenolhydroxylase-Aktivität zu erwarten gewesen. Wie in Kapitel 3.8.3.1 beschrieben, ist der Tyraminumsatz umso stärker, je niedriger die $MgCl_2$ -Konzentration ist. Im Gegensatz zu dieser Annahme nimmt die Aktivität hier ab, eine Verminderung der Färbung ist zu sehen (Abbildung 84). Ebenso nimmt die Absorption nach Wasser-Zugabe ab. Nach 15,5 h beträgt die Absorption mit H_2O im Ansatz noch 85 % des Endwertes ohne Zusatz; im Ansatz mit EDTA nimmt sie nur noch 73 % an.

Für beide Regulationsversuche gilt, dass die Catecholoxidase durch Mg^{2+} -Entfernung oder Mg^{2+} -Zugabe gesteuert werden kann. Bei der Cresolase-Aktivität ist dies nicht möglich.

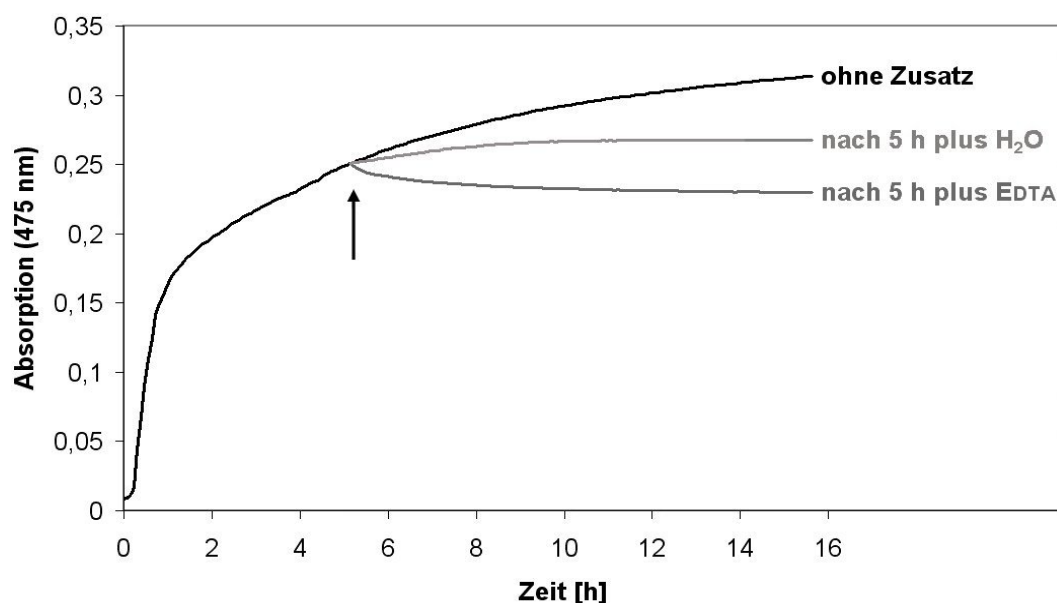


Abbildung 84: Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin durch EDTA.

Hämocyanin von *P. imperator* (0,2 mg/ml) wurde in 0,1 M Tris-Puffer, 33 mM MgCl₂ und 1 mM Tyramin mit 2 mM SDS aktiviert und der Substratumsatz bei 25°C und 475 nm gemessen. Nach 5 h wurden entweder Aqua dest. oder EDTA dazugegeben. Normierung (siehe auch Legende zu Abbildung 81) auf die Kurve 'ohne Zusatz'. Endkonzentrationen: Hämocyanin 0,18 mg/ml, 0,9 mM Substrat, 1,8 mM SDS, 90 mM Tris, 60 mM EDTA. Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

3.9.4 Phenoloxidase-Aktivität ohne Aktivator

3.9.4.1 Aktivierung der Phenoloxidase ohne SDS – mit Mg²⁺

Als wichtiger Effektor für die Phenoloxidase-Aktivität hat sich MgCl₂ herausgestellt, wenngleich die Wirkungsweise noch nicht genau verstanden ist. Das Kation verstärkt den Substratumsatz bei der Catecholoxidase-Aktivität aller untersuchten Hämocyanine. Ebenso setzt es den Tyraminumsatz von *E. californicum*-Hämocyanin herauf. Bei der Cresolase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin kommt Mg²⁺ ebenfalls eine regulierende Wirkung zu: Die Aktivität nimmt bei Mg²⁺-Einsatz ab; die Zeit, die benötigt wird, um in der Kinetik eine Plateauphase zu erreichen, verkürzt sich; die Färbung selbst entwickelt sich am Reaktionsbeginn schneller.

Da die Puffersubstanz Tris nicht als physiologischer Aktivator anzusehen ist, stellt sich die Frage, ob Magnesium nicht nur als Effektor, sondern auch als eigener Aktivator wirken kann. Die Diphenoloxidase im Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* sollte daher ohne den üblichen Aktivator SDS induziert werden. Diese Versuche wurden erst gegen Ende meiner Dissertation durchgeführt, da sich die Bedeutung von Magnesium erst im Lauf der Arbeit herausstellte.

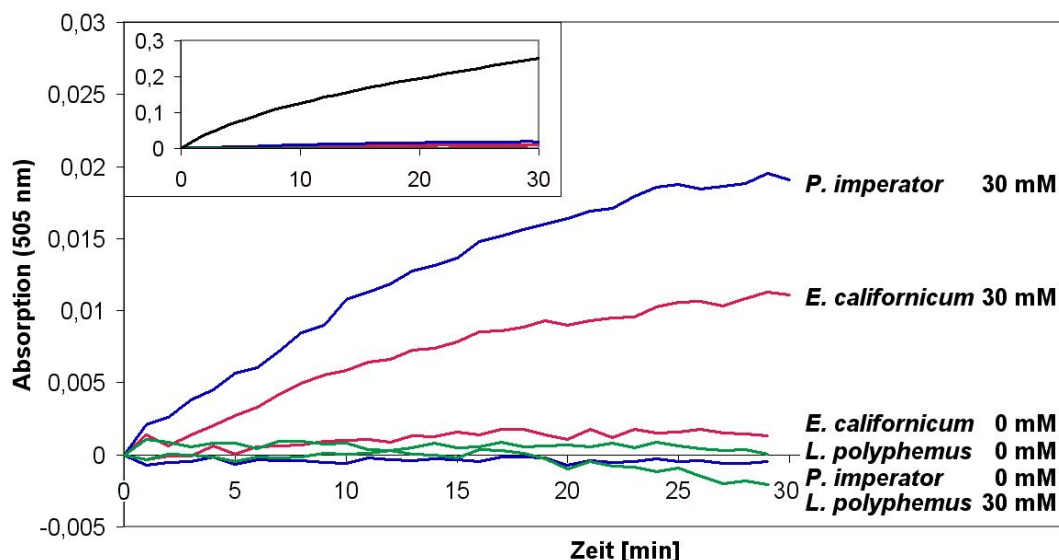


Abbildung 85: Diphenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin ohne SDS mit $MgCl_2$.

Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml ohne oder mit 30 mM $MgCl_2$ inkubiert. Die Diphenoloxidase-Aktivität wurde mit dem MBTH-Assay photometrisch bei 505 nm verfolgt. Als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 0,43 mM MBTH bei 25°C über einen Zeitraum von 30 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen.

Insert: Zum Vergleich die Catecholoxidase-Kinetik von *E. californicum*-Hämocyanin, das wie üblich mit 2 mM SDS aktiviert wurde.

Die Reaktion wurde in Tris-Puffer ohne oder mit 30 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Zur Verstärkung der Färbung wurde dem Reaktionsansatz MBTH zugesetzt, das mit Dopachinon zu einem violetten Pigment reagiert.

Wie in Abbildung 85 zu sehen, besitzt Cheliceraten-Hämocyanin in reinem Tris-Puffer ohne $MgCl_2$ keine enzymatische Aktivität: Nach Zugabe von 30 mM $MgCl_2$ kann bei *L. polyphemus*-Hämocyanin kein Substratumsatz festgestellt werden. Bei dem respiratorischen Pigment von *P. imperator* und *E. californicum* bewirkt es jedoch eine, wenn auch geringe, doch eindeutige Absorptionszunahme. Im Vergleich zu mit SDS aktiviertem Hämocyanin ist die Aktivität sehr schwach: Wird *E. californicum*-Hämocyanin mit SDS aktiviert, ist der Umsatz etwa 22-mal stärker als der von ausschließlich mit Mg^{2+} aktiviertem Spinnen-Hämocyanin. *P. imperator*-Hämocyanin wird mit SDS circa 12-mal stärker aktiviert als mit $MgCl_2$.

3.9.4.2 Aktivierung der Phenoloxidase ohne SDS – mit Ca^{2+}

Die Phenoloxidase-Aktivität in Abhängigkeit von $CaCl_2$ konnte bisher aufgrund der der Reaktion von SDS mit Ca^{2+} beziehungsweise der schlechten Löslichkeit von Kalkseife $Ca(DS)_2$ nicht untersucht werden. Im Reaktionsansatz bildet sich Calciumdodecylsulfat, das als weiße

nadelförmige Kristalle ausfällt und es dadurch unmöglich macht, exakte SDS- oder Ca^{2+} -Konzentrationen zu bestimmen.

Ohne SDS im Ansatz können analoge Versuche mit CaCl_2 zu den in Kapitel 3.9.4.1 beschriebenen Experimenten durchgeführt werden.

Die Zugabe von 30 mM CaCl_2 führt bei allen drei untersuchten Hämocyaninen zu einer steigenden Absorption (Abbildung 86). Im Gegensatz zu Mg^{2+} kann Ca^{2+} hier neben *P. imperator*- und *E. californicum*- auch *L. polyphemus*-Hämocyanin erkennbar aktivieren. Insgesamt ist auch hier die Aktivität vergleichsweise eher schwach.

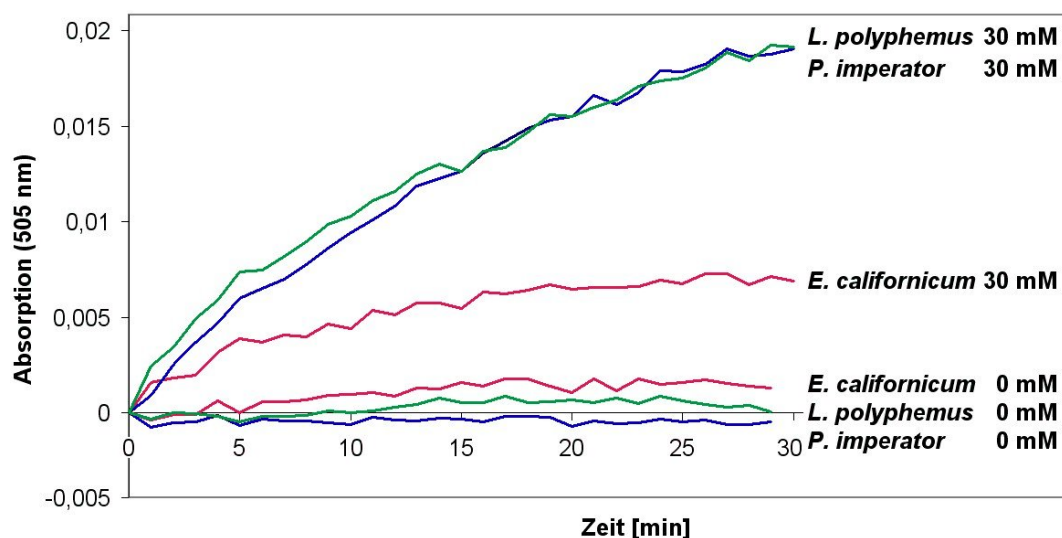


Abbildung 86: Diphenoloxidase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin ohne SDS mit CaCl_2 .

Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml ohne oder mit 30 mM CaCl_2 inkubiert. Die Diphenoloxidase-Aktivität wurde mit dem MBTH-Assay photometrisch bei 505 nm verfolgt. Als Substrat wurde 1 mM Dopamin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 0,43 mM MBTH bei 25°C über einen Zeitraum von 30 min statt. Die Autooxidation wurde abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen.

3.9.5 Veränderungen am Hämocyanin zur Phenoloxidase-Aktivität

3.9.5.1 Absorption, Fluoreszenz und CD-Spektren von *Pandinus imperator*-Hämocyanin in verschiedenen Puffer-Medien

Wie kommt es zu der Veränderung, die es Hämocyanin ermöglicht, mittels Monophenolhydroxylase-Aktivität Tyramin umzusetzen? Während der langen "Verzögerungsphase" ohne Substratumsatz wird eine Konformationsänderung, die durch Effektoren wie Tris oder Magnesium ausgelöst wird, postuliert. Diese Modifikationen wurden mittels spektroskopischer Methoden, die dem Hämocyanin Strukturveränderungen erlauben, untersucht.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde in 0,1 M Tris-Puffer, 30 mM MgCl_2 und SDS in

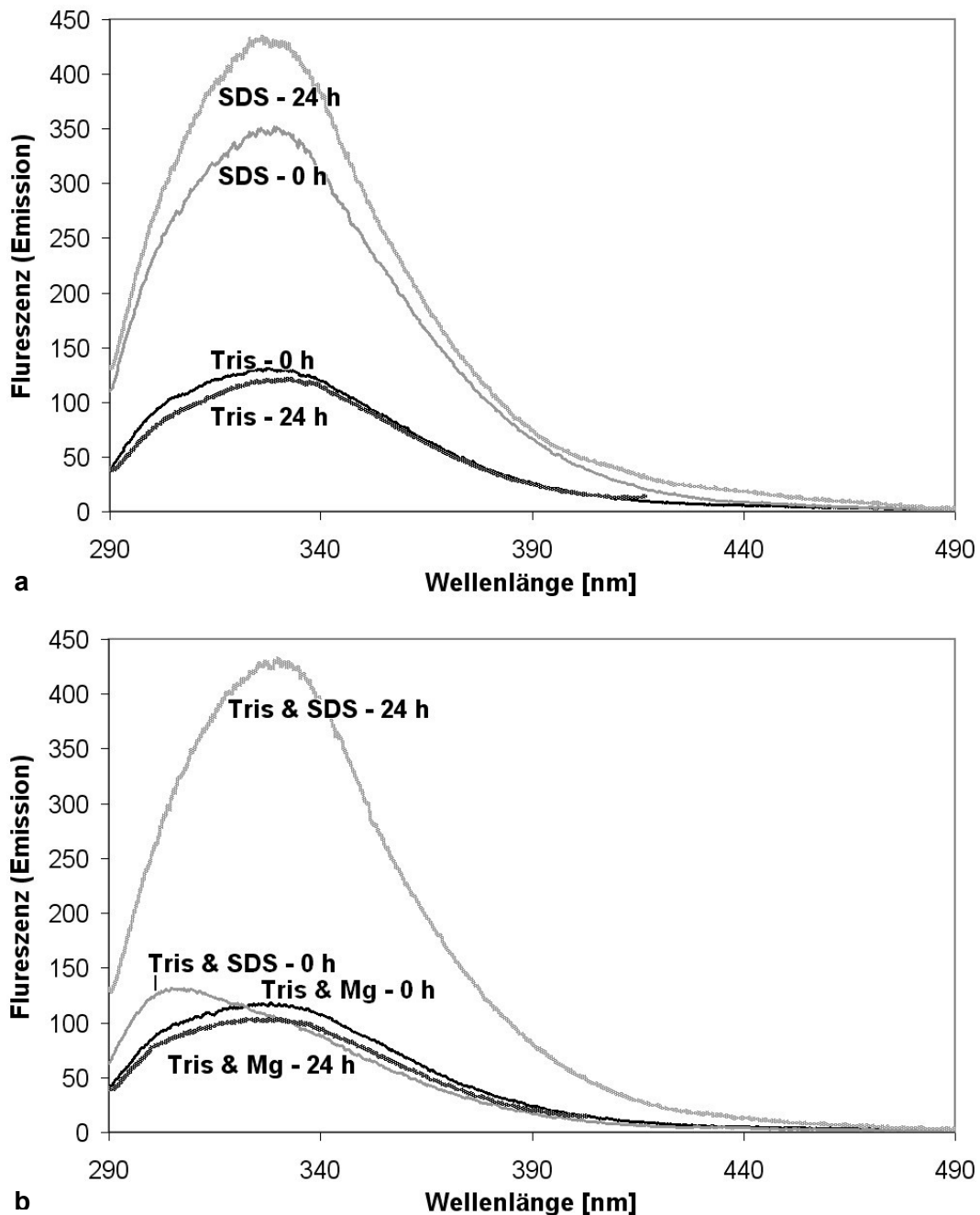


Abbildung 87: Fluoreszenzspektren von *Pandinus imperator*-Hämocyanin in verschiedenen Puffer-Medien.

Hämocyanin von *P. imperator* wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in verschiedenen Puffer-Medien über Nacht bei 20°C inkubiert. Absorption und Fluoreszenz wurden sofort nach Mischen der Lösungen und nach 24 h aufgenommen. Die Absorption bei 280 nm wurde auf einen willkürlichen Wert normiert, die Fluoreszenzwerte mit demselben Normierungsfaktor umgerechnet.

a Emissionsspektren von Hämocyanin in 0,1 M Tris (schwarz) und in Aqua dest. mit 7 mM SDS (grau).

b Emissionsspektren von Hämocyanin in 0,1 M Tris mit 30 mM MgCl_2 (schwarz) und in 0,1 M Tris mit 7 mM SDS (grau).

Andere Kombinationen wie Hämocyanin mit SDS und MgCl_2 oder mit Tris, SDS und MgCl_2 führen in den verwendeten Konzentrationen zum Ausfallen des Proteins.

verschiedenen Kombinationen über Nacht inkubiert. Absorption und Fluoreszenz wurden sofort nach Mischen der Lösungen und nach 24 h Inkubation bei 20°C aufgenommen. Die Absorption bei 280 nm wurde auf einen willkürlich gewählten Wert normiert, die Fluoreszenzwerte mit demselben Normierungsfaktor umgerechnet.

Die Fluoreszenzspektren von Hämocyanin von *P. imperator*-Hämocyanin in Tris-Puffer und in Tris-Puffer mit MgCl_2 (Abbildung 87) verändern sich kaum, die Fluoreszenzintensität hat nach 24 h etwas abgenommen. In einer ungepufferten 7 mM SDS-Lösung kommt es sofort zum Verlust des Sauerstoffs am aktiven Zentrum, sichtbar an der deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität. Dieser Verlust setzt sich während der Inkubation fort; durch den Mangel an Fluoreszenz-Quencher nimmt die Intensität weiter zu. Auch in Tris-gepufferter Lösung führt SDS zu Deoxygenierung und Fluoreszenzzunahme (Abbildung 87b). Interessant, aber noch nicht verstanden ist die Form des Graphen direkt zu Beginn der Inkubationszeit: Das Maximum der Fluoreszenzintensität ist hypsochrom verschoben und befindet sich nun bei 305 nm, am Ort des Emissionsmaximums von Tyrosin. Dies ist reproduzierbar für Hämocyanin aus verschiedenen Isolierungen. Ob die Fluoreszenz aller Fluorophore in den kurzwelligeren Bereich verschoben ist und nur zufällig bei 305 nm liegt, oder ob die Fluoreszenz von Tryptophan unterdrückt wird, ist nicht geklärt.

Kombination von SDS und MgCl_2 sowie Tris, SDS und MgCl_2 liefern keine verlässlichen Daten, da wahrscheinlich aufgrund der zu hohen SDS-Konzentration das Hämocyanin beginnt auszufallen.

Um Veränderungen der Sekundärstrukturen zu untersuchen, wurde in Ringer-Lösung gesammeltes, isoliertes und gelagertes Hämocyanin von *P. imperator* eingesetzt. Das Hämocyanin wurde in Ringer-Lösung oder in Tris-Puffer (beide pH 7,8) ohne und mit 30 mM MgCl_2 für 24 h bei 25°C inkubiert. Circular dichroismus-Spektren wurden aufgenommen und mit CDPro 2004 ausgewertet.

In den CD-Spektren (Daten nicht gezeigt) sind keine klar interpretierbaren Unterschiede zwischen der Inkubation in den unterschiedlichen Medien oder Veränderungen nach 24 h festzustellen. Laut Auswertung der Sekundärstrukturen (Tabelle 27) verändert sich bei Inkubation in Ringer-Lösung bei 25°C innerhalb von 24 h nur die β -Faltblatt und α -helikalen Anteile: erstere nehmen zu, der Anteil der Helices nimmt ab. Die Zugabe von 30 mM MgCl_2 verändert an diesen Prozessen nichts. In 0,1 M Tris-Lösung sind so gut wie keine Veränderungen festzustellen, was noch einmal die Ergebnisse der Stabilitäts-Untersuchungen untermauert. Auch die Eignung von Tris-Puffer zur längerfristigen Lagerung von Hämocyanin wird damit bestätigt. Mit 30 mM MgCl_2 im Tris-Puffer nehmen während der Inkubation wiederum α -helikalen Anteil zugunsten β -Faltblätter ab.

Veränderungen in der Sekundärstruktur, die die Fähigkeit des Hämocyanins zum Monophenolumsatz erklären, lassen sich so nicht feststellen. Inkubation in 0,1 M Tris-Puffer, in dem im Gegensatz zu physiologischer Ringer-Lösung enzymatische Aktivität nachzuweisen ist, hat laut CDPro so gut wie keine (messbaren) Konformationsänderungen zur Folge.

Probe	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	random coil
Ringer 0 h	31,7 %	22,4 %	19,5 %	26,4 %
Ringer 24 h	20,8 %	32,1 %	20,2 %	28,5 %
Ringer mit $MgCl_2$ 0 h	33,2 %	19,7 %	20,5 %	26,6 %
Ringer mit $MgCl_2$ 24 h	21,5 %	30,9 %	21,7 %	25,2 %
Tris 0 h	26,5 %	21,3 %	19,8 %	31,5 %
Tris 24 h	23,9 %	25,6 %	20,3 %	30,0 %
Tris mit $MgCl_2$ 0 h	46,3 %	11,0 %	16,4 %	27,1 %
Tris mit $MgCl_2$ 24 h	36 %	20,7 %	16,6 %	26,5 %

Tabelle 27: Sekundärstrukturanalyse von *Pandinus imperator*-Hämocyanin mit CDPro nach Inkubation in verschiedenen Puffer-Medien.

Circulardichroismus-Spektren von *P. imperator*-Hämocyanin wurden von 198 nm bis 260 nm aufgenommen und mit CDPro 2004 ausgewertet. Das Hämocyanin war in Ringer-Lösung gereinigt und aufbewahrt worden. Es wurde in Ringer-Lösung oder in Tris-Puffer (beide pH 7,8) ohne und mit 30 mM $MgCl_2$ für 24 h bei 25°C inkubiert. Jede Probe wurde doppelt angesetzt und doppelt bestimmt, der Puffer-Leerwert wurde abgezogen.

Verwendetes durchschnittliches Aminosäuregewicht von *E. californicum* für *P. imperator*: 114,55 Da.

Bei der mehrfachen Auswertung des gleichen Datensatzes weichen die Ergebnisse von Contin, Selcon3 und CDSSTR im Durchschnitt 0,6 %, maximal 1,5 % voneinander ab.

3.9.5.2 Absorption und Fluoreszenz beim Tyraminumsatz von Hämocyanin

Nachdem weder mit Circulardichroismus- noch mit Fluoreszenzspektroskopie Änderungen am Hämocyanin festgestellt werden konnten, wurde in einem weiteren Experiment versucht, während der Monophenolhydroxylase-Aktivität Zusammenhänge zwischen der Absorptionzunahme (Messung des Tyraminumsatzes mit dem Dopachrom-Assay bei 475 nm) und der Änderung des Fluoreszenzsignals aufzudecken. Die Fluoreszenz wurde bei 310 nm und 326 nm beobachtet, da bei ungefähr diesen Wellenlängen die Emissionsmaxima zu Reaktionsbeginn und -ende liegen (Abbildung 87).

Auffällig bei den Fluoreszenzspektren in Abbildung 88b, aber bereits bekannt, ist die SDS-bedingte hypsochrome Verschiebung des Maximums zu einer Wellenlänge von 305 nm zu Reaktionsbeginn. Im Verlauf der Inkubation verliert das Hämocyanin seinen Fluoreszenz-quencheden Sauerstoff und die Fluoreszenzintensität nimmt zu. Am Ende des Beobachtungszeitraums hat sich die Intensität mehr als vervierfacht, das Maximum liegt wieder bei den gewohnten 326 nm. Die Fluoreszenzemission ist für die beiden Wellenlängen von 305 nm und 326 nm nochmals als Kinetik in Abbildung 88a aufgetragen. Die Deoxygenierung beginnt sofort bei Mischung der Lösungen und ist nach circa 40 min abgeschlossen. Der Tyraminumsatz beginnt nach 20 min; zu diesem Zeitpunkt ist die Deoxygenierung durch SDS-bedingte Konformationsänderung schon zu fast 89 % abgeschlossen. Ein Zusammenhang der Fluoreszenz und des Substratumsatzes kann nicht festgestellt werden.

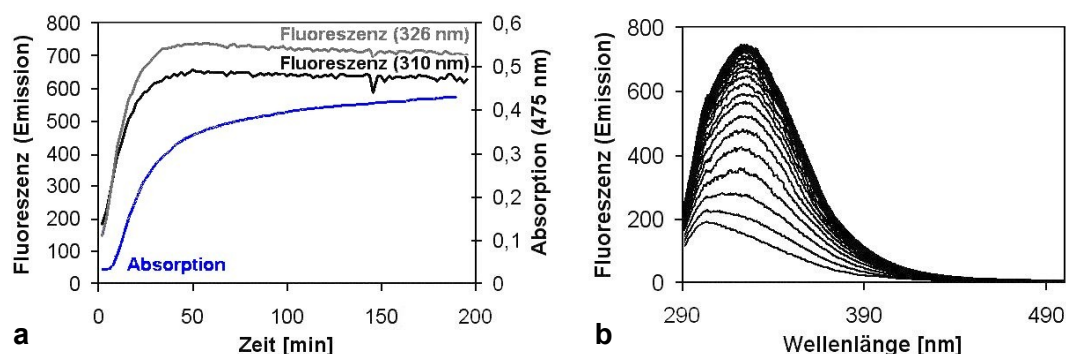


Abbildung 88: Fluoreszenzspektren von *Pandinus imperator*-Hämocyanin beim Tyraminumsatz.

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie und anhand des Dopachom-Assays photometrisch bei 475 nm verfolgt. Die Hämocyanin-Konzentration betrug 0,2 mg/ml; als Substrat wurde 1 mM Tyramin verwendet. Die Reaktion fand in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) mit 2 mM SDS und 30 mM MgCl_2 bei 20°C über einen Zeitraum von 200 min statt.

a Kinetiken der Fluoreszenzemission am Ort des Maximums (zu Beginn und am Ende der Reaktion) und der Absorption (Dopachrom-Assay bei 475 nm).

b Fluoreszenzspektren zeigen die Deoxygenierung und eventuelle Konformationsänderung des aktiven Zentrums.

Fazit

Eine der entscheidenden Fragen beschäftigt sich mit dem Unterschied im aktiven Zentrum des Hämocyanins, der es dem Protein einmal gestattet, Diphenole umzusetzen und ein anderes Mal Monophenole. Als Hauptproblem stellt sich heraus, dass gerade dieser Umsatz von Monophenolen nicht von der Weiterreaktion mit Diphenolen getrennt werden kann.

Insgesamt gilt für Hämocyanin von sowohl *P. imperator* als auch *E. californicum*, dass ein aktives Zentrum, dass Tyramin umsetzen kann, auch ohne weitere Verzögerungen Dopamin umsetzen kann. Einmal in die richtige Konformation für Monophenole gebracht, arbeitet Hämocyanin also als richtige Tyrosinase.

Die Wirkung von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf den Tyraminumsatz scheint eindeutig, muss jedoch diskutiert werden: Die Versuche legen den Schluß nahe, dass sich einige der aktiven Zentren des Hämocyanins im met-Zustand befinden. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu Ergebnisse von Sterner^[194] und Decker^[28].

Der Monophenolumsatz wird durch eine Inkubation mit SDS und der 'richtigen' Puffersubstanz (Tris oder Hepes) ermöglicht. Phosphat-Puffer beispielsweise verhindert die Ausbildung einer Tyrosinase-Funktion im Hämocyanin von *P. imperator*. Auch bei späterer Zugabe der 'richtigen' Puffersubstanz kann keine Cresolase-Aktivität mehr induziert werden. Umgekehrt reicht die bloße Zugabe von Phosphat (als Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4) nicht aus, um die ablaufende Katalyse von Tyramin zu unterbrechen.

Die regulatorische Rolle von Hepes sollte ebenfalls noch eingehend untersucht werden.

Neben der Puffersubstanz kommt Magnesium eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität zu. MgCl_2 und EDTA regulieren die Catecholoxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin wie erwartet, indem Mg^{2+} den Dopaminumsatz verstärkt und EDTA die verstärkende Wirkung rückgängig macht und die Reaktion zum Stillstand bringt. Bei der Cresolase-Aktivität dagegen sind die Ergebnisse weniger eindeutig. So bringt die Entfernung von Mg^{2+} nicht die erhoffte Aktivitätssteigerung. Möglicherweise kann das Hämocyanin nach Konformationseinstellung durch Effektoren auch bei Entfernung des ersten Effektors nicht mehr auf eine spätere Veränderung der Effekorkonzentrationen reagieren.

Ohne den Aktivator SDS kann auch Magnesium selbst die Diphenoloxidase von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin aktivieren. Durch Calcium wird zusätzlich auch noch *L. polyphemus*-Hämocyanin aktiv.

Veränderungen im Hämocyanin, die den Substratumsatz - sei er durch SDS, Puffer oder Kationen ausgelöst - ermöglichen, lassen sich weder durch Absorption, Fluoreszenz oder CD-Spektroskopie eindeutig aufzeigen. Kristallstrukturen von *P. imperator*-Hämocyanin in verschiedenen nativen und aktivierten Zuständen wären wünschenswert.

3.10 Immunabwehr der Cheliceraten

Invertebraten besitzen kein adaptives Immunsystem mit Antikörpern, sondern lediglich das angeborene Immunsystem, die sogenannte „Innate Immunity“^[119-121]. Eindringende Mikroorganismen werden als 'nicht-selbst' anhand von konservierten, für Prokaryoten charakteristischen Oberflächenepitopen erkannt^[96, 121, 122]. Die Immunreaktion der Arthropoden umfasst die Bildung von antimikrobiellen Peptiden, Phagozytose der Pathogene durch Zellen des Immunsystems und Aktivierung des Phenoloxidase-Systems^[67, 96, 128, 235-237]. Zelluläre Effektoren sind für Phagozytose, Knötchenbildung und Melanin-Einkapselung verantwortlich. Auch humorale Faktoren in der Hämolymphe leisten einen Beitrag zur Immunantwort^[116, 124-129]. Antimikrobielle Peptide, die nicht nur bei Invertebraten, sondern bei allen ein- und mehrzelligen Organismen gefunden werden können^[238], bilden die erste Barriere gegen Krankheitserreger.

Der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Phenoloxidase-Aktivität des Häemocyanins von Cheliceraten entsteht durch die Hypothese, dass das respiratorische Protein die Funktion der fehlenden Phenoloxidase^[107, 108, 147] einnimmt: Melanisierungsreaktionen zum Wundverschluss oder zur Abkapselung von Pathogenen beziehungsweise Parasiten ist beispielsweise bei Insekten eine weit verbreitete Aktion des Immunsystems; die intermediären Chinone können zusätzlich bakterizid wirken^[67, 239, 240].

Über das Immunsystem von Spinne ist sehr wenig bekannt^[241, 242]. Neben dem gut erforschten Immunsystem der Xiphosura sind einige Fakten über die biologische Bekämpfung von Milben, die zum Beispiel auf Zitrusplantagen als Schädlinge auftreten können, bekannt^[243]. Arbeiten zur 'Innate Immunity' von Spinnentieren wurden zur Existenz von Lysozym bei *Ixodes ricinus* (Acari)^[244] und *Leioborum rotundum* (Opiliones)^[242] veröffentlicht.

3.10.1 Lysozym

Lysozym ist das erste Enzym, bei dem eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden konnte. Es wurde 1922 von Fleming erstmalig beschrieben, und seine Wirkung wurde nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei Pflanzen belegt^[245]. Seitdem ist Lysozymaktivität auch bei sehr vielen Insekten, anderen Invertebraten, Blütenpflanzen, Pilzen, Bakterien und sogar Bakteriophagen beschrieben worden (Tabelle 28)^[246-251 und andere].

Lysozym ist ein in der Regel konstitutiv exprimiertes Protein. Nach einer Verletzung oder Infektion kann seine Konzentration aber stark ansteigen^[246, 252]. Das Lysozym aus Hühnereiweiß (129 Aminosäuren) ist stark basisch und hat einen isoelektrischen Punkt zwischen 10,5 und 11. Es ist in saurer Lösung hitzebeständig, bei alkalischem pH allerdings instabil. Lysozyme anderen Ursprungs haben bei vergleichbarer biologischer Aktivität häufig eine andere Primärstruktur^[247, 249, 250, 253-256]. Trotzdem finden sich konservierte Faltungsmotive bei

Organismus	Eigenschaften	Referenz
bakteriell		
<i>Bacillus subtilis</i>	12,7 kDa, 117 AS	[257, 258]
pflanzlich		
<i>Ficus glabatra</i> , <i>Ficus dolina</i> , <i>Carica papaya</i>	plant-Typ, 29 kDa	[259] [260]
Echinodermaten		
<i>Asteria rubens</i>	invertebrate-Typ	[255, 261]
Mollusken		
	invertebrate-Typ	[261]
<i>Tapes japonica</i>	13,8 kDa	[262]
<i>Crassostrea virginica</i>	18,4 kDa, 123 AS	[263]
Anneliden		
<i>Nephtys hombergii</i>	goose-Typ	[255]
Myriapoda (Diplopoda, Chilopoda)		
<i>Scolopendra cingulata</i> , <i>Lithobius forficatus</i>	Hämocyten	[264] [265]
Insekten		
	chicken-Typ	[246, 266]
<i>Galleria mellonella</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Bombyx mori</i>	chicken-Typ	[267]
<i>Aedes albopictus</i>	14 kDa, 125 AS	[266]
<i>Manduca sexta</i>	Synthese: Fettkörper Transport: Hämocyten	[265, 268]
<i>Locusta migratoria</i>	Hämocyten, 16,5 kDa	[269]
Crustaceen		
<i>Astacus astacus</i> , <i>Astacus leptodactylus</i> , <i>Procambarus clarkia</i> , <i>Pacifastacus leniusculus</i> , ua.	Hämocyten und Plasma	[270]
Cheliceraten		
<i>Ixodes ricinus</i>	Hämocyten (Granulocyten)	[241]
<i>Dermaceptor virabilis</i> <i>Dermaceptor andersoni</i>	13,9 kDa, 139 AS 13,8 kDa, 139 AS } chicken-Typ	[271]
<i>Ornithodoros moubata</i>	chicken-type, 124 AS, dient als Verdauungsenzym, erste Sequenz bei Cheliceraten	[254]
<i>Leiobunum rotundum</i>	Nephrocyten, chicken-Typ, 14 kDa	[242]

Tabelle 28: Nachweis von Lysozym bei verschiedenen Organismen.

Diese Tabelle erhebt keinesfalls einen Anspruch auf Vollständigkeit; sie dient lediglich einem Überblick und soll die weit verbreitete Existenz von Lysozym verdeutlichen.

Die Einteilung in plant-, chicken-, goose- oder invertebrate-Typ (*p*-, *c*-, *g*- oder *i*-type) Lysozym erfolgt anhand der Sequenz.

verschiedenen Lysozym-Typen^[249]. Aufgrund ähnlichen Tertiärstrukturen von phage-, goose- und chicken-Lysozym gehen Weaver et al.^[250] von einem gemeinsamen Vorläufermolekül aus.

Das Lysozym ist eine *N*-Acetylmuramyl-Hydrolase, die den Mureinsacculus von Gram-positiven Bakterien lysieren kann. Es hydrolysiert als Glykosidase die β -(1,4)-glykosidische Bindung zwischen *N*-Acetylmuraminsäure (MNAc) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc). Das nach außen hin freiliegende Mureinstützskelett von Gram-positiven Bakterien wie zum Beispiel *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis* oder *Micrococcus luteus* wird gespalten, die Zelle platzt.

Zusätzlich besitzt Lysozym eine Chitinase-Aktivität (Chitin besteht ausschließlich aus GlcNAc-Resten, die β -(1,4)-glykosidisch verbunden sind). Die Existenz von Chitinasen kann Lysozym-Aktivität vortäuschen^[272].

Über die Existenz von Lysozym bei Spinnen ist bisher wenig bekannt^[242]. Bei dem Weberknecht *Leiobunum rotundum* konnte Lysozym in den Nephrocyten nachgewiesen werden^[242]. Weiterhin wurde es bei Zecken, wo es unter anderem als Verdauungsenzym wirkt^[241, 271, 273], gefunden. Kürzlich konnte bei der Vogelspinne *Acanthoscurria gomesiana* über eine cDNA-Suche ein Transkript in den Hämocyten mit Ähnlichkeit zu Lysozym entdeckt werden^[108].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich eine Lysozymaktivität auch in der Hämolymphe von *Pandinus imperator* oder *Eurypelma californicum* nachweisen lässt.

Zum Nachweis der Lysozym-Aktivität wurde in K_2HPO_4 -Puffer eine *Micrococcus luteus*-Suspension mit einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,7 bei 450 nm hergestellt. Bei Zugabe einer Lysozym-haltigen Probe wird die β -(1,4)-glykosidische Bindung zwischen *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin gespalten, die Absorption beziehungsweise Trübung bei 450 nm nimmt ab, da die Bakterien zerstört werden.

Die Positivkontrolle (Hämolymphe der Heuschrecke *Locusta migratoria*) zeigt in iterativen Spektren (Abbildung 89b) eine Abnahme der optischen Dichte, bedingt durch die enzymatische Aktivität des Lysozyms, die die *Micrococcus luteus*-Suspension hydrolysiert. Bei der Negativkontrolle ohne Lysozym (Abbildung 89a) bleibt die Absorption während der Versuchsdauer von 10 min konstant, die Bakterien werden nicht hydrolysiert. Spektren mit Hämolymphe von *Pandinus imperator* (Abbildung 89c) oder *Eurypelma californicum* zeigen ebenfalls keine Absorptionsabnahme, die Hämolymphe hat keine lytische Aktivität.

Kinetische Auswertungen (Abbildung 89d) zeigen, dass frische Hämolymphe von *L. migratoria* über sechsmal mehr Aktivität besitzt als tiefgefrorene Hämolymphe. Bei starker Vergrößerung der Grafik (Abbildung 89e) kann bei der Hämolymphe von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* eine minimale Abnahme der optischen Dichte verzeichnet werden, die bei frischer Hämolymphe ebenfalls stärker ist als bei tiefgefrorener ist. Da diese

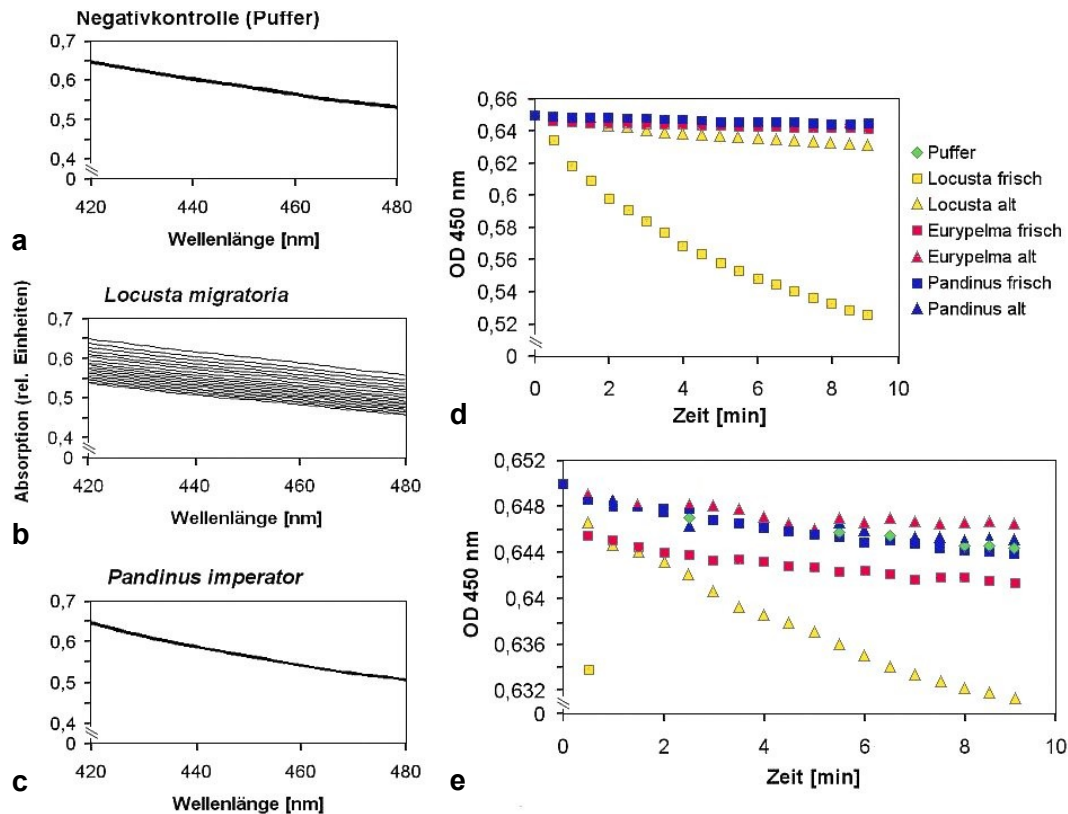


Abbildung 89: Lysozym-Aktivität in der Hämolymphe von Cheliceraten.

Einer Suspension aus *Micrococcus luteus* ($OD_{450\text{ nm}} = 0,62$) in 66 mM K_2HPO_4 -Puffer (pH 6,24) wurde frische oder tiefgefrorene Hämolymphe zugegeben und die Lysozym-beziehungsweise Hydrolase-Aktivität für einen Zeitraum von 10 min bei 17°C bei 450 nm spektroskopisch verfolgt. Iterative Spektren in Abstand von 30 s mit

- a** Puffer als Negativkontrolle.
- b** 90 µl frischer Hämolymphe von *Locusta migratoria* in 910 µl Bakteriensuspension.
- c** 90 µl frischer Hämolymphe von *Pandinus imperator* in 910 µl Bakteriensuspension.
- d** Kinetik der Absorption bei 450 nm für Reaktionsansätze mit 20 µl frischer und aufgetauter Hämolymphe von *L. migratoria*, *E. californicum* und *P. imperator* in 910 µl Bakterien-suspension.
- e** gleiche Abbildung, vergrößert.

Werte aber alle im Bereich der Negativkontrolle liegen, darf nicht von einer signifikanten lytischen Wirkung ausgegangen werden. Dem Skorpion kann der Besitz von bakterizid wirkendem Lysozym in der Hämolymphe demzufolge abgesprochen werden. Bei *E. californicum* ist eine Existenz von Lysozym fraglich, wenn überhaupt ist es nur in sehr geringen Mengen vorhanden.

In einigen Tieren scheint Lysozym nicht konstitutiv, sondern erst nach einer 'bacterial challenge' exprimiert zu werden^[242]. Daher wurde das Immunsystem von *E. californicum* durch Injektion von *Micrococcus luteus* zusätzlich stimuliert: Zwei Spinnen wurde Hämolymphe entnommen und jeweils circa 200 µl Bakterien-Suspension injiziert (0,15 mg/ml, $OD_{450\text{ nm}} = 0,66$). Nach 5 h wurde nochmals Hämolymphe entnommen. Alle Proben wurden auf Lyso-

zym-Aktivität untersucht. Allerdings kam es auch hier nicht zu einer *Micrococcus luteus*-Hydrolyse mit Abnahme der optischen Dichte.

In der Hämolymphe von *E. californicum* und *P. imperator* kann also keine messbare beziehungsweise induzierbare Lysozym-Aktivität beobachtet werden.

3.10.2 Lektine

Lektine sind ubiquitäre, komplexe Glykoproteine. Sie können spezifisch an die Zellmembran binden. Von dort lösen sie biochemische Reaktionen aus. Im Immunsystem beeinflussen sie die Agglutination von Zellen (daher die alte Bezeichnung Hämagglutinine), die über die auf Zelloberflächen befindlichen Glykolipide oder Zuckerketten vermittelt werden.

Die Hämolymphe von *Eurypelma californicum* und *Limulus polyphemus* wurde auf hämagglutinierende Eigenschaften untersucht. Dazu wurden Schaferythrocyten in einem Puffer aus 10 mM Tris (pH 7,4) und 150 mM NaCl vorsichtig suspendiert und mit Hämolymphe von *E. californicum* oder *L. polyphemus* gemischt und unter langsamem Schütteln für 30 min inkubiert.

Bei beiden Cheliceraten-Lymphen bilden sich aus den Erythrocyten Aggregate, die mit bloßem Auge gesehen werden können. Komponenten in der Cheliceraten-Hämolymphe müssen diese Vertebratenzellen als fremd erkannt haben und erste Abwehrmaßnahmen (Hämagglutininierung) induziert haben.

Gleichzeitig wird deutlich, dass beide Cheliceraten-Hämolymphe keine hämolysierende Aktivität besitzen.

3.10.3 Protease-Inhibitoren

Insektenpathogene Pilze befallen ihre Wirte durch aktives Eindringen entweder durch die Kutikula oder über den Verdauungstrakt und die Darmepithelien. Der Penetrationsvorgang durch die Kutikula lässt sich als eine Kombination von mechanischem Druck und enzymatischen Prozessen charakterisieren ^[274]. *Beauveria bassiana* und *Metarhizium anisopliae*, die bekanntesten unter den entomopathogenen Pilzen, bilden Proteasen, Lipasen und Chitinasen, die die Kutikula abbauen und somit dem Pilz das Eindringen in das Wirtsinnere ermöglichen ^[275]. Nach dem Durchwachsen des Integuments beginnen die Pilze, sich auf Kosten des Wirtsinsektes zu vermehren ^[274]. Die Aufzehrung der Hämolymphe, der Befall lebenswichtiger Organe und / oder die Freisetzung von Toxinen führen, in Abhängigkeit von der Virulenz der Bakterienstämme und der Anfälligkeit des Insekts, nach 3 bis 14 Tagen zum Tod des befallenen Wirtes ^[274].

Entomopathogene Pilze werden oftmals anstelle von chemischen Insektiziden eingesetzt (Tabelle 29). Damit kann die Gefahr für Mensch und Umwelt gering gehalten und die Möglichkeit der Resistenzentwicklung vermieden werden. Die Proteasen der über zahlreiche sys-

tematische Gruppen verteilten Pilze wirken aber nicht nur auf der Kutikula: Für eine Thermo-lysin-ähnliche Metalloprotease aus *M. anisopliae* konnte gezeigt werden, dass sie die phagozytotische Aktivität von Plasmacyten aus *Galleria mellonella*-Larven inhibiert und ihre Ausbreitung und Anheftung verhindert ^[276]. Diese toxischen Proteasen aus *M. anisopliae* können vom Insekt wiederum inhibiert werden. So wurden ebenfalls bei *G. mellonella* zwei Serinprotease-Inhibitoren entdeckt. Diese Inhibitoren konnten erst nach einer Provokation des Immunsystems nachgewiesen werden ^[277].

Um die Hämolymphe von *Eurypelma californicum* ebenfalls auf Protease-Inhibitoren zu untersuchen, wurde der Azocoll-Assay eingesetzt: An das unlösliche Kollagen ist ein Farbstoff gekoppelt. Wird Azocoll durch Proteasen hydrolysiert, so wird der Farbstoff frei und die Testlösung nimmt eine rote Farbe an. Sind Protease-Inhibitoren vorhanden, wird die Spaltung von Azocoll verhindert und die Absorption bleibt gering. Auch die löslichen Hydrolyseprodukte von Azocoll (Peptide und Aminosäuren) führen zu einem Anstieg der Extinktion. Daher erfolgt die Auswertung des Versuchs photometrisch.

Azocoll wird mit Proteasen und Hämolymphe bei 35°C circa 50 min inkubiert, danach wird die Absorption der Überstände bei 520 nm gemessen. Je höher die Extinktion des Ansatzes ist, desto besser konnte Azocoll durch die Proteasen gespalten werden, und umso schwächer ist die inhibitorische Aktivität in der Hämolymphe.

Die Hämolymphe stammt entweder von unbehandelten Spinnen oder von Tieren, deren Immunsystem 24 h zuvor mit 70 µl bis 80 µl LPS-Lösung (2 mg/ml) angeregt worden war. Bei der Kontrolle wird Hämolymphe durch die Protease-Inhibitoren Phenylmethansulfonylfluorid und EDTA ersetzt.

Pilz-Gattung	Einsatz gegen
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mainszünsler, Mehlkäfer, Kartoffelkäfer ⇒ Endotoxin, wird im Darm frei
Beauveria <i>B. bassiana</i>	Getreidewanzen, Maiszünsler, Reiszikade, Apfelwickler, Maikäfer, Dickmaulrüssler, Stechmücke
Culicinomyces	Stechmücken, Kriebelmücken, Schwebfliegen, Zuckmücken und andere Mücken
Entomophthora	Heuschrecken, Dipteren, Coleopteren, Fliegen
Hirsutella	Zitrus-Spinnmilben
Metarhizium <i>M. anisopliae</i>	Zikaden, Dungkäfer, Nashornkäfer, Termiten und 160 weitere Insektenarten ⇒ verschiedenen Proteasen
Verticillium	Blattläuse, Spinnmilben

Tabelle 29: Insektenpathogene Pilze (Auswahl) nach ^[278, 279].

		4	5	6	7	8	9	10	11		
Hmly 20 µl	A	0,20	0,23	0,25	0,26	0,24	0,41	0,05	0,16	Trypsin	Inhibitor 1 mM
Hmly 2 µl	B	0,14	0,12	0,13	0,12	0,15	0,13	0,01	0,09		Inhibitor 10 mM
Hmly 0,2 µl	C	0,58	0,51	0,49	0,50	0,54	0,43	0,11	0,10		Puffer
	D									Thermolysin	
Hmly 20 µl	E	0,27	0,28	0,32	0,34	0,20	0,25	0,70	0,74		Inhibitor 1 mM
Hmly 2 µl	F	0,73	0,74	0,66	0,72	0,63	0,66	0,13	0,10		Inhibitor 10 mM
Hmly 0,2 µl	G	0,70	0,71	0,72	0,70	0,63	0,64	0,13	0,10		Puffer
		Hmly 0 h		Hmly 24 h ⊕		Hmly 24 h ∅		Inhibitor			

Abbildung 90: Azocoll-Assay zum Nachweis von Protease-Inhibitoren.

Das Kollagen Azocoll wird durch Proteasen hydrolysiert. Dabei wird ein roter Farbstoff frei, der bei 520 nm detektiert werden kann. Sind Protease-Inhibitoren vorhanden, wird die Spaltung von Azocoll verhindert und die Lösung bleibt farblos.

Zu 60 µl Azocoll (15 mg/ml in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) und 1 mM CaCl_2) wurden 60 µl Protease und Hämolymphe (20 µl, 2 µl oder 0,2 µl) in ein Gesamtvolumen von 180 µl pipettiert. Die Hämolymphe stammte entweder von unbehandelten Spinnen (Hmly 0 h) respektive von Tieren, deren Immunsystem 24 h zuvor mit 70 µl bis 80 µl LPS-Lösung (2 mg/ml) angeregt worden war (Hmly 24 h). Bei der Kontrolle wurde Hämolymphe durch die Protease-Inhibitoren Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, inhibiert Trypsin) und EDTA (inhibiert die Metalloprotease Thermolysin) ersetzt.

Die Platte wird bei 35°C circa 50 min inkubiert und die Absorption der Überstände gemessen.

Der Assay wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt.

Wie in Abbildung 90 zu sehen, färben sich alle Ansätze rot ein. Größere Mengen an Hämolymphe führen dabei zu einer etwas schwächeren Rotfärbung. Eventuell kann so die Proteolyse von Azocoll durch Thermolysin zum Teil gehemmet werden (Zeile E). In der Hämolymphe könnte demnach ein Metalloprotease-Inhibitor vorhanden sein, der in seiner inhibierenden Aktivität mit der von EDTA (1 mM EDTA < Inhibitor in der Hämolymphe >10 mM EDTA) zu vergleichen ist. Da kein Unterschied zwischen den Ansätzen 0 h und 24 h besteht, muss davon ausgegangen werden, dass dieser Inhibitor nicht nach 'bacterial challenge', sondern konstitutionell exprimiert wird.

Insgesamt konnten die verwendeten Proteasen Trypsin und Thermolysin das Azocoll jedoch erfolgreich spalten und wurden offensichtlich kaum beziehungsweise nicht inhibiert (zum Vergleich: Anfärbung mit den Inhibitoren PMSF und EDTA). Ein effektiver Inhibitor ist also nicht vorhanden. Zwischen den Ansätzen mit Hämolymphe behandelter und unbehandelter Spinnen besteht kein Unterschied. Demnach lässt sich auch durch Stimulation des Immunsystems keine Synthese von Protease-Inhibitoren induzieren.

3.10.4 Antimikrobielle Fragmente aus Hämocyanin

Aus dem Hämolymp-Plasma von zwei Garnelen der Art *Pennaeus vannamei* und *P. stylirostris* können Peptide mit antimikrobieller Aktivität isoliert werden ^[134]. Die drei Moleküle mit Massen von 2,7 kDa (*P. vannamei*), 7,9 kDa und 8,3 kDa (beide *P. stylirostris*) weisen 95 % bis 100 % Sequenzidentität mit der C-terminalen Sequenz des Garnelen-Hämocyanins auf. Vermutlich entstehen diese Peptide durch proteolytische Spaltung des Hämocyanins. Es zeigen sich keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen antimikrobiellen Peptiden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* mit verschiedenen Proteasen verdaut, in dem Bestreben, ebenfalls antimikrobiell wirksame Hämocyanin-Fragmente zu erhalten. Da Hämocyanin ein sehr großes und komplexes Molekül ist, kann davon ausgegangen werden, dass zahlreiche Schnittstellen für Endopeptidasen im Inneren des Moleküls verborgen liegen. Das Reagenz RapiGest wurde daher zur Erleichterung des Verdaus eingesetzt, auch, weil Hämocyanin sehr Protease-resistent ist. RapiGest ist ein mildes Detergenz, das Proteine leicht entfaltet und den Proteasen besser zugänglich macht, ohne das Protein zu modifizieren.

Für den Hämocyanin-Verdau wurde natives und dissoziiertes Hämocyanin eingesetzt; das Hämocyanin wurde zum Teil vor dem Einsatz der Proteasen Hitze-denaturiert, um durch die linearisierte Form alle Schnittstellen erreichbar zu machen. Als Proteasen wurden Trypsin (1800 BAEE Units/mg) und Papain (52 Units/mg) verwendet. Die Ansätze wurden 45 min oder 5 h bei 37°C inkubiert und dann zur Kontrolle auf ein SDS-Gradientengel (Abbildung 91) aufgetragen.

Trypsin mit seinem Molekulargewicht von 24 kDa ist im Gel leicht zu identifizieren; das Detergenz RapiGest ist nicht zu erkennen. Die Zugabe von RapiGest verbessert die Proteinase-Aktivität nicht wesentlich. Die 75 kDa schweren Hämocyanin-Untereinheiten werden besser verdaut, wenn sie zuvor dissoziiert wurden. Wurde das Protein zuvor auch noch denaturiert, kann die Protease am besten arbeiten und die meisten Hämocyanin-Fragmente erzeugen (Abbildung 91 Spur 12).

Die Spaltprodukte einer limitierten Proteolyse durch Trypsin von dissoziierten *E. californicum*-Untereinheiten wurde bereits von Strych untersucht ^[280]. Jede Untereinheit bildet dabei auf der SDS-PAGE ein spezifisches Peptidmuster. So können Proteinbanden mit einem Gewicht um 50 kDa den Untereinheiten *a* und *b* zugeordnet werden. Sie werden weiter gespalten und bilden wiederum Banden bei 40 kDa (Untereinheit *b*) oder 25 kDa bis 23 kDa (Untereinheit *a*) aus. Banden um 40 kDa sind weiterhin den Untereinheiten *c*₂ und *e* zuzuordnen. Banden bei 37 kDa und 33 kDa werden bei der trypsinogenen Proteolyse durch Untereinheit *d*, bei 26 kDa durch Untereinheit *e* und bei 13 kDa durch Untereinheit *c*₂ erzeugt. Weitere Spaltstücke mit weniger als 10 kDa entstehen; sie wurden von Strych nicht untersucht.

Bei dem Verdau mit Papain entstehen mehr Bruchstücke, die schwerer als 10 kDa sind. Es tauchen weniger klar definierte Banden im Gel auf, stattdessen bilden sich durchgehend gefärbte Teilbereiche in den Spuren.

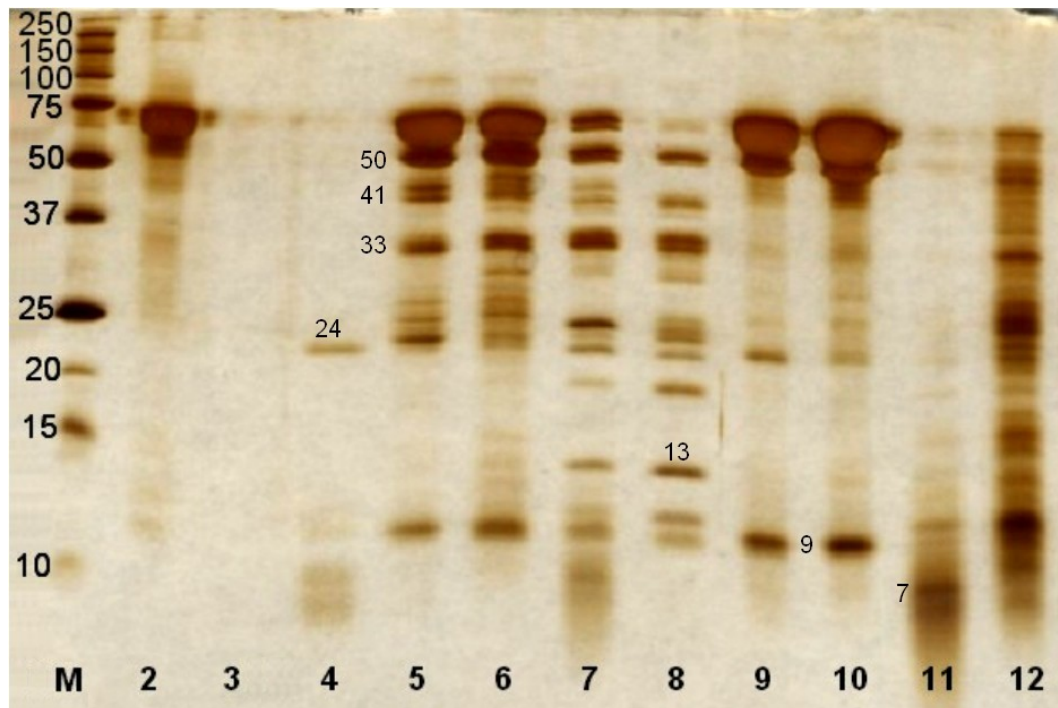


Abbildung 91: SDS-Gradientengel (15 % - 20 %) mit Hämocyanin-Trypsin-Verdau.

Verschiedene Ansätze *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit Protease in $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer verdaut. Die hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen wurde mit diesen Ansätzen untersucht.

Für den Hämocyanin-Verdau wurde natives und dissoziiertes Hämocyanin eingesetzt; das Hämocyanin wurde zum Teil vor dem Einsatz der Proteasen Hitze-denaturiert, um durch die linearisierte Form alle Schnittstellen erreichbar zu machen. Als Proteasen wurden Papain und Trypsin (13 Units/mg) in Konzentrationen von 0,25 mg/ml (13 Units Papain, 450 BAEE Units Trypsin) eingesetzt. Die Verdau-Ansätze bestanden aus 200 µg nativem beziehungsweise 110 µg dissoziiertem Hämocyanin, Enzym und optional 200 µg RapiGest in einem Gesamtvolumen von 40 µl $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer. Die Ansätze wurden 5 h oder 24 h bei 37°C inkubiert und dann bei -20°C gelagert.

Die Molekulargewichte der Marker-Banden (und einiger anderer Banden zur Orientierung) sind in kDa angegeben.

Abgebildet ist ein Gel mit Trypsin-verdauten Ansätzen (Spur 5-12). Hämocyanin-Menge in den Spuren 5-8: 20 µg Spuren 9-12: 6 µg. Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

Spur M: Marker

Spur 2: 7 µg Hämocyanin dissoziiert

Spur 3: 100 µg RapiGest

Spur 4: 4 µg Trypsin

Spur 5: Hc nativ, RapiGest + Trypsin

Spur 6: Hc nativ + Trypsin

Spur 7: Hc dissoziiert, RapiGest + Trypsin

Spur 8: Hc dissoziiert + Trypsin

Vor dem Verdau denaturiert wurden folgende Proben:

Spur 9: Hc nativ, RapiGest + Trypsin

Spur 10: Hc nativ + Trypsin

Spur 11: Hc dissoziiert, RapiGest + Trypsin

Spur 12: Hc dissoziiert + Trypsin

Sowohl dieser Verdau als auch unbehandelte Hämolymphe wurde auf inhibierende Eigenschaft in Bezug auf das Wachstum von Mikroorganismen untersucht. In mit *Eschericia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* oder *Saccharomyces cerevisiae* ausplattierte Agarböden wurden Löcher gestanzt und mit Hämocyanin-Verdau, Hämolymphe oder Lysozym als Positivkontrolle gefüllt.

Das Wachstum der Mikroorganismen kann (ähnlich wie in Abbildung 93) mit verdautem Hämocyanin beziehungsweise Hämocyanin-Fragmenten nicht gehemmt werden. Hemmhöfe bilden sich lediglich um die Positivkontrolle Lysozym. Entweder entstehen durch den Verdau keine antimikrobiell wirksamen Peptide, oder ihre Konzentration ist zu niedrig beziehungsweise das Testsystem nicht geeignet, um sie nachzuweisen.

3.10.5 Immunstimulation zum Nachweis antimikrobieller Peptide

Bei Versuchen an Larven der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* konnte gezeigt werden, dass Injektion von Zymosan oder Hitze-inaktivierter Hefe die Sterblichkeit bei nachfolgender Infektion mit *Saccharomyces cerevisiae* oder dem entomopathogenen Pilz *Beauveria bassiana* herabsetzt oder verzögert ^[277]. Das Immunsystem dieser Tiere muss dergestalt angeregt worden sein, dass nachfolgende Pathogene schneller und effektiver abgewehrt werden konnten.

Um das Immunsystem von *Eurypelma californicum* ebenfalls auf diese Fähigkeit hin zu untersuchen, wurde Spinnen 200 µl *Saccharomyces*-, oder *Micrococcus*-Lösung (Bakterien in expotentielle Wachstumsphase), Zymosan-Überstand (Überstand von 2 mg/ml) oder steriler Eurypelma-Ringer als Kontrolle injiziert. Nach unterschiedlichen Zeitabständen (8 h, 24 h, drei Tagen oder einer Woche) wurde den Spinnen wiederum Hämolymphe entnommen. Da die Tiere die Injektion von fremden Partikeln und lebenden Mikroorganismen überlebt haben, hat ihr Immunsystem diese Pathogene offensichtlich erfolgreich abgewehrt.

Um zu verhindern, dass durch den hohen Druck in Opistosoma der Spinnen injizierte Flüssigkeit sofort wieder austritt, wurden zum Teil Braunülen (blau, G 22, 0,9 mm Durchmesser) verwendet: Die Lösung wurde über die weiche Plastiknadel appliziert und diese dann verschlossen. Um ein Herausrutschen der Braunüle zu verhindern, wurden die Spinnen in

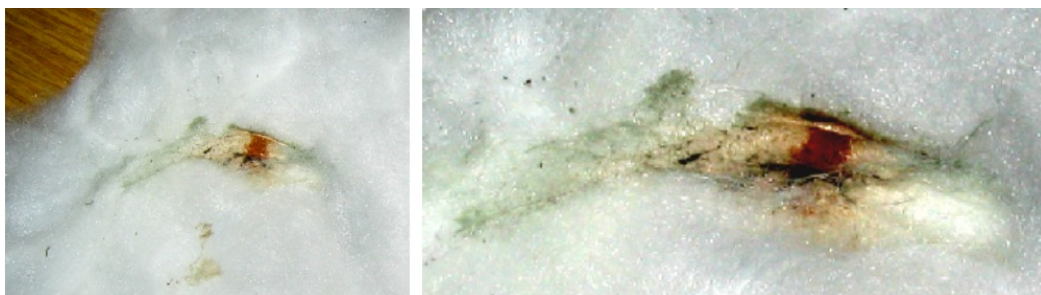


Abbildung 92: Braunfärbung durch Hämolymphe.

Ausgetretene Hämolymphe (blau) verfärbt sich auf Watte über Nacht braun. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Melanisierungsreaktion.

einem kleinen Plastischälchen eingesperrt, das mit Watte ausgestopft war und Bewegung der Tiere verhindern sollte. Trotz diesen Maßnahmen konnten sich zwei Spinnen während der Nacht von den Plastiknadeln befreien. Die kurzfristig austretende Hämolymphe wurde von der Watte aufgesogen (Abbildung 92). Deutlich zu sehen ist die blaue Farbe, die der Hämolymphe durch das oxygenierte Hämocyanin verliehen wird. Interessant ist die teilweise Braunfärbung der Hämolymphe, die möglicherweise durch eine Melanisierungsreaktion entstanden ist.

3.10.5.1 Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen

Die nach 8 h und 24 h entnommene Hämolymphe wurde hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen untersucht. Dazu wurden Agarplatten mit Bakterien oder Hefe ausplattiert und die eingestanzten Löcher mit Hämolymphe gefüllt. Das Wachstum der Mikroorganismen bei 30°C wurde beobachtet.

Obwohl alle Spinnen die injizierten Mikroorganismen unschädlich gemacht haben, kann in ihrer Hämolymphe keine antimikrobielle Aktivität festgestellt werden. Bei Versuchen zur Wachstumshemmung von *E. coli* und *M. luteus* (Abbildung 93) entsteht ein gleichmäßig dichter Bakterienrasen, der nur in Bereichen um die Positivkontrolle Lysozym in seinem Wachstum inhibiert ist.



Abbildung 93: Wachstumshemmung von *Micrococcus luteus* durch die Hämolymphe immunstimulierter Spinnen *Eurypelma californicum*.

Es wurde versucht, das Wachstum von *M. luteus* mit Hämolymphe von Spinnen zu hemmen, die zuvor verschiedene Provokateure des Immunsystems injiziert bekommen hatten. Weder die nach 8 h noch nach 24 h (Abbildung) entnommene Hämolymphe wirkt inhibierend.

Injizierte Provokateure in 1 + 2: Eurypelma-Ringer; 3 + 4: Zymosan-Überstand; 5 + 6: *S. cervisiae*; 7 + 8: *M. luteus*. K: Positivkontrolle Lysozym (5 mg/ml).

3.10.5.2 Hämolymp-Prot-eine – Western Blot

Da in der Hämolymphe in Bezug auf ihre Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen keine Inhibition festzustellen war, wurden die Auswirkungen der injizierten Pathogene in der Hämolymphe beziehungsweise die Hämolymp-Prot-eine selbst untersucht. Dazu wurden wiederum Spinnen mit Zymosan, Hefe oder Eurypelma-Puffer infiziert.

Mit der entnommenen Hämolymphe wurden Western-Blots durchgeführt. Durch diese Methode wird nur das Hämocyanin und keine weiteren Hämolymp-Prot-eine detektiert. Weiterhin können durch Bindung von Hämocyanin-Antikörpern kleinere Hämocyanin-Fragmente sichtbar gemacht werden. Als Primär-Antikörper wurde Kaninchenserum verwendet, dessen Antikörper gegen gereinigtes *E. californicum*-Hämocyanin gerichtet waren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine 7,5%ige SDS-PAGE (pH 8,8), geblottet wurde auf eine Nitrozellulosemembran. Die Detektion und Anfärbung der Primär-Antikörper gegen Hämocyanin erfolgte über einen α -rabbit-IgG-Antikörper mit gekoppelter alkalischer

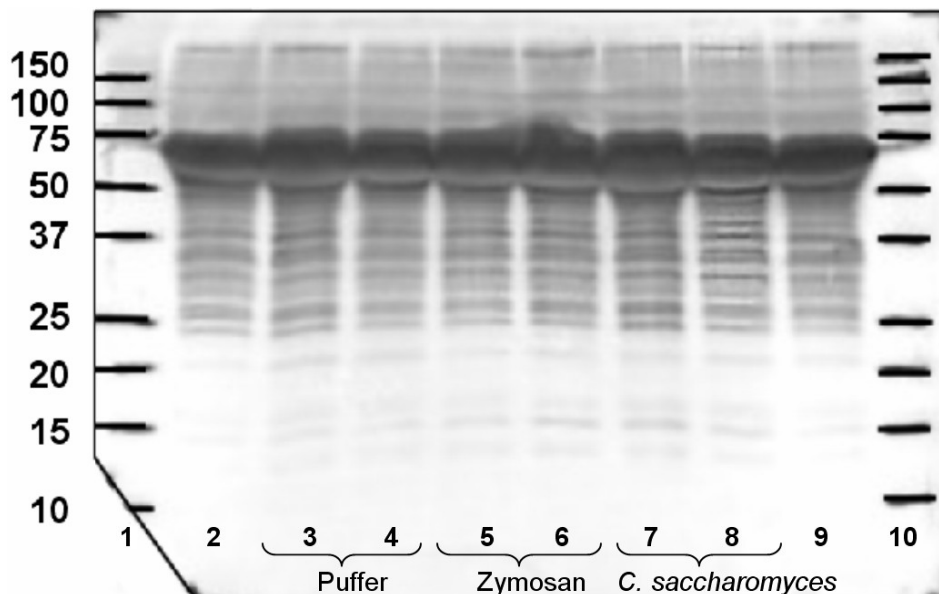


Abbildung 94: Western Blot zur Untersuchung der Hämolymphe von infizierten Spinnen.

Die Proteintrennung erfolgte auf einer 7,5 % SDS-PAGE (pH 8,8). Als Primär-Antikörper wurden Antikörper gegen *E. californicum*-Hämocyanin (Verdünnung 1:1 000) verwendet. Der sekundäre Antikörper war gegen Kaninchen gerichtet (Verdünnung 1:400). Die Anfärbung erfolgt mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase, an α -rabbit-IgG-Antikörper gekoppelt, und den Edukten NBT und BCIP.

Spur 1 und 10: Marker; Spur 2 und 9: unbehandelte Hämolymphe; Spur 3 bis 8: Spinnen mit angeregtem Immunsystem, 20 h nach Injektion von: Spur 3 und 4: Eurypelma-Puffer; Spur 5 und 6: Zymosan; Spur 7 und 8: *Saccharomyces cerevisiae*.

Der Antikörper geht keine unspezifische Bindung an die Markerpoteine ein. Er erkennt jedoch sowohl das Hämocyanin mit den typischen Banden bei circa 75 kDa als auch weitere kleinere Hämocyanin-Fragmente. Das Bandenmuster der Fragmente unterscheidet sich bei den einzelnen Spinnen nicht; lediglich die Stärke der Ausprägung ist etwas ungleich.

Phosphatase, die die enzymatische Redoxreaktion von NBT und BCIP zu unlöslichen blau-violetten Produkten katalysiert.

Die Hämolymphe wurde nach 20 h (Abbildung 94), drei Tagen und einer Woche untersucht (Daten nicht gezeigt). Weder nach 20 h, noch nach einem längeren Zeitraum sind Veränderungen bei den Hämocyanin-Banden zu erkennen. Mit dieser Methode können keine Auswirkungen der Immunstimulation wie zum Beispiel Produktion von antimikrobiellen Hämocyanin-Fragmenten detektiert werden.

3.10.5.3 Hämolymphe-Proteine – Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit einer SDS-PAGE kombiniert wird. Durch diese Kombination kann eine besonders hochauflösende Trennung erreicht und möglicherweise Veränderungen in der Hämolymphe-Zusammensetzung, zum Beispiel durch die Stimulation des Immunsystems neu synthetisierte Abwehrmoleküle, entdeckt werden. Diese Methode ist deutlich empfindlicher als beispielsweise das Western Blotting und ermöglicht auch die Detektion von Proteinen, deren Epitope nicht denen des Hämocyanins entsprechen.

Die Hämolymphe von unbehandelten und LPS-injizierten Spinne wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in Zusammenarbeit mit dem Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Justus-Liebig-Universität Giessen untersucht.

Wie in Abbildung 95 zu erkennen, ergibt vor allem das Hämocyanin (mit einem isoelektrischen Punkt bei circa 6) zahlreiche Protein-Spots, die sich nicht voneinander abgrenzen lassen. Hämocyanin macht circa 85 % des Hämolymphe-Proteins aus, seine Bandenbildung kann nicht vermieden werden. Trotzdem kann nach Vergleich der beiden Proteinmuster in Abbildung 95 festgestellt werden, dass mindestens vier neue Protein-Spots A bis D in der Hämolymphe von LPS-behandelten Spinnen entstehen. Die Tiere haben auf die Stimulation ihres Immunsystems demzufolge mit der Synthese von mindestens vier Proteinketten reagiert. Sie haben eine Masse zwischen 8 kDa und 30 kDa und einem isoelektrischen Punkt pI zwischen vier und acht.

Die Protein-Spots wurden ausgeschnitten und mittels Maldi-TOF analysiert. Spot D kann dabei als C-terminales Fragment der *E. californicum*-Hämocyanin-Untereinheit *f* identifiziert werden.

Die weiteren Spots sind mit Spinnen-Hämocyanin nicht identisch. Sie sollten sequenziert werden.

Die antibakterielle Aktivität der Protein-Spots konnte nicht untersucht werden.

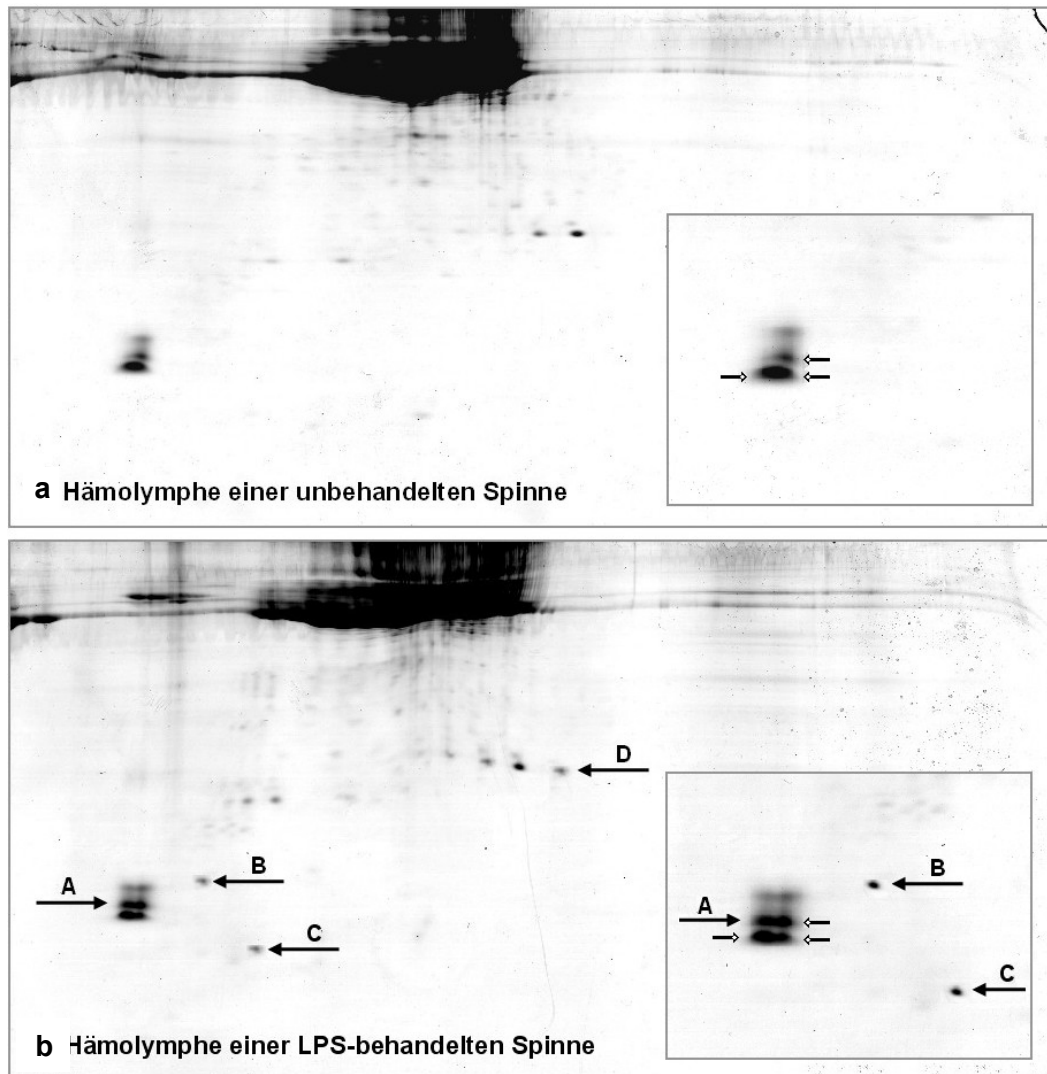


Abbildung 95: Zweidimensionale Gelelektrophorese mit Hämolymphe von *Eurypelma californicum*.

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde die Hämolymphe in einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 11 (von links nach rechts) aufgetrennt; in der zweiten Dimension wurden die Proteine mittels einer SDS-PAGE (Tris-Tricin, 15 %; Färbung mit Coomassie) nach ihrer Größe getrennt.

a Hämolymphe einer unbehandelten Spinne.

b Hämolymphe einer mit LPS-behandelten Spinne. Molekulargewichte und isoelektrischer Punkt (pI) der neuen Hämolymphe-Proteine: A 10 kDa, pI 4; B 12 kDa, pI 4,5; C 8 kDa, pI 5; D 30 kDa, pI 7.

Insert: Vergrößerung der Spots A bis C.

Fazit

Die Innate Immunity der Insekten und der Pfeilschwanzkrebse ist sehr gut untersucht, über das Immunsystem der Spinnen im engeren Sinne dagegen ist kaum etwas bekannt.

Der Nachweis von Lektin in der Hämolymphe der Vogelspinne stellt hier den einzigen erfolgreichen Versuch dar, Übereinstimmungen zwischen den Immunsystemen von Spinnen und Pfeilschwanzkrebsen zu belegen.

Ein Nachweis von Lysozym, antimikrobiellen Peptiden (AMP), immunspezifischen Proteasen oder Protease-Inhibitoren oder anderen Komponenten des Immunsystems konnte nicht erbracht werden. Möglicherweise sind die Ursachen dafür in inadäquaten Testsystemen (antifungale / antibakterielle Peptide) beziehungsweise in nicht ausreichend sensitiven Untersuchungsmethoden zu suchen.

Durch Stimulation des Immunsystems von *Eurypelma californicum* wurden vier neue Protein-Spezies exprimiert, die mittels 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnten. Eines dieser Proteine ist identisch mit einem Fragment der Hämocyanin-Untereinheit *f*. Auf antimikrobielle Aktivität konnten die vier neuen Proteine mit den verwendeten Testverfahren nicht untersucht werden.

4 DISKUSSION

4.1 Aufbau und physikochemische Charakterisierung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Die physiko-chemischen Charakteristika von Skorpion-Hämocyanin waren bisher nur selten der Gegenstand von Untersuchungen. Fast das gesamte Wissen über die 24-meren Hämocyanine der Cheliceraten stammt von dem Blutprotein der Vogelspinne *Eurypelma californicum*.

Strukturelle Daten zu Skorpion-Hämocyanin sind von *Androctonus australis* und *Buthus indicus* bekannt [44, 45, 176]; über das 24-mere Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* veröffentlichten 1989 Heimerl und Decker eine kurze Studie zur Struktur und Funktion [43].

Die hier gewonnenen Ergebnisse zu Quartärstruktur und Untereinheiten-Aufbau, die elektronenmikroskopische Aufnahmen und die Analysen von Daten der analytischen Ultrazentrifugation von *P. imperator*-Hämocyanin decken sich mit den von Heimerl [43, 181] und anderen [44, 45, 176] gewonnenen Resultaten. Untersuchungen dieser Arbeit zeigen Ähnlichkeit zwischen der Sekundärstruktur von Skorpion-Hämocyanin und dem Hämocyanin anderer Arthropoden, vor allem von *Eurypelma californicum*, auf.

4.1.1 Größe, Form und Dimension der Hämolymp-Proteine

4.1.1.1 Nichtrespiratorisches Protein

Einen Großteil des Proteins in der Hämolymphe macht bei Skorpionen und der Vogelspinne *E. californicum* das 24-mere respiratorische Pigment Hämocyanin aus. Bei Größenausschlusschromatographie findet sich in der Hämolymphe der Vogelspinne ein weiteres sogenanntes Begleitprotein, beim Skorpion *P. imperator* können bei guter Trennleistung der Säule sogar zwei Begleitproteine identifiziert werden. Den Begleitproteinen fehlt die für oxygenierte Kupferzentren typische Absorption bei 340 nm.

Das Begleitprotein von *E. californicum* ist nicht direkt an respiratorischen Prozessen beteiligt. Aufgrund verschiedener Charakteristika (keine Dissoziation bei pH 10, Zusammensetzung aus mehreren unterschiedlichen Peptidketten) [281] ist es mit dem Hämocyanin nicht verwandt und unterscheidet sich von diesem respiratorischen Protein durch seine chemische Zusammensetzung [281] (enthält kein Kupfer, andere Zusammensetzung an Aminosäuren und Kohlenhydraten) und seine äußeren Dimensionen (linsenförmige Gestalt, 9,5 nm x 6,5 nm) [282].

Die beiden nichtrespiratorischen Proteine von *P. imperator* bestehen nach Analyse mittels SDS-PAGE aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 264 kDa, 141 kDa und 121 kDa für Begleitprotein 1 und 76 kDa und 72 kDa für Begleitprotein 2, und sind damit

einmal schwerer und einmal leichter als das nichtrespiratorisch Protein von *E. californicum* (116 kDa und 92 kDa).

Das Begleitprotein von *P. imperator* besitzt keine Phenoloxidase-Aktivität. Seine Funktion ist bisher unbekannt. Das Begleitprotein von *E. californicum* dient einer Carbon-Anhydrase von 40 kDa als Carrier-Protein ^[178]. Dieses Zink-haltige Enzym konnte auch bei anderen Spinnen nachgewiesen werden ^[283]. Möglicherweise übernimmt das nichtrespiratorische Protein von *P. imperator* eine ähnliche Aufgabe.

4.1.1.2 Hämocyanin

Skorpion-Hämocyanin ist in der Regel zu einem 24-mer oligomerisiert ^[44, 45, 176, 284]. Auch die beiden Hämocyanine von *P. imperator* und *E. californicum* liegen als 24-mere Protein-Oligomere vor, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen (Abbildung 96). Übereinstimmungen in Gewicht und äußerer Dimension lassen sich durch Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation aufzeigen: Sowohl bei der säulenchromatographischen Reinigung mit Sephacryl S-300 (Abbildung 10) als auch bei analytischer Chromatographie auf einer Superose 6-Säule (Abbildung 11) sind die Elutionsprofile beider Hämocyanine identisch. Alle Versuche lassen den Schluss zu, dass es sich um den Typ eines 24-meren Hämocyanins handelt, wie es zum Beispiel für Hämocyanin aus *E. californicum* beschrieben wurde ^[285, 286]. Aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit 24-meren Hämocyaninen kann man vom gleichen Aufbau der Quartärstruktur mit anderen Skorpion-Hämocyaninen wie von *Androctonus australis*, *Buthus indicus* und *Scorpio*

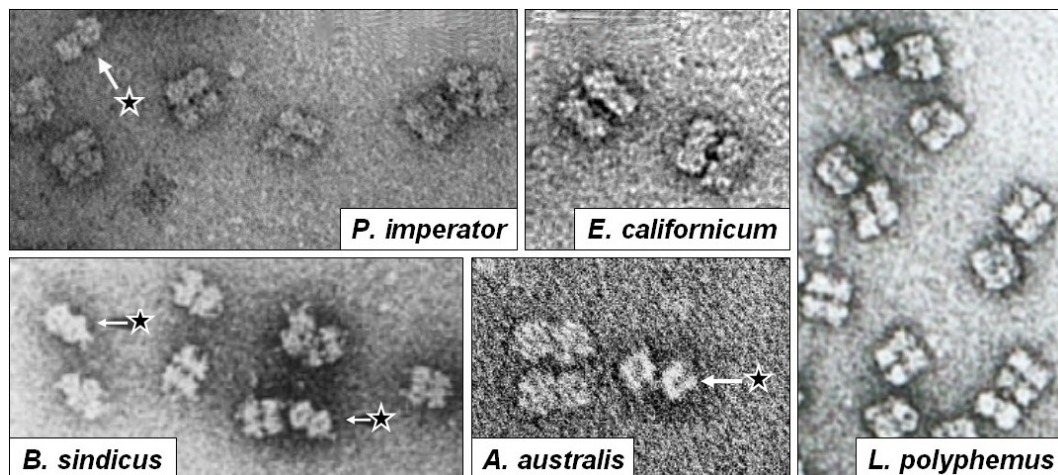


Abbildung 96: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hämocyaninen.

Verschiedene 24-mere Hämocyanine der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und den Skorpionen *Pandinus imperator* (beide Aufnahmen T. Schweikardt), *Buthus indicus* ^[45] und *Androctonus australis* ^[287] sowie das 48-meres Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* ^[288]. Seitliche Aufsicht lässt ein 24-mer wie ein dodekameres Halbmolekül erscheinen (gekennzeichnet durch ★).

Die Hämocyanine entsprechen sich in ihrem Aufbau sowie in ihrer Größe (Sedimentationskoeffizienten der 24-mere sind sich sehr ähnlich; siehe Text).

maurus ^[44, 45, 176, 284], dem Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* ^[177, 285, 286] oder dem Halbmolekül von *Limulus polyphemus* ^[289] ausgehen (Abbildung 96).

Auch hinsichtlich weiterer physikochemischer Daten entspricht *P. imperator*-Hämocyanin bereits bekannten 24-meren Cheliceraten-Hämocyaninen.

Für natives Hämocyanin von *P. imperator* wurde in dieser Arbeit in der analytischen Ultrazentrifuge ein Sedimentationskoeffizient von 37 S ($S_{20, w}$) gemessen (Abbildung 13b). Er deckt sich damit gut mit der Messung von 37,3 S ($S_{20, w}$) von Waschbüsch ^[182] und ist damit geringer als der von Heimerl ^[181] mit 40 S ($S_{20, w}$) gemessene Wert. Er liegt etwas oberhalb des von Markl für *Pandinus pallidus* ^[177, 281] beschriebenen Koeffizienten von 33,7 S (unkorrigiert). Für das Hämocyanin von *Buthus indicus* wird der Sedimentationskoeffizient mit 34 S beschrieben ^[45], für das Hämocyanin von *Androctonus australis* mit 36 S ^[44] beziehungsweise ebenfalls mit 34 S ^[176]. Der 37 S-Wert von *P. imperator* ist nahezu identisch mit dem Sedimentationskoeffizienten von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin, der mit 36,8 S ($S_{20, w}$) von Waschbüsch ^[182] und 36,7 S (unkorrigiert) von Markl ^[177] bestimmt wurde.

Die molekulare Masse wurde von Heimerl ^[181] mit 1,75 MDa beschrieben und von Waschbüsch ^[182] durch die statische Lichtstreuung mit Werten zwischen 1,73 MDa und 1,93 MDa und durch einen Sedimentationsgleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge mit Werten zwischen 1,69 MDa und 1,74 MDa beschrieben.

Bei Untersuchungen im nativen Polyacrylamidgel läuft Hämocyanin von *P. imperator* trotz Übereinstimmung in äußerer Form und Dimension sowie gleichem Molekulargewicht weiter ins Gel ein als Hämocyanin von *E. californicum* (Abbildung 14). Daher ist es wahrscheinlich negativer geladen. Hinsichtlich seiner oligomeren Struktur ist es sehr instabil und zerbricht beim Fehlen von CaCl_2 und MgCl_2 in Gel und Puffer während der Passage durch die Acrylamidmatrix teilweise in seine dodekameren Halbmoleküle. Dieses Auseinanderfallen in 12-meres Hämocyanin ist ein Laborartefakt. Anwesenheit von zusätzlichen Calcium- und Magnesium-Ionen in Trenn- und Sammelgel bewahrt das *P. imperator*-Hämocyanin als stabiles 24-mer (Abbildung 36).

Bei Aktivitätsuntersuchung der Halbmoleküle in der nativen PAGE zeigt sich, dass beide 12-meres enzymatische Aktivität besitzen (zum Beispiel Abbildung 36). Dies ist ein Hinweis darauf, dass im *Pandinus imperator*-Hämocyanin entweder mehr als eine Untereinheit enzymatisch aktiv ist, oder das 24-mer aus maximal zwölf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein kann.

4.1.2 Spektroskopisches Verhalten

4.1.2.1 Absorptionsspektroskopie

In Bezug auf absorptionsspektroskopische Untersuchungen sind die Hämocyanine von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* nahezu identisch. Beide Proteine weisen durch das oxygenierte aktive Zentrum neben dem durch aromatische Aminosäuren verursachten

Maximum bei 280 nm ein charakteristisches Maximum bei 340 nm auf. Es kommt durch das oxygenierten Kupfer zustande und verleiht dem Hämocyanin seine charakteristische blaue Farbe (Absorption bei circa 560 nm bis 580 nm).

4.1.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

In der Literatur können keine Fluoreszenzdaten zu *Pandinus imperator* gefunden werden; es wurden noch keine Fluoreszenzversuche zu diesem Skorpion-Hämocyanin veröffentlicht.

Die Fluoreszenz der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin stellt ein wichtiges Signal für die weitere Analyse zum Beispiel von Deoxygenierung, Konformationsänderungen und Denaturierungsvorgängen des Hämocyanins dar. Die Fluoreszenz der meisten Proteine mit aromatischen Aminosäuren wird durch die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Das Emissionsmaximum dieser Aromaten variiert mit der Polarität der Umgebung, je nachdem ob sie sich im hydrophoben Inneren des Proteins befinden oder nahe der Oberfläche Kontakt mit dem Lösungsmittel haben.

Im Fluoreszenzemissionsspektrum von oxygeniertem *P. imperator*-Hämocyanin zeigen sich zwei Maxima: Ein Maximum bei 304 nm wird durch Tyrosine, das größere Maximum bei 325 nm durch Tryptophane hervorgerufen (bei Anregung $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm in 0,1 M Tris (pH 7,8) und 20°C). Damit unterscheidet es sich von dem Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum*, das nur ein Fluoreszenzmaximum bei 304 nm besitzt. Das Hämocyanin des Skorpions *Leiurus quinquestriatus* dagegen hat (bei Anregung $\lambda_{\text{ex}} = 278$ nm in 0,1 M Tris (pH 7,3) und 20°C) sein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 316 nm ^[290].

Der Unterschied zwischen den Spektren von Skorpion- und Spinnen-Hämocyanin entsteht unter anderem durch die mangelnde Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch den Kupfer-Sauerstoff-Komplex im aktiven Zentrum ^[191, 291-293]. Er scheint darin zu liegen, dass beim Hämocyanin von *Pandinus imperator* einige Tryptophane außerhalb des Försterradius liegen. Eine weitere Ursache ist sicherlich durch die verschiedenen Primärsequenzen gegeben.

Es sei darauf hingewiesen, dass sich trotz identischer Funktion und Ähnlichkeiten in Aufbau sowie äußeren Abmessungen Hämocyanine in Fluoreszenz- und anderen Eigenschaften nicht entsprechen müssen. So weisen die Hämocyanin-Untereinheit *b* von *Eurypelma californicum* und die Untereinheit II von *Limulus polyphemus* nur 52 % Sequenzidentität beziehungsweise 68 % Sequenzhomologie auf ^[8], obwohl sie sich in Bezug auf topologische Lage und Aufgaben im Oligomer sowie enzymatischer Aktivität entsprechen ^[65].

Das Hämocyanin von *E. californicum* unterscheidet sich in der Fluoreszenzspektroskopie in der nativen oligomeren Form von seinen dissoziierten Untereinheiten (Abbildung 97a) ^[186, 191]. Dies ist bei dem Hämocyanin von *P. imperator* nur minimal der Fall, daher kann der Zerfall des 24-mers fluoreszenzspektroskopisch nicht verfolgt werden.

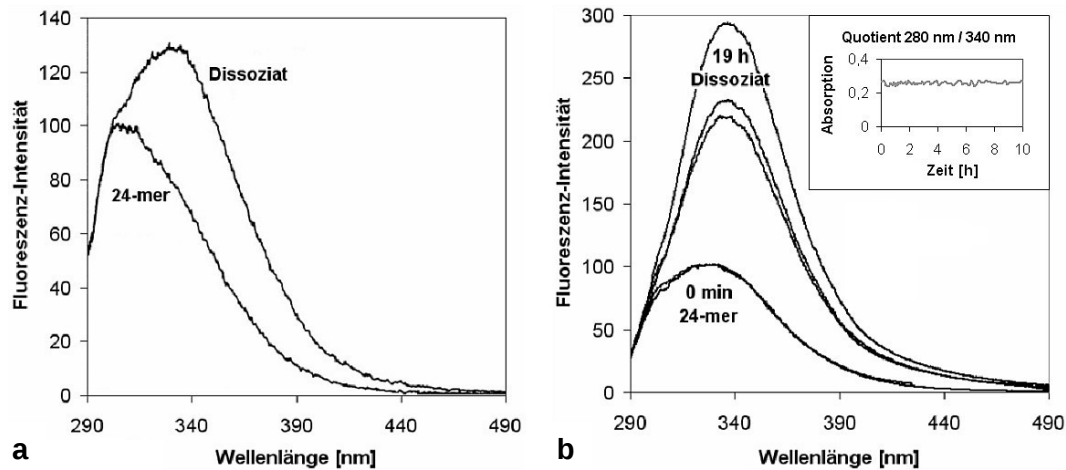


Abbildung 97: Fluoreszenzspektren von nativem Hämocyanin und Dissoziat.

a Fluoreszenzspektren von *E. californicum*-Hämocyanin nativ und Dissoziat. Tryptophane an der Oberfläche einiger Monomere verändern ihre Exposition zum polaren Lösungsmittel bei der Dissoziation und Auflösung des 24-mers, eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) setzt ein.

Protein-Konzentration 0,05 mg/ml, Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ in Eurypelpuffer und 20°C , (aus [186]).

b Hämocyanin von *P. imperator* wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in einem 390fachen Überschuß Dissoziationspuffer inkubiert und die Dissoziation fluoreszenzspektroskopisch ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) verfolgt. Trotz Normierung der Spektren auf gemeinsame Intensität bei 325 nm im nativen Zustand unterscheiden sich die Spektren des Dissoziats von einer Hämocyanin-Präparation zur nächsten.

Insert: Absorptionsquotient $^{340 \text{ nm}} / _{280 \text{ nm}}$. Während der Dissoziation bleibt das Hämocyanin oxigeniert.

Fluoreszenzspektroskopische Daten lassen bereits vor der eigentlichen Trennung der Unterheiten des *Pandinus imperator*-Hämocyanins eine Heterogenität der Monomere vermuten: Verschiedene Hämocyanin-Isolierungen unterscheiden sich qualitativ nicht in ihren Fluoreszenz-Eigenschaften (Lage der Emissionsmaxima verschiebt sich nicht), allerdings bestehen quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Proben. Die Fluoreszenzintensität von nativen Hämocyanin bei 325 nm ist bei identischer Protein-Konzentration unterschiedlich, ebenso schwankt die Fluoreszenzintensität von dissoziiertem Hämocyanin (Abbildung 97b). Die Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute bei Dissoziat, die grob der Fläche unterhalb der Spektren entspricht, mag teilweise darauf zurückzuführen sein, dass nun kein Quenchen der Fluoreszenz durch noch unbekannte Gruppen mehr stattfinden kann.

Die oxy-, deoxy- und reoxy-Fluoreszenzspektren von sowohl *P. imperator*- als auch *E. californicum*-Hämocyanin sind ähnlich (Abbildung 16). Durch die Deoxygenierung verschiebt sich das Emissionsmaximum zu größeren Wellenlängen (bathochromer Effekt). Die Absorption nimmt stark zu, da der quenchende Einfluss von Sauerstoff auf die aromatischen Aminosäuren fehlt, wie dies für *E. californicum*-Hämocyanin sehr gut belegt werden konnte

[291-293]. Nach der Reoxygenierung haben beide Hämocyane wieder die gleichen Absorptions- und Fluoreszenz-Eigenschaften wie vor der Deoxygenierung.

Fluoreszenz der Kutikula

Auch die Skorpione selbst leuchten im UV-Licht (Abbildung 17). Die evolutionäre Ursache für diese Erscheinung ist unbekannt. Wahrscheinlich lässt sich die Fluoreszenz des Exoskeletts auf hydrophobe Phospholipide in der Epikutikula zurückzuführen, die Licht aus dem langwelligen UV-Spektrum reflektieren [294].

Nach Shultz [295] spalten sich die Arachnida in eine Gruppe mit den Palpigradi (Palpenläufer), Acari (Milben), Megaperculata (Geißelskorpionen, Geißelspinnen und Webspinnen) und Ricinulei (Kapuzenspinnen) und in die Scorpiones, Pseudoscorpiones, Opiliones (Weberknechte) und Solifugae (Walzenspinnen) auf. Damit sind die Skorpione näher mit den Walzenspinnen verwandt als mit den echten Webspinnen oder den Vogelspinnenartigen (Araneae). Während die Walzenspinnen wie die Skorpione im UV-Licht fluoreszieren, besitzen Spinnen der Gattung *Eurypelma californicum* diese Fähigkeit nicht.

Kutikula besteht zu 50 % bis 66 % aus Proteinen. Schon 1960 entdeckte Weis-Fogh das Kutikularprotein Resilin, das ein dreidimensionales Netzwerk aus wenig quervernetzten Polypeptidketten bildet, die ungewöhnliche fluoreszierende Tyrosinderivate (Dityrosin, Tertyrosin) enthalten [296]. Stachel [297] konnte 1999 eine Methanol-lösliche Komponente aus Exuvien von *Centuroides vittatus* und *Pandinus imperator* isolieren, die für die Fluoreszenz verantwortlich ist. Es handelt sich dabei um das Tryptophan-Derivat β -Carbolin, wahrscheinlich als einzige Komponente in der Kutikula für diese Photolumineszenz verantwortlich [298]. Frost [299] konnte 2001 in elf weiteren Skorpion-Spezies ein anderes Fluorophor, 4-Methyl-7-Hydroxycoumarin, nachweisen. Diese Fluorophore, deren abgestrahltes Licht im sichtbaren Spektrum zwischen 400 nm und 700 nm liegt, befinden sich in der äußersten, nur 4 μ m messenden hyalinen Exokutikula, eventuell auch in der Mesokutikula [298-300].

Eine evolutionäre Ursache für diese Erscheinung ist unbekannt. Stachel [297] betrachtet das β -Carbolin als Nebenprodukt der oxydativen Quervernetzung während der Aushärtung der Kutikula. Fasel [298] nimmt an, dass die Photolumineszenz der Skorpione keine biologische Rolle spielt. Allerdings wurden mehrere Theorien in Bezug auf die Relevanz dieses Phänomens aufgestellt. Möglicherweise sind die Fluorophore Relikte, die als Sonnenschutz gedient haben könnten [299]. Während die rezenten Skorpione nachtaktiv sind, könnten die Skorpione des Devon tagaktiv gewesen sein und ähnlich wie junge Pflanzen [301] Coumarin zum Schutz vor Sonnenlicht genutzt haben. Kloock [302] wiederum berichtet, dass fliegende Insekten fluoreszierende Skorpione während Vollmond meiden, bei Neumond (minimale Fluoreszenz) ist dies nicht der Fall. Er schließt aus diesem evolutionären Nachteil auf einen noch nicht entdeckten Vorteil. Die Hypothese des erweiterten Sehspektrums oder der innerartlichen Kommunikation wird aufgrund unterschiedlicher Meinungen zur Licht-Wahrnehmungsfähigkeit (in Bezug auf sowohl Vis- als auch UV-Licht) noch diskutiert [300].

4.1.2.3 Circulardichroismus

Die Abschätzung der Sekundärstruktur von *P. imperator*-Hämocyanin wurde mit Circular-dichroismus-Messungen am nativen Protein durchgeführt. Nach Auswertung der CD-Daten mit CDPro ergeben sich 33 % α -helikale Anteile im Protein, 20 % β -Faltblätter, 17 % Turns und 29 % statistisches Zufallsknäuel (Tabelle 13). Das Hämocyanin der Untereinheit 1 von *Buthus indicus* (Bsin 1) besteht ebenfalls aus 33 % α -Helices, 18 % β -Faltblättern, 19 % Turns und 30 % statistisches Zufallsknäuel^[45]. Diese beiden Proteine sind sich in den Anteilen ihrer Sekundärstrukturen nahezu identisch. Weitere Vergleiche mit CD- und kristallographischen Daten von *Palinurus interruptus*, *Palinurus elephas* und *Limulus polyphemus* deuten für das Hämocyanin von *P. imperator* auf einen sehr ähnlichen Aufbau des Moleküls hin. Die Sekundärstruktur des *P. imperator*-Hämocyanins ist wahrscheinlich wie bei anderen Arthropoden-Hämocyaninen in den Domänen I und II hauptsächlich α -helikal, in Domäne III wahrscheinlich ebenfalls ein siebensträngiges β -Barrel^[14, 71].

4.1.3 Aufbau des *P. imperator*-Hämocyanins aus Untereinheiten

In der denaturierenden SDS-PAGE (Tabelle 11 und Abbildung 15) ergeben sich Molekulargewichte von 75 kDa, 70 kDa, 67 kDa und 64 kDa, bei der Untereinheiten-Trennung (Abbildung 23 und Tabelle 17) Molekulargewichte zwischen 72 kDa und 61 kDa für die Untereinheiten des Skorpion-Hämocyanins. Diese Werte sind Mittelwerte von bis zu zehn (für 24-meres Hämocyanin) beziehungsweise sieben (für die Untereinheiten) Datenaufnahmen, die Einzelwerte weichen dabei maximal 4 % beziehungsweise 7 % von den Mittelwerten ab.

Bei Molekulargewichtsbestimmungen in der SDS-PAGE durch Heimerl^[181] werden die Untereinheiten *a* bis *f* mit Molekulargewichten zwischen 69,5 kDa und 78,5 kDa bestimmt.

Dissoziation und SDS-Gelelektrophorese führen bei den Skorpion-Hämocyaninen von *Pandinus pallidus* (Familie Scorpionidae) zu vier Banden, bei dem von *Androctonus australis* (Familie Buthidae) zu fünf Banden^[177] (Abbildung 98). Untersuchungen des Hämocyanins von *Pandinus imperator* (Familie Scorpionidae) ergeben in dieser Arbeit vier Banden, bei Heimerl^[181, 303] zeigen sich sechs beziehungsweise neun gelelektrophoretisch verschiedene Banden. Auch bei der Untersuchung des Hämocyanins der Spinne *E. californicum* werden unterschiedlich viele Banden beschrieben^[diese Arbeit, 177, 181].

Diese Heterogenität bezüglich der Untereinheiten-Banden und ihrer Molekulargewichte ist letztendlich ein Artefakt, da sie nicht durch Unterschiede in der Sequenzlänge erklärbar sind. So werden für Untereinheiten von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mittels SDS-PAGE Massen zwischen 72 kDa und 63 kDa bestimmt, während nach der Sequenzierung^[8] bekannt ist, dass sich die Monomere um maximal fünf Aminosäuren in ihrer Länge und 899 Da in ihrer Masse unterscheiden. Genaue Massen- und Größenangaben für das Hämocyanin von *P. imperator* kann demzufolge nur eine Sequenzierung des Hämocyanins liefern.

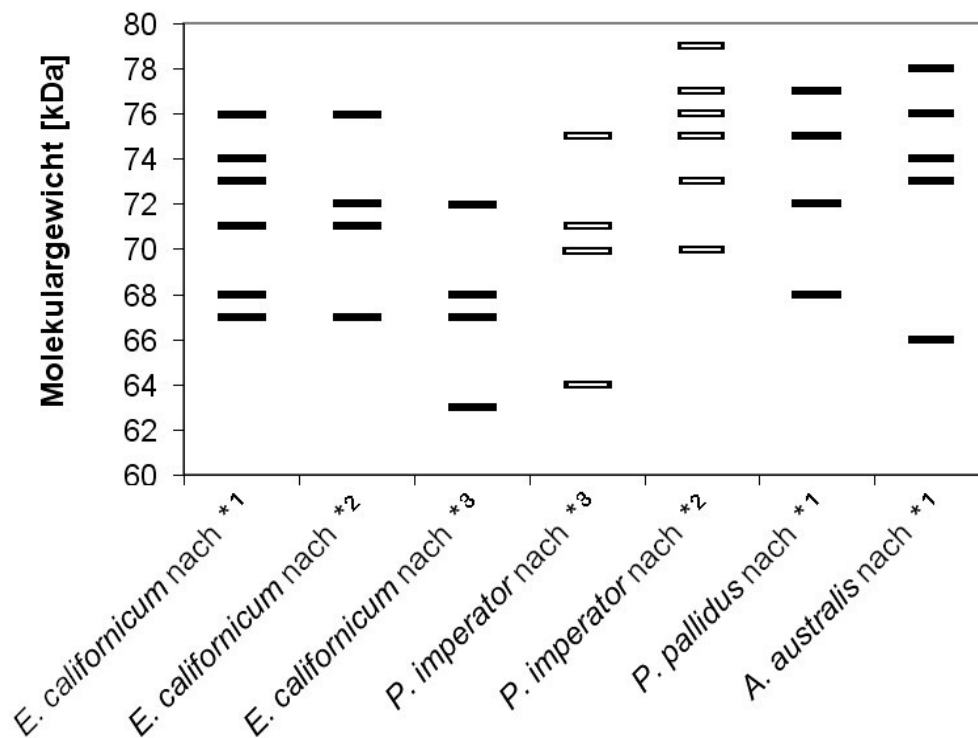


Abbildung 98: Proteinbanden bei SDS-Gelelektrophorese mit denaturiertem Hämocyanin.

Molekulargewichtsbestimmung verschiedener Cheliceraten-Hämocyanine durch denaturierende SDS-Page nach *1 Markl et al. ^[177] *2 Heimerl ^[181] und *3 diese Arbeit.

4.1.3.1 Dissoziation des Hämocyanins

Bei Dissoziation in Dissoziationspuffer zerfällt das Hämocyanin in seine monomeren Untereinheiten, die anhand ihrer Laufstrecke in der nativen PAGE identifiziert werden können (Abbildung 14). Dissoziationsexperimente in Puffern mit verschiedenen pH-Werten zwischen 7,0 und 9,6 und in An- oder Abwesenheit von 20 mM EDTA zeigen, dass die Dissoziation weniger durch den pH-Wert als vielmehr durch einen Mangel der Struktur-erhaltenden Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} ausgelöst wird (Abbildung 19 und Tabelle 14). Sedimentationskoeffizienten und Aggregationsgröße von *P. imperator*-Hämocyanin, das für vier Tage bei verschiedenen pH-Werten inkubiert worden war, liegen ohne EDTA bei circa 36 S (entspricht dem 24-mer), mit EDTA zwischen 3 S und 6 S (Monomere).

Das Hämocyanin zerfällt in der nativen PAGE in seine Halbmoleküle ^[150, 181, 187]. Nach beziehungsweise bei Isolierung aus dem Gel reassoziert das Protein wieder zu einem 24-mer, zwei stabile Dodekamere konnten nicht erzeugt werden. Enzymatische oder andere Untersuchungen an isolierten 12-meren wurden daher nicht vorgenommen.

4.1.3.2 Trennung der Untereinheiten

Markl et al. untersuchten 1979 die Heterogenität der Untereinheiten von Cheliceraten-Hämocyanin: Nach alkalischer Dissoziation entstehen bei *Limulus polyphemus* und *Pandinus*

pallidus monomere Dissoziationsprodukte, die eine Größe von circa 4,5 S haben. Bei *Eury-pelma californicum* und *Androctonus australis* entstehen sowohl 4,5 S-Partikel als auch 6 S-Partikel; letztere stellen Untereinheiten-Dimere dar ^[177]. Bei der Vogelspinne wird dieses kaum trennbare Dimer aus den Untereinheiten *b* und *c* gebildet. Diese Dimer ist für die Verbindung der dodekameren Halbmoleküle verantwortlich ^[304].

Nach der Dissoziation der Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin lösen sich alle Monomere gut voneinander; es existiert kein Dimer (Abbildung 20), wie zum Beispiel die monodisperse Probe bei pH 9,3 mit 20 mM EDTA zeigt (Tabelle 14). Das Fehlen einer solchen stabilen Verbindung begünstigt wahrscheinlich bei mechanischer Belastung und Mangel an den zweiwertigen Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} im Polyacrylamidgel den Zerfall in Dodekamere.

Die dissoziierten Untereinheiten können mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule und einem KCl-Gradienten im Elutionsmittel aus Dissoziationspuffer isoliert werden. Wegen ihrer nahezu identischer Größe können die Untereinheiten nur anhand ihrer Ladung voneinander getrennt werden; die verschiedenen Monomere des *Pandinus imperator*-Hämocyanins eluieren bei unterschiedlicher KCl-Ionenstärke (Abbildung 21b).

Die Erzeugung eines geeigneten Elutionsprotokolls für die Trennung der Hämocyanin-Untereinheiten von *P. imperator* war Teil dieser Arbeit und wurde in mehreren Versionen weiterentwickelt. In Abbildung 21 und Abbildung 99a werden die Verbesserungen im Elutionsprotokoll deutlich. Bei dem ersten Protokoll folgen die Absorptionsmaxima, die durch das eluierte Protein bedingt sind, sehr eng aufeinander. Im Gegensatz dazu sind die Absorptionsmaxima bei der Elution nach Protokollversion neun klar voneinander getrennt. Die einzelnen Proteinfraktionen gehen kaum ineinander über. Eventuell könnte die Untereinheiten-Auftrennung noch verbessert werden. So stellt sich beispielsweise Peak G des Öfteren mit einer Schulter dar; dieses lokale Maximum könnte weiter aus dem Peak G herausgerückt werden.

Bei der Trennung des Hämocyanin-Dissoziats auf einer DEAE-Säule entstehen elf Maxima A bis L reproduzierbar zu den gleichen Zeitpunkten, können in ihrer Höhe, das heißt in der Protein-Konzentration allerdings etwas variieren.

Im Vergleich zu der Untereinheiten-Trennung nach Heimerl ^[181] ist die KCl-Konzentration in den Elutionsgradienten dieser Arbeit niedriger. Eine Erhöhung der KCl-Konzentration im Elutionspuffer führte bei meinen Versuchen allerdings nicht zu einer verbesserten Auftrennung. Es entstehen elf Absorptionsmaxima und damit ein Protein-Peak mehr als bei Heimerl (Abbildung 99). Wahrscheinlich sind die Protein-Peaks 5 6 7 nach Heimerl und D E F oder E F G in dieser Arbeit identisch, da sie sich in Bezug auf Lage im Elutionsprofil und Konzentrationsverhältnissen entsprechen. Hinsichtlich des Elutionsprofils ist eine weitere Zuordnung der Maxima schwierig.

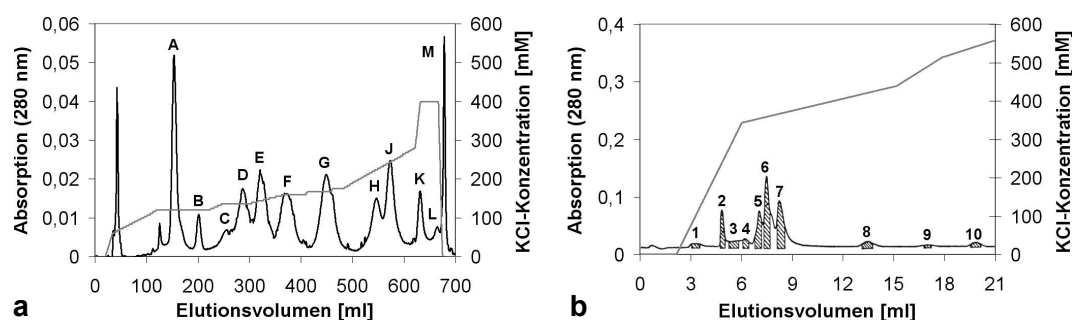


Abbildung 99: Vergleich der Untereinheiten-Reinigung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Die Absorption wurde bei 280 nm (—) aufgenommen; der KCl-Gradient ist in grau (—) dargestellt. Die Absorptionsmaxima werden mit Buchstaben beziehungsweise Ziffern gekennzeichnet.

a diese Arbeit: 16 mg dissoziiertes Hämocyanin auf einer DEAE-Säule, eluiert mit einem KCl-Gradienten in Dissoziationspuffer und einer Flussrate von 2,5 ml/min. Peak M (und weiteres Protein) eluiert nach dem Elutionsprotokoll, zum Teil erst nach mehreren Waschschritten. Das Absorptionsmaximum vor Peak A tritt nicht reproduzierbar auf.

b Heimerl ^[181]: 0,5 mg dissoziiertes Hämocyanin auf einer Anionentauschersäule (Mono-Q, Pharmacia, Freiburg), eluiert mit einem KCl-Gradienten in Dissoziationspuffer mit 1 M Harnstoff und einer Flussrate von 1 ml/min.

Die Hämocyanin-Konzentration in den Fraktionen ist gering; nach 25 Ionenaustauschchromatographien mittels DEAE-Säule standen nur 47 mg Protein zur Verfügung. Zur systematischen Identifizierung und Untersuchung der *P. imperator*-Untereinheiten ist das entwickelte Protokoll geeignet, es sind allerdings zahlreiche Untereinheiten-Trennungen zur Gewinnung einer ausreichend großen Ausgangsmenge an Protein aus den verschiedenen Peaks notwendig.

4.1.3.3 Identifizierung der Untereinheiten mit verschiedenen elektrophoretischen Methoden

Gelelektrophoretische Untersuchungen der elf Untereinheiten-Peaks wurden auf nativen Gradientengelen (Abbildung 22) und denaturierender SDS-PAGE durchgeführt (Abbildung 23). Vor allem bei der SDS-PAGE und der darauf folgenden Molekulargewichtsbestimmung ergeben sich bei verschiedenen Ansätzen leicht abweichende Gewichte für gleiche Banden (Tabelle 17; Mittelwerte aus bis zu sieben Gelen). Sie liegen zwischen 61 kDa und 72 kDa. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Diskrepanz bei der Auswertung mit der Auflösungsfähigkeit analytischer Systeme steigt. Die Unterschiede in den berechneten Gewichten für die einzelnen Untereinheiten betragen durchschnittlich circa 6 %, liegen also unterhalb der Ablesegenauigkeit ohne Software-gestützte Auswertung (Tabelle 11 und Tabelle 17) ^[177, 181, 182].

Die von Heimerl ^[181] isolierten zehn Proteinfractionen ergeben bei gelelektrophoretischen Untersuchungen neun unterscheidbare Untereinheiten-Banden. Bande neun (Abbildung

100b, Spur acht und zehn) lässt sich nur in Verbindung mit Bande vier isolieren; wahrscheinlich handelt es sich demnach um ein Homodimer.

In dieser Arbeit sind die Untereinheiten-Typen *a*, *b*, *c* und *d* sowohl in der nativen als auch in der denaturierenden PAGE schwer bis gar nicht voneinander zu isolieren, und können daher den Elutionspeaks nur schwer zugeordnet werden (Abbildung 100a). Vermutlich enthalten fast alle Peaks mit Ausnahme von H, J, K und L eine oder alle Untereinheiten mit ähnlichem Gewicht wie die der Typen *a*, *b*, *c* oder *d*.

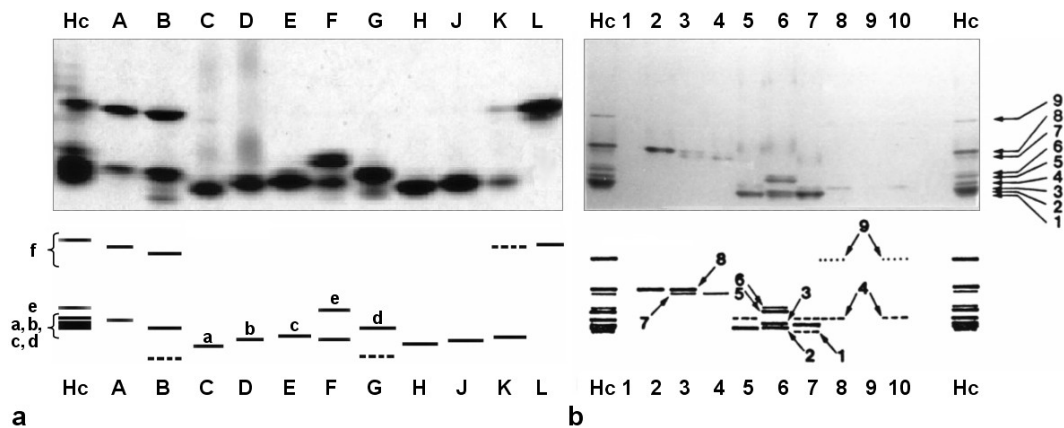


Abbildung 100: Vergleich der isolierten Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin.

Native Gradientengele mit bei der Untereinheiten-Trennung gewonnenen Proteinfractionen.

a diese Arbeit: 2 mg bis 5 mg Protein aus Elution nach Abbildung 99a in der nativen PAGE mit 7,5 % bis 15 % Acrylamid.

b Heimerl ^[181]: Protein aus Elution nach Abbildung 99b, native PAGE mit 10 % bis 15 % Acrylamid.

Bei der Zuordnung der Elutionspeaks zu den Untereinheiten-Typen *e* und *f* unterscheiden sich die Aussagen, die mit nativer und mit SDS-PAGE getroffen werden können: Untereinheit *e* findet sich in der nativen PAGE in Peak F, in der SDS-PAGE in Peak A. Untereinheit *f* findet sich in der nativen PAGE in den Elutionspeaks A, B und L, in der SDS-PAGE in Peak H, J, K und L.

Die Trennung der Untereinheiten von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin wurde von Hübler ^[305] beschrieben. Durch einen zwölfschrittigen Gradient im Elutionsmittel, ebenfalls Dissoziationspuffer mit veränderlichen KCl-Konzentrationen, entstehen bei Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule vier Elutionsgipfel (Abbildung 101a). Durch die Sequenzierung ^[8] weiß man allerdings, dass das Spinnen-Hämocyanin aus sieben verschiedenen Proteinketten besteht. Die Auftragung der Elutionspeaks auf ein Gel (Abbildung 101b) erkennt man, dass sich die Methode nur zum Teil für die Isolation der Monomere eignet: Während die Untereinheiten *d*, *e* und *f* jeweils allein in einem Peak enthalten sind, werden die Untereinheiten *b* und *c* zusammen als Dimer, und die Untereinheiten *a*, *g* und *f* ebenfalls in einem

gemeinamen Peak eluiert (Abbildung 101). Aanhand ihrer unterschiedlichen Laufstrecken in der nativen PAGE können die Monomere von *E. californicum* besser identifiziert werden als bei Hämocyanin von *P. imperator*.

Eine Heterogenität in der Anzahl der Hämocyanin-Untereinheiten wird hier deutlich: Die Anzahl der säulenchromatographisch isolierten Peaks geringer ist als die tatsächliche Anzahl der Untereinheiten.

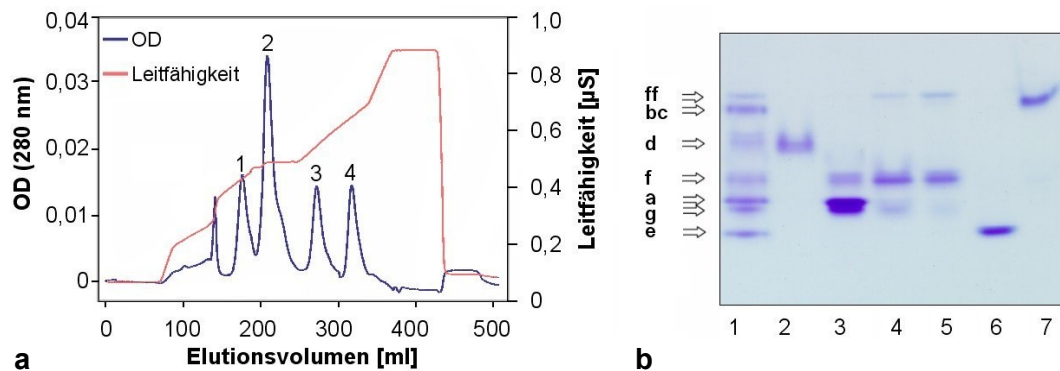


Abbildung 101: Trennung der Untereinheiten von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin.

a Elutionsprofil der Untereinheiten-Trennung (aus ^[305]). Dissoziiertes Hämocyanin wurde auf einer DEAE-Säule mit einem KCl-Gradienten in Dissoziationspuffer eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm aufgenommen und der KCl-Gradient anhand der Leitfähigkeit verfolgt.

b Natives Gradientengel (5 % - 15 %) mit Untereinheitenfraktionen der Ionenaustauschchromatographie (aus ^[305]). Spur 1: Untereinheitengemisch; Spur 2: Peak 1 des Eluats mit Untereinheit d; Spur 3-5: Peak 2 mit Untereinheiten a, f und g und Dimer ff; Spur 6: Peak 3 mit Untereinheit e; Spur 7: Peak 4 mit Heterodimer bc.

Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese dient ebenfalls der Charakterisierung der *P. imperator*-Untereinheiten. Gemeinsame antigene Determinanten werden häufig als Verwandtschaftskriterium eingesetzt. So zeigte sich bei Untersuchungen von Markl ^[47], dass die Untereinheiten einer Art nicht miteinander kreuzreagieren, also nicht verwandt sind, während einige Untereinheiten verschiedener Arten es hingegen sind.

Mit Antikörpern gegen *Pandinus*-Dissoziat und gegen *Pandinus*-24-mer können bis zu neun immunologisch unterscheidbare Untereinheiten identifiziert werden (Abbildung 102b und c). Heimerl ^[181] konnte bei dieser Methode acht Präzipitationsgipfel erkennen (Abbildung 102a). Bei allen Versuchen ergeben sich ähnliche Präzipitationsmuster, wie zum Beispiel ein vorgelagerter Gipfel (bei Heimerl: I), eine Hauptmasse an Präzipitationslinien und ein etwas nachgelagerter Peak (bei Heimerl: VI).

Die meisten dieser Präzipitationskurven gehen nicht ineinander über. Das bedeutet, dass es sich um immunologisch unterscheidbare Untereinheiten handelt, die keine immunologisch feststellbare Verwandtschaft aufweisen.

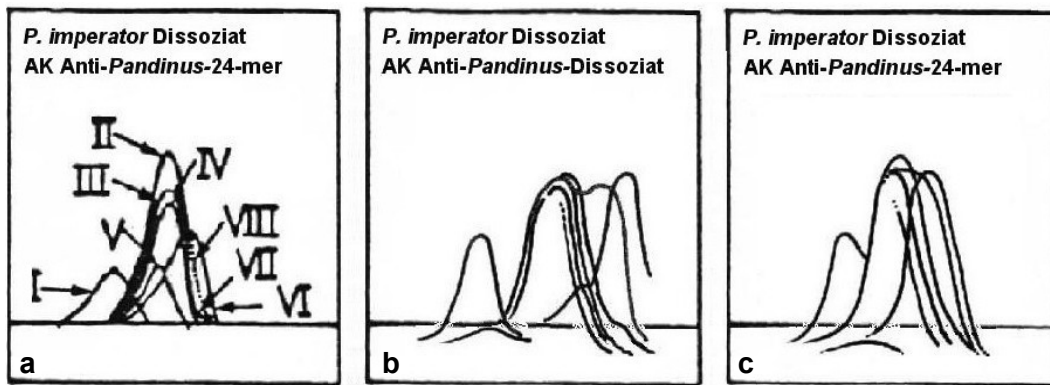


Abbildung 102: Vergleich der zweidimensionalen Immungelektrophorese von *P. imperator*-Hämocyanin.

1. Dimension von links nach rechts, 2. Dimension von unten nach oben. Bestimmung der Anzahl unterscheidbarer Untereinheiten. (a) aus ^[181]; (b) und (c) siehe Kapitel 3.2.3.

Bei Heimerl verschmelzen zwei Präzipitationslinien (VII und VIII) mit Präzipitationsgipfel II. Eine immunologische Verwandtschaft liegt nahe. Auch bei den Versuchen dieser Arbeit verschmelzen jeweils zwei der neun Präzipitationskurven (Abbildung 102b und c), was ebenfalls auf mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den beiden Untereinheiten-Typen schließen läßt. Es könnte sich dabei beispielsweise um die beiden Untereinheiten handeln, die in ihrer Lage den *E. californicum*-Untereinheiten *b* und *c* entsprechen. Diese haben sich im Lauf der Evolution als letzte getrennt und sind am engsten miteinander verwandt (Abbildung 103) ^[6]. Eine solche enge Verwandtschaft könnte auch für die angesprochenen *P. imperator*-Untereinheiten möglich sein. Weiterhin könnte es sich auch um zwei Untereinheiten handeln, die den *E. californicum*-Untereinheiten *d*, *e*, *f* und *g* entsprechen und damit ebenfalls alle relativ eng miteinander verwandt sind.

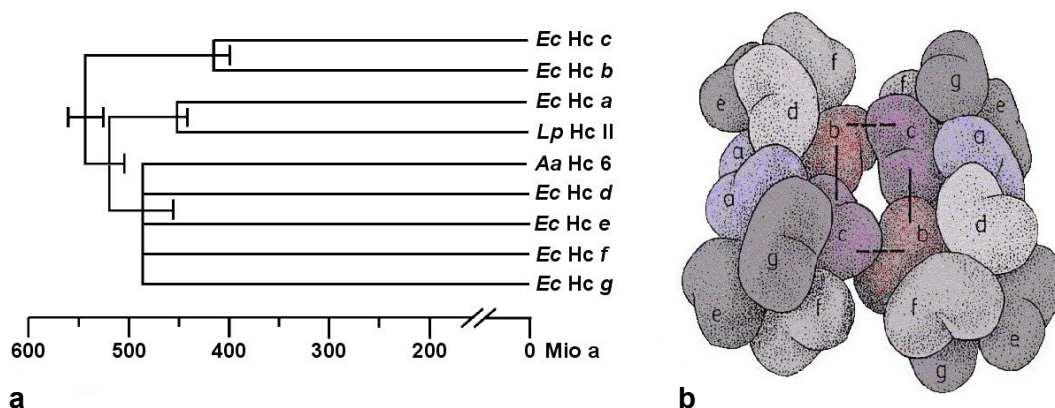


Abbildung 103: Evolution der Hämocyanin-Untereinheiten bei *Eurypelma californicum*.

a Kladogramm: Alter der Hämocyanin-Untereinheiten von *E. californicum* (nach ^[6]). *Ec Hc a - g*: *E. californicum* Untereinheiten *a* bis *g*; *Lp Hc II*: *L. polyphemus* Untereinheit II; *Aa Hc 6*: *Androctonus australis* Untereinheit 6.

b Schematische Zeichnung des Hämocyanins von *E. californicum* (nach ^[2]). Die Untereinheiten *b* und *c* sind einzymatisch aktiv, bei *L. polyphemus* zusätzlich noch die Untereinheit II, deren topologische Lage der *E. californicum*-Untereinheit *a* entspricht ^[65].

Mit Antikörpern gegen isolierte Untereinheiten-Typen von *Eurypelma californicum*-Hämocyanin kann eine Kreuzreaktivität zwischen mit *E. californicum*-Untereinheit *d* und *P. imperator*-Untereinheit *f* festgestellt werden (Abbildung 24d). Eine verwandtschaftliche Beziehung und Homologie bezüglich der Lage im Oligomer ist anzunehmen.

Die angedeuteten immunologischen Verwandtschaftsbeziehungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

Von Skorpion-Hämocyanin ist bisher nur die Sequenzen der Untereinheit 6 von *Androctonus australis* bekannt ^[306], eine Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse von Skorpion-Hämocyanin anhand der Primärstruktur ist daher nicht möglich. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die verschiedenen Untereinheiten-Typen bei *P. imperator* phylogenetisch genauso entwickelt haben wie die bisher untersuchten Cheliceraten-Hämocyanine, ist relativ groß. So zeigt die Untereinheit Aa 6 59 % identische Aminosäuren mit *L. polyphemus* Untereinheit II, 64 % identische Aminosäuren mit *T. tridentatus* Untereinheit α und 65 % identische Aminosäuren mit *E. californicum* *e*. Damit ähneln sich diese Untereinheiten stärker als beispielsweise die Untereinheiten *a*, *d* und *e* von *E. californicum* untereinander (53 % bis 56 % identische Aminosäuren) ^[306]. Zur weiteren Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen wären ausgedehntere Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern erforderlich. Alternativ kann die funktionelle und evolutionäre Ähnlichkeit nach erfolgter Sequenzierung der Untereinheiten durch ein Alignment untersucht werden.

Während Dissoziation und SDS-Gelelektrophorese von *P. imperator*-Hämocyanin zu vier deutlich voneinander abgegrenzten Banden führen, ergeben sich neun immunologisch unterscheidbare Untereinheiten. Untersuchungen von Heimerl ^[181, 303] führen zu acht immunologisch verschiedenen Untereinheiten.

Diese elektrophoretische Heterogenität bei immunologisch identischen Untereinheiten ist nicht artifizuell. So schwankt beispielsweise die Anzahl der Hämocyanin-Untereinheiten beim Pfeilschwanzkrebs *L. polyphemus* mit der Methode ihrer Trennung. Obwohl durch Elektrophorese zwölf und bei der isoelektrischen Fokussierung sogar siebzehn Untereinheiten-Typen getrennt werden können, sind davon nur acht immunologisch unterscheidbar ^[177, 192, 193]. Dieses Ergebnis wird durch eine N-terminale Ansequenzierung der dissoziierten Untereinheiten bestätigt, die ebenfalls acht verschiedenen Untereinheiten-Typen ergibt ^[307]. Bei dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* dagegen entstehen bei Ionenaustauschchromatographie vier Fraktionen ^[305], die insgesamt sieben verschiedene Proteinketten enthalten ^[8]. Die unterschiedliche Anzahl der durch verschiedene Methoden festgestellten Untereinheiten von *Pandinus imperator*-Hämocyanin widerspricht sich demnach nicht. Die Heterogenität bei *P. imperator* könnte zum Beispiel durch verschiedene posttranslationale Modifikationen der gleichen Untereinheiten zustande kommen. Solche Modifikationen existieren bei dem Hämocyanin der Spinne *E. californicum* dagegen nicht ^[114].

Es ist möglich, dass einige Untereinheiten des dissoziierten *P. imperator*-Hämocyanins als Heterodimer von der DEAE-Säule eluieren und durch die mechanische Belastung im Gel zerbrechen, ähnlich wie auch das 24-mere Oligomer in der nativen PAGE zerbricht. Dies wurde bereits durch Heimerl ^[181] beschrieben, und würde die Existenz mehrere Banden bei der elektrophoretischen Auftrennung der Untereinheiten-Peaks erklären (zum Beispiel Abbildung 23 Peak E oder F). Der in Kapitel 3.1.8 beschriebene Auftrennung des *P. imperator*-Dissoziats in Partikel mit ausschließlich einheitlicher Größe macht dies allerdings unwahrscheinlich.

Verschiedene Untereinheiten-Typen spielen bei der Assoziation zum oligomeren Hämocyanin spezifische Rollen ^[47, 308-310]. Die Heterogenität der Hämocyanin-Untereinheiten ist notwendig zur spezifischen Aggregation, um Moleküle mit höherem Oligomerisierungsgrad zu konstruieren ^[177]. Die meisten Untereinheiten von beispielsweise *Eurypelma californicum*, *Limulus polyphemus* oder *Androctonus australis* sind alleine nicht in der Lage, ein Hexamer aufzubauen ^[177]. Versuche mit *E. californicum*-Hämocyanin haben gezeigt, dass alle sieben Untereinheiten notwendig sind, um ein stabiles und kooperatives 37 S-Hämocyanin zu formen ^[25, 38, 180, 311]. Tatsächlich stellten Klarman et al. ^[312] Überlegungen zu der erforderlichen Mindestanzahl von verschiedenen Untereinheiten im Hämocyanin-Oligomer an. Unter der Annahme äquivalenter Positionen ergibt sich für ein hexameres Molekül die Notwendigkeit von mindestens einer Untereinheit, für ein Dodekamer drei, für ein 24-mer vier und für ein 48-mer mindestens fünf verschiedene Untereinheit-Typen. Tatsächlich wird das hexamere Hämocyanin der Jagd-Spinne *Cupiennius salei* aus nur einem Untereinheiten-Typ konstruiert (Arachniden-Typ g), besteht letztendlich aber aus sechs verschiedenen Peptidketten ^[313]. Andere Hexamere wie zum Beispiel Hämocyanin von Langusten (*Palinurus interruptus*, *Palinurus vulgaris*), *Cerax destructor*- oder *Astacus leptodactylus*-Hämocyanin besteht aus zwei bis drei Untereinheiten ^[314-316]. Dodekamere Hämocyanine werden von mindestens zwei oder drei (*Cancer pagurus*, *Astacus leptodactylus*, *Homarus americanus* ^[314]) verschiedenen Untereinheiten gebildet. Das 24-mere Hämocyanin der Skorpione *Leiurus quinquestriatus* und *Heterometrus sp.* besteht aus fünf Untereinheiten ^[312, 317], das der Spinne *Nephila inaurata* aus sechs ^[318], *Eurypelma californicum*-Hämocyanin aus sieben ^[8] und Hämocyanin von *Androctonus australis*, *Scorpio maurus* sowie *Buthus indicus* aus acht Untereinheiten ^[45, 177, 284, 319].

Die Untereinheiten-Heterogenität ist bei den Hämocyaninen der Cheliceraten im Allgemeinen stärker ausgeprägt als bei Crustaceen; ein Zusammenhang zwischen der Aggregationsgröße der Hämocyanin-Moleküle und der Anzahl an verschiedenen Untereinheiten-Typen ist vorhanden ^[193, 314].

Weiterhin ist von *Cancer magister*-Hämocyanin bekannt, dass sich die Zusammensetzung der Untereinheiten-Typen während der Ontogenese verändert. Konstitutiv werden die Typen 1, 2 und 3 exprimiert, die Expression der Untereinheiten-Typen 4, 5 und 6 wird während der Entwicklung reguliert ^[320].

Da dem Hämocyanin unter anderem auch die Funktion eines Speicherproteins zugesprochen wird ^[34], wäre es möglich, dass sich die Zusammensetzung der Untereinheiten des *P. imperator*-Hämocyanin (beispielsweise während des Häutungszyklus) verändert. Dies würde zum Beispiel das Verschwinden des Elutionspeaks B der Untereinheiten-Reinigung erklären.

4.2 Enzymatische Aktivität von Hämocyanin

Im Lauf der Evolution werden essentielle biologische Funktionen konserviert. Die starke Ähnlichkeit und große Übereinstimmung von Arthropoden-Hämocyanin und Tyrosinasen lassen ein gemeinsames Vorläuferprotein vermuten, in dem das zweikernige Kupferzentrum wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden ist ^[321]. Von der entwicklungsgeschichtlich alten Phenoloxidase, die ursprünglich der Sauerstoff-Entgiftung diene, ist die Weiterentwicklung zu dem respiratorischen Pigment Hämocyanin leicht: Durch eine Modifikation in der ersten Domäne wird der Zugang zum aktiven Zentrum für größere Substrate versperrt, während kleine Liganden wie Sauerstoff ihren Weg durch Diffusion finden. Kooperativität und Allosterie können durch weitere Modifikationen und Oligomerisierung erreicht werden ^[75]. Somit kann die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins als funktionelles Bindeglied zwischen Tyrosinasen und Hämocyaninen betrachtet werden.

Hämocyanin und Phenoloxidasen aus Arthropoden scheinen sehr ähnlich aufgebaut zu sein ^[75]. Allerdings unterscheiden sie sich in ihren physiologischen Eigenschaften. Phenoloxidasen sind durch ihre geringe Anzahl geladener Gruppen auf ihrer Oberfläche „sticky enzymes“, während Hämocyanine durch ihrer negative Ladung gut in der Hämolymphe löslich sind ^[75, 217]. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedliche Aminosäuresequenz.

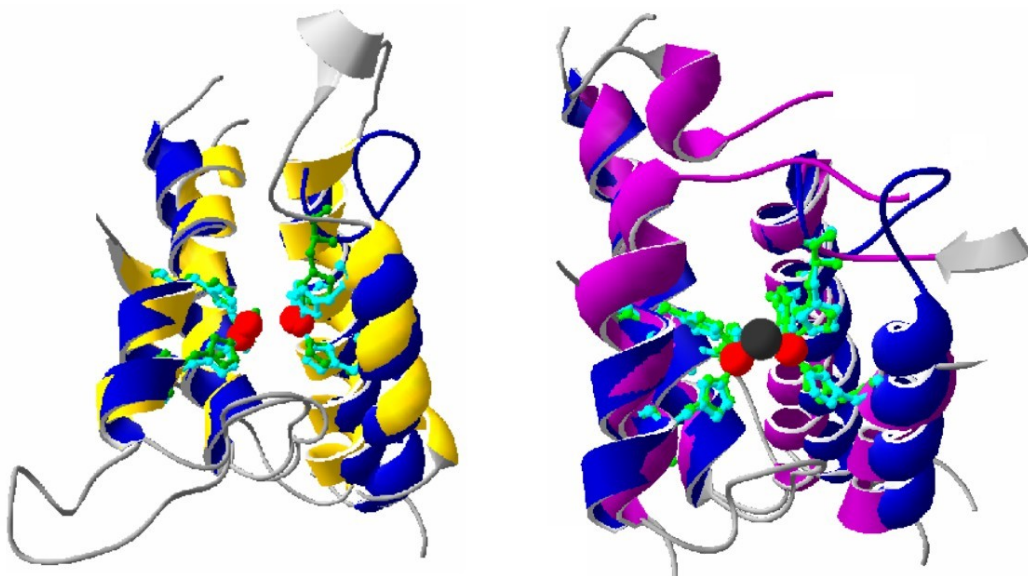


Abbildung 104: Aktives Zentrum von Tyrosinase, Hämocyanin und Catecholoxidase.

a Überlagerung der „four α -Helix bundle“ der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* ^[70] (blau) und des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*-Hämocyanin Unter-einheit II ^[71] (gelb). In der Mitte der vier α -Helices koordinieren sechs Histidine das aktive Zentrum (*L. polyphemus* in hellblau, von *S. castaneoglobisporus* in grün). In rot sind die beiden Kupfer-Atome dargestellt

b Überlagerung der aktiven Zentren der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* (blau) und der Catecholoxidase aus *Ipomoea batatas* ^[73] (violett). Histidine von *I. batatas* in hellblau, von *S. castaneoglobisporus* in grün. Rot sind die beiden Kupfer-Atome mit einem grauen Hydroxid-Ion.

Die Sequenzen der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*, der Catecholoxidase aus *Ipomoea batatas* und des Hämocyanins von *Limulus polyphemus* zeigen nur sehr wenig Übereinstimmungen ^[70]. Im Bereich des aktiven Zentrums sind sich diese drei Proteine in ihrer Struktur allerdings extrem ähnlich (Abbildung 104) ^[55]. Ihre Verwandtschaft und das Hervorgehen aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein werden somit belegt.

Identisches Aussehen der aktiven Zentren legt eine ähnliche Funktionsweise nahe. So konnte eine Phenoloxidase-Aktivität bisher in dreizehn Crustaceen-Hämocyaninen ^[106, 112, 114, 218, 220], dem Hämocyanin von Mollusken (*Octopus vulgaris* ^[111, 198], *Helix pomatia* und *Sepia officinalis* ^[109, 110]) und den Cheliceraten-Hämocyaninen von *Pandinus imperator*, *Eurypelma californicum*, *Tachypleus tridentatus* und *Limulus polyphemus* induziert werden ^[diese Arbeit, 65, 66, 150]. Dabei ist es vor allem aufgrund der oftmals in der Literatur ungenauen Begriffszuweisungen schwierig, zwischen der Catechol- / Diphenoloxidase-Aktivität und der 'echten' Tyrosinase mit sowohl Monophenolhydroxylase- als auch Diphenoloxidase-Aktivität zu differenzieren. Bei fast allen beschriebenen Aktivierungen konnte letztendlich nur eine Diphenoloxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass es sich bei der Diphenoloxidase-Aktivität um eine allgemeine Eigenschaft der Hämocyanine handelt ^[75, 113, 217].

Das ubiquitäre Vorkommen von Phenoloxidase bei Pilzen, Pflanzen und Tieren legt die Vermutung nahe, dass sich dieses Enzym auch in den Gruppen der Arthropoden findet. Bei Crustaceen kommt neben dem Hämocyanin in der Regel in den Hämocyten eine echte Tyrosinase mit Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität vor ^[96, 233]. Ausnahmen scheinen die Riesenassel *Bathynomus giganteus*, bei der keine Tyrosinase nachgewiesen werden konnte ^[218], und andere Isopoden wie *Cirolana harfordi* zu bilden ^[322]. Ebenfalls bei einer Crustacee (*Cyamus scammoni*, Amphipoda) konnte keine Phenoloxidasen-cDNA nachgewiesen werden ^[233].

Auch bei Cheliceraten konnte trotz intensiver Suche keine echte Phenoloxidase nachgewiesen werden ^[65, 107, 147, 291]. Nellaiappan und Sugumaran ^[115] berichteten 1996 zwar von einer Diphenoloxidase in der Hämolymphe von *Limulus polyphemus*. Das beschriebene Enzym stimmt allerdings in seiner Größe, Aktivierbarkeit und anderen Eigenschaften mit Hämocyanin überein. Tatsächlich wurde das „Enzym“ mittlerweile als Hämocyanin identifiziert ^[65, 86, 227]. Ein starker Hinweis der Nicht-Existenz einer Phenoloxidase in Cheliceraten konnte mittlerweile bei der Vogelspinne *Acanthoscurria gomesiana* anhand von cDNA-Untersuchungen erbracht werden ^[108].

Eine Erklärung für die Möglichkeit der Aktivierung von Hämocyanin könnte darin zu suchen sein, dass es bei Cheliceraten den Platz der Phenoloxidase einnimmt. Für die Cheliceraten sind die respiratorischen Proteine von *P. imperator* und *E. californicum* die einzigen Hämocyanin-Spezies, bei denen eine Cresolase-Aktivität bekannt ist. In anderen Tiergruppen ist eine Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins nur für die Crustaceen *Astacus lep-*

todactylus, *Palinurus interruptus*^[114] und die Mollusken *Octopus vulgaris*^[198], *Sepia officinalis* und *Helix pomatia*^[109, 110] bekannt.

Erstmals wurde hier die Monophenolhydroxylase-Aktivität des Hämocyanins aus *Pandinus imperator* genau beschrieben und charakterisiert. Aus der Hämolymphe der Cheliceraten *P. imperator* und *E. californicum* wurde Hämocyanin säulenchromatographisch isoliert. Den Hämocyanin-haltigen Fraktionen konnte eindeutig sowohl Di- als auch Monophenolhydroxylase-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 34 und Abbildung 44).

Diese Ergebnisse zur Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin werden durch Aktivitätsfärbungen im nativen Gel (Abbildung 36 und Abbildung 37) und mit spektroskopischen Methoden (Abbildung 40) bestätigt.

Mittels Absorptionsspektroskopie wird die Bildung von Melanin, beziehungsweise seiner Zwischenprodukte, photometrisch verfolgt; sowohl die Diphenoloxidase- als auch die Monophenolhydroxylase-Aktivität kann durch iterative Spektren klar belegt und die Wirkung von Effektoren wie Puffersubstanzen, pH-Wert und anderer Effektoren beobachtet werden (Kapitel 4.2.4).

4.2.1 Enzymatische Aktivität in verschiedenen Hämocyanin-Präparationen

Die physiko-chemische Charakterisierung des Hämocyanins nach Reinigung von Hämolymphe aus verschiedenen Tieren zeigt es als Protein mit reproduzierbaren Eigenschaften. In den Bereichen Phenoloxidase-Aktivität und Fluoreszenz bestehen allerdings qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Hämocyanin-Präparationen. So können die Ungleichheiten der Fluoreszenzdaten plausibel mit einer unterschiedlichen Untereinheiten-Zusammensetzung, eventuell abhängig von Geschlecht oder Stadium des Entwicklungsbeziehungsweise Häutungszyklus des Skorpions, begründet werden (Kapitel 4.1.3). Dies könnte auch die Ursache für die quantitativen Unterschiede in der SDS-induzierbaren Phenoloxidase-Aktivität sein: Die enzymatische Aktivität des Hämocyanins ist von Präparation zu Präparation unterschiedlich. Die Einzelmessungen der Cresolase- und Catecholoxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin aus verschiedenen Präparationen weichen zum Teil mehr als 25 % vom Mittelwert ab, was nicht mehr mit Schwankungen im Rahmen der Messungenauigkeit erklärt werden kann (Abbildung 51).

Die Unterschiede existieren ausschließlich zwischen Hämocyanin-Proben unterschiedlicher Präparationen, also bei Hämocyanin aus verschiedenen Individuen. Innerhalb einer Messreihe, die selbstverständlich mit Hämocyanin einer Präparation durchgeführt wurde, treten nur minimale Abweichungen, ausschließlich im Rahmen der Messungenauigkeit, auf.

Diese Abweichungen in der Aktivität müssen aber nicht allein auf eine unterschiedliche Untereinheiten-Zusammensetzung zurückgeführt werden. Auch bei dem Vogelspinnen-

Hämocyanin bestehen von Hämocyanin-Isolierung zu Isolierung deutlich messbare Unterschiede in der Aktivität. Mögliche Ursachen für diese Aktivitätsunterschiede bei *E. californicum* wurden von Jaenicke^[114] erforscht. Es konnten keine Unterschiede im Konformationszustand des Gesamtmoleküls, im Dissoziationszustand oder in der Struktur des aktiven Zentrums festgestellt werden. Eine Inhomogenität der Hämocyanin-Proben oder gebundene Substanzen, wie zum Beispiel Effektoren oder Lipide, konnten ausgeschlossen werden. Alle Proben waren hinsichtlich der Anzahl, der Position und der Intensität der Hämocyanin-Banden in der nativen PAGE vollkommen identisch.

Dies gilt auch für die Elektrophorese von *P. imperator*-Hämocyanin und -Dissoziat. Lediglich bei der Trennung der Untereinheiten mittels Ionenaustauschchromatographie (Kapitel 3.2.2) war in einer Hämocyanin-Isolierung Peak B nicht immer zu identifizieren (; was wiederum durch veränderliche Untereinheiten-Zusammensetzung der Probe erklärt werden könnte). Insgesamt scheint der Aktivitätsunterschied beider Hämocyanine im Protein selbst begründet zu sein.

Außer der Stärke der enzymatischen Aktivität variiert bei der Cresolase-Aktivität der Zeitpunkt, zu dem der Substratumsatz beginnt. Zum Teil ist diese Phase wie die Stärke der Aktivität von der Hämocyanin-Präparation abhängig. Empirische Beobachtungen haben aber gezeigt, dass vor allem das Alter des *P. imperator*-Hämocyanins für die Länge der "Verzögerungsphase" verantwortlich ist: Mit zunehmenden Alter der Probe verkürzt sich die "Verzögerungsphase" (Tabelle 25 und Abbildung 47). Bei *P. imperator*-Hämocyanin schwankt sie zwischen circa einer halben und sechs Stunden, bei Hämocyanin von *E. californicum* zwischen einer und sechs Stunden. Der Zeitpunkt, in dem der Substratumsatz beginnt, ist konstant und für jede Messreihe gleichbleibend.

Die einzelnen Experimente (SDS-Abhängigkeit der Aktivierung, Substratumsatz in Abhängigkeit von verschiedenen Effektoren etc.) sind damit zwar nicht direkt quantitativ miteinander vergleichbar, ihre qualitative Aussage bleibt aber bestehen.

4.2.2 Enzymatisch aktive Untereinheiten

Bei den Cheliceraten-Hämocyaninen der Vogelspinne *E. californicum* und des Pfeilschwanzkrebses *L. polyphemus* ist die Catecholoxidase-Aktivität auf bestimmte Untereinheiten-Typen beschränkt^[65]: Die jeweils vier aktivierbaren Untereinheiten bilden in beiden Fällen einen Ring, durch den die vier Hexamere des 24-meren Hämocyanins verbunden werden. Es handelt sich bei der Spinne um das Untereinheiten-Dimer *bc*, beim Pfeilschwanzkrebs um die Untereinheiten V und VI. Beim Hämocyanin von *L. polyphemus* besitzt zusätzlich ein weiterer Untereinheiten-Typ (*Lp II*) Phenoloxidase-Aktivität, dessen strukturelles Äquivalent, Untereinheit *a*, im Hämocyanin von *E. californicum* nicht aktivierbar ist.

Es besteht Grund zu der Annahme, dass das Hämocyanin von *P. imperator* aus bis zu neun verschiedenen Untereinheiten-Typen besteht (Kapitel 4.1.2.3). Aus welcher stöchiometrischen Untereinheiten-Zusammensetzung das Oligomer besteht, kann hier nicht festgestellt werden. Nach bisherigen Erkenntnissen scheinen alle Untereinheiten zumindest Diphenoloxidase-Aktivität zu besitzen. Als Hämocyanin-Dissoziat, das heißt herausgelöst aus der oligomeren Struktur, wird die Aktivität der Untereinheiten schwächer; das Dissoziat kann in der nativen PAGE aufgrund der niedrigeren Substrataffinität nur bei stark erhöhten Konzentrationen Dopamin umsetzen. Dann scheinen alle Untereinheiten zur Katalyse fähig zu sein (Abbildung 37). Vor allem die Untereinheiten *f*, *e* und *a* zeigen in hohen Konzentrationen gut sichtbare Aktivität. Auch in einigen Elutionsfraktionen (Fraktion J, F und eventuell auch in Fraktion G) der *P. imperator*-Untereinheiten-Trennung (Abbildung 22 und Abbildung 38) konnte eine Diphenoloxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Fraktionen enthalten vermutlich die Untereinheiten *e* und weitere aus der Gruppe *a* bis *d*. Sie müssten noch genauer identifiziert werden.

Weder mit den isolierten Untereinheiten noch mit *P. imperator*-Dissoziat (Konzentration bis zu 1,5 mg/ml) gelingt bei photometrischen Versuchen ein Dopaminumsatz. Der Grund dafür ist nicht geklärt. Möglicherweise hilft die Gelmatrix, eine Konformation, die enzymatische Aktivität besitzt, zu stabilisieren. Weiterhin ist die lokale Konzentration an Protein im Gel höher als in einem photometrischen Ansatz.

Bei dem Hämocyanin von *Cancer magister* ist die Aktivität im 6-mer stärker als im 12-mer^[233]. Diese verstärkte Aktivität als Funktion des Konformationswechsels wird auf einen erleichterten Zugang zum aktiven Zentrum für die Substrate zurückgeführt. Tatsächlich haben auch Hämocyanin-Monomere von *Carcinus maenas*, die für Substrat und Aktivator noch einfacher zu erreichen sind, eine stärkere enzymatische Aktivität als das native Hexamer^[112]. Bei dem Hämocyanin von *E. californicum* ist dieser Sachverhalt zum Teil ähnlich (Abbildung 105): Die Diphenoloxidase-Aktivität ist im 24-meren Hämocyanin sehr schwach, etwas stärker ist die Aktivität des Dimers *bc*, im Dissoziat ist die Aktivität schließlich am stärksten. Auch hier erhöht eine bessere Zugänglichkeit des aktiven Zentrums die Aktivität. Natürlich muss bei den Ansätzen berücksichtigt werden, dass nur das native Hämocyanin in einem 0,1 M Tris-Puffer mit pH 7,8 vorliegt, während die anderen beiden Versuchssätzen noch mit 10 mM Glycin und 1 mM EDTA durchgeführt wurden. Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln (4.2.4.1 und 4.2.4.2) diskutiert, kann von einer Veränderung der Aktivität durch den pH-Wert und das Puffer-Medium ausgegangen werden. Trotzdem scheinen die für die Aktivierung von *Cancer magister* und *Carcinus maenas* gewonnenen Erkenntnisse zur Aktivierung^[112, 233] zumindest teilweise auch auf *E. californicum*-Hämocyanin übertragbar zu sein.

Nicht alle Untereinheiten des *E. californicum*-Hämocyanins sind jedoch enzymatisch aktiv, bei Untersuchungen mit Dissoziat wirkt theoretisch eine geringere Menge an SDS auf jede Untereinheit, beziehungsweise bei Experimenten ausschließlich mit *bc* die dreifache Menge

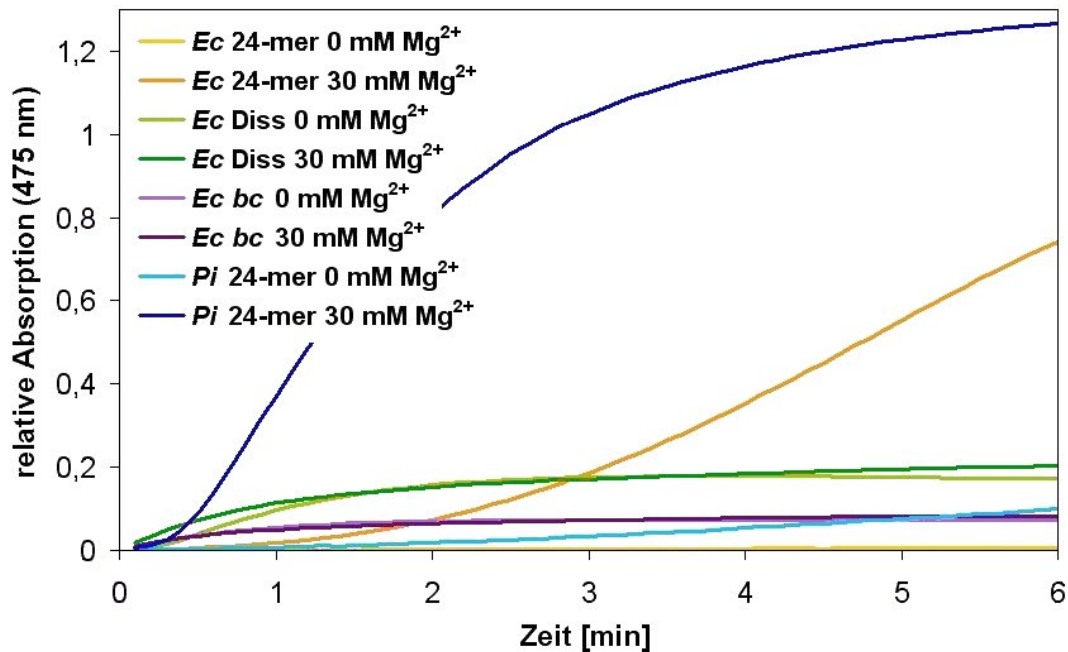


Abbildung 105: Dopaminumsatz von Hämocyanin in verschiedenen Oligomerisierungszuständen.

Relative Aktivität von SDS-aktiviertem Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* in verschiedenen Oligomerisierungszuständen. Absorption auf eine enzymatisch aktive Untereinheit pro Hexamer normiert. Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, sind Experimente mit Hämocyanin verschiedener Präparationen nur bedingt miteinander vergleichbar; trotzdem können allgemeine Trends abgelesen werden.

SDS auf jede aktive Untereinheit. Die nur mittelstarke Aktivität der Versuchsansätze mit *bc* ist somit durch stärkere Denaturierung zu erklären. Für eine optimale Aktivierung müssten demzufolge niedrigere SDS-Konzentrationen eingesetzt werden.

Das Fehlen von enzymatischer Aktivität bei *P. imperator*-Dissoziat bei normalen Konzentrationen könnte darauf hinweisen, dass dort mit den gewählten Aktivierungsbedingungen das Gleichgewicht zwischen optimaler Aktivierung und Denaturierung nicht gefunden wurde, oder dass der Oligomerisierungszustand wichtig ist.

Die katalytische Aktivität des Hämocyanins verändert sich nach Zugabe von MgCl_2 . Die Wirkung von Kationen auf die enzymatische Aktivität soll in Kapitel 4.2.4.3 diskutiert werden.

Da Hämocyanin auch Tyramin umsetzen kann, muss demzufolge mindestens ein Untereinheiten-Typ Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzen. Die in der nativen PAGE entstandenen Halbmoleküle von *P. imperator* besitzen die Fähigkeit zur Cresolase-Aktivität: Die dodekamere Hämocyanin-Bande färbt sich im Gel, wenn auch schwach, zuerst ein (Abbildung 39). Dies geschieht nach circa 1½ h; nach etwa 3 h bildet sich auch bei der Bande mit dem 24-meren Hämocyanin eine Färbung aus. Das 24-mere Hämocyanin ist dann stärker gefärbt (Abbildung 36). Möglicherweise wird das Dodekamer, da seine Konformation erleichterten

Zugang zum aktiven Zentrum bietet, zuerst oder schneller aktiviert, während das 24-mere Hämocyanin stabiler und dann stärker enzymatisch aktiv sein kann.

Außerhalb der Gelmatrix reassoziieren 12-mere sofort wieder zu nativen 24-meren, und konnten daher nicht isoliert untersucht werden. Entweder ist das *P. imperator*-Hämocyanin aus maximal zwölf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, oder mehr als eine Untereinheit ist enzymatisch aktiv. Das Dodekamer scheint die kleinste enzymatisch aktive Einheit der Monophenolhydroxylase darzustellen. Welche Untereinheit genau enzymatisch aktiv ist, konnte nicht festgestellt werden, da weder Dissoziat beziehungsweise isolierte Untereinheiten von *E. californicum* noch von *P. imperator* bei den vorgenommenen Experimenten eine Cresolase-Aktivität zeigten.

Auch andere regulierte Prozesse wie zum Beispiel die Oxygenierung finden bei *P. imperator*-Hämocyanin bereits auf Ebene des Halbmoleküls statt. Die Sauerstoff-Bindung und deren Abhängigkeit von allosterischen Effektoren (beispielsweise Protonen) kann durch das MWC-Modell beschrieben werden^[28]. Die allosterische Einheit ist demnach das 12-mer.

4.2.3 Aktivierung der enzymatische Aktivität

4.2.3.1 Substrate der Phenoloxidase

Zahlreiche Veröffentlichungen, die die Charakterisierung von Arthropoden-Hämocyanin zum Inhalt haben, beschreiben die Substratspezifität. In den meisten Fällen werden dabei ausschließlich Diphenole eingesetzt; damit bleibt unklar, ob das Hämocyanin auch Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzt (Tabelle 23).

Das Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* dagegen wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, sowohl Diphenole als auch Monophenole umzusetzen. Auf eine Beschreibung der Substratkonzentration-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit mit geeigneten Formeln wurde jedoch verzichtet. Die durchgeführten Untersuchungen gehen strenggenommen über die Bestimmung der Spezifität für ein Substrat hinaus, da L-Dopa und Dopamin einerseits und Tyramin, Tyrosin, Methylphenol (*p*-Cresol), 4-*tert*-Butylphenol und 2,4-*di-tert*-Butylphenol andererseits zwei verschiedenen Substratgruppen zugeordnet werden müssen. Das Hämocyanin kann somit als Katalysator angesehen werden, der zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten in sich vereint. Diese können unter verschiedenen Bedingungen getrennt voneinander induziert werden, im Gegensatz zum Beispiel zu der enzymatischen Aktivität echter Tyrosinase, bei denen immer beide Reaktionsschritte (Hydroxylierung und Oxidation) ablaufen.

Für die Gruppe der Diphenole wurden lediglich die beiden Substrate Dopamin und L-Dopa untersucht. Beide Hämocyanine setzen Dopamin deutlich besser um als L-Dopa. Die Färbung ist bei *P. imperator* nach 13 min mit Dopamin circa elfmal stärker als mit L-Dopa, bei *E. californicum* etwa viereinhalbmals stärker (Abbildung 106).

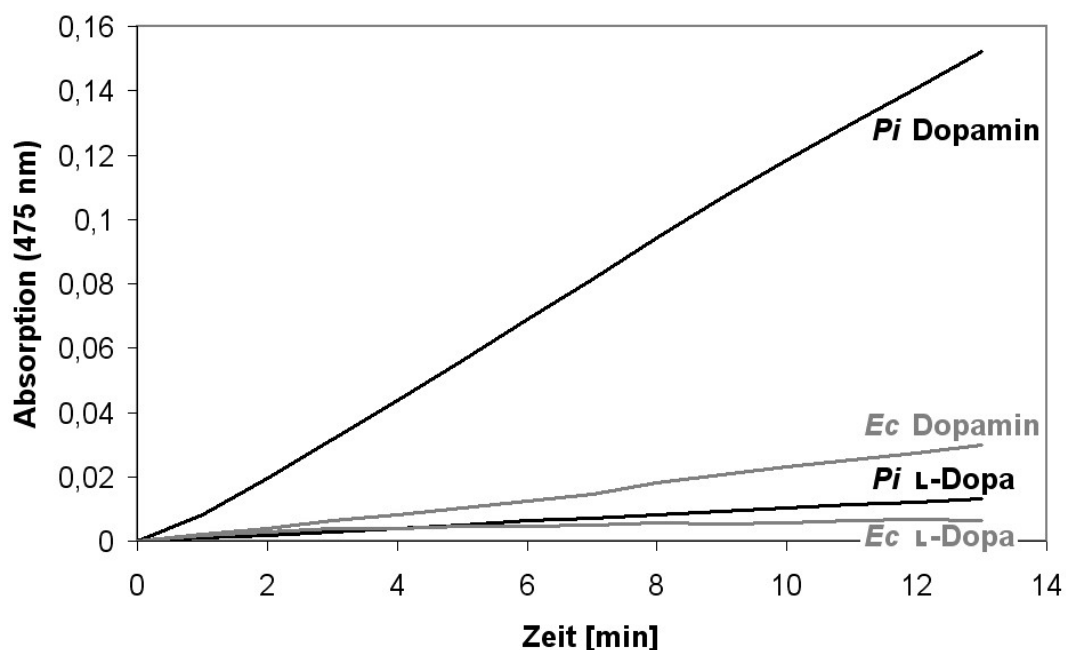


Abbildung 106: Kinetiken zur enzymatischen Aktivität von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit diphenolischen Substraten.

Hämocyanin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer aktiviert. Die Aktivität mit verschiedenen Substraten in einer Endkonzentration von 1 mM wurde bei einer Temperatur von 25°C photometrisch bei 475 nm beobachtet. Weitere Erklärungen siehe Abbildung 46. Substratumsatz durch *P. imperator*-Hämocyanin (Pi) schwarz, durch Hämocyanin von *E. californicum* (Ec) grau.

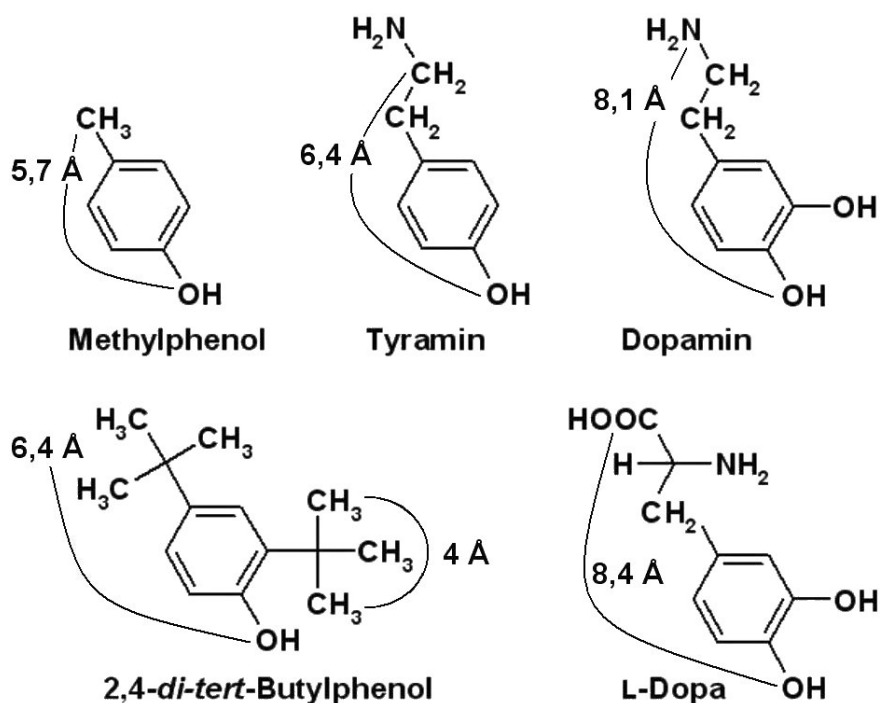


Abbildung 107: Abmessungen verschiedener Substrate für die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin.

Die Dimensionen der verschiedenen Substrate können ausgemessen werden (Abbildung 107), ebenso kann der Abstand zwischen der Oberfläche der Hämocyanin-Domäne II zum Kupfer (9 Å) beziehungsweise bis zum Sauerstoff (8 Å) abgeschätzt werden. Die Gesamtlänge des Substrats Dopamin beträgt ebenfalls circa 8 Å. Wie durch den guten Umsatz belegt, passt das Dopamin in den Zugang zum aktiven Zentrum hinein und kann leicht oxidiert werden. Der Abstand zwischen den Sauerstoff-Atomen des L-Dopas ist geringfügig größer, zudem könnten die Carboxyl- und Amino-Gruppe am Ende des Moleküls sterisch zu einer etwas ungünstigeren Anlagerungen an das aktive Zentrum führen. Dies könnte die geringere Umsatzrate erklären.

Jaenicke^[114] untersuchte die Substratspezifität der Diphenoloxidase-Aktivität von Vogelspinnen-Hämocyanin ausführlicher. Die Stärke der Aktivität hängt unter anderem vom eingesetzten Aktivator (SDS oder Trypsin) ab. Insgesamt werden vor allem *N*-Acetyldopamin und Dopamin sehr gut umgesetzt, weitere Substrate der *E. californicum*-Catecholoxidase sind Catechol, L-Dopa, Adrenalin und Noradrenalin.

Da die Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin hier erstmals beschrieben werden konnte, wurde die Substratspezifität für Monophenole anhand von fünf Substanzen untersucht. Dabei wurden Tyrosin (Daten nicht gezeigt), 2,4-*di-tert*-Butylphenol und 4-*tert*-Butylphenol nicht umgesetzt (Abbildung 108b). Mit Methylphenol dagegen ergibt sich eine deutliche Absorptionszunahme, mit Tyramin fällt die Farbreaktion sogar doppelt so stark aus (Abbildung 108a).

Das Hämocyanin von *E. californicum* kann ebenfalls Methylphenol hervorragend umsetzen, Tyramin (in einem Ansatz ohne Mg^{2+}) dagegen nur schwach; der Umsatz von 2,4-*di-tert*-Butylphenol ist sehr unsicher. Möglicherweise könnte Magnesium, ähnlich wie bei Tyramin, die katalytische Aktivität verstärken. Dahingehende Experimente müssen noch durchgeführt werden. Methylphenol als kleinstes untersuchtes Substrat passt mit knapp 6 Å hervor-

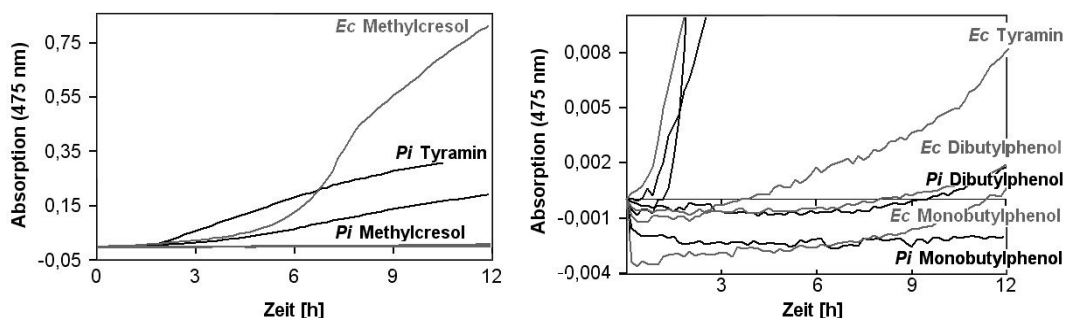


Abbildung 108: Kinetiken zur enzymatischen Aktivität von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit monophenolischen Substraten.

Hämocyanin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit 2 mM SDS in 0,1 M Tris-Puffer aktiviert. Die Aktivität mit verschiedenen Substraten in einer Endkonzentration von 1 mM wurde bei einer Temperatur von 25°C photometrisch bei 475 nm beobachtet. Weitere Erklärungen siehe Abbildung 46. Substratumsatz durch *P. imperator*-Hämocyanin (*Pi*) schwarz, durch Hämocyanin von *E. californicum* (*Ec*) grau.

a Absorptionskinetik mit monophenolischen Substraten.

b Vergrößerung: Absorptionskinetik mit monophenolischen Substraten.

ragend in den Zugang zum aktiven Zentrum. Tyramin hat ähnliche Dimensionen wie das gut katalysierte Dopamin. Warum die beiden Butylphenole kaum oder gar nicht umgesetzt wurden, ist verständlich: Vor allem bei 2,4-*di-tert*-Butylphenol ist gut einsehbar, dass die Butyl-Gruppe mit je 4 Å Abstand zwischen den Methyl-Resten die korrekte Anlagerung des Ring-systems ans aktive Zentrum stört. Die andere Butylgruppe am Ende des Moleküls (6,4 Å) könnte ebenfalls, ähnlich wie ein Anker, das Erreichen des aktiven Zentrums durch den engen Zugangskanal verhindern.

Ein Vergleich der beiden enzymatischen Aktivitäten ist aufgrund den bereits diskutierten intra- und interspezifischen Unterscheiden der Hämocyanin-Präparationen (Kapitel 4.2.1) nicht möglich. Zudem liegen wahrscheinlich zumindest der Aktivierung der Cresolase-Aktivität verschiedene Mechanismen zugrunde, die zum Beispiel in den unterschiedlichen Auswirkungen, die MgCl_2 auf die Aktivität bei *P. imperator* einerseits und *E. californicum* andererseits hat, deutlich werden (Kapitel 4.2.4.3).

Das Hämocyanin eines weiteren Cheliceraten, *Limulus polyphemus*, wurde lediglich auf seine enzymatische Aktivität untersucht, eine weitere Charakterisierung wurde nicht angestrebt. Bei meinen Versuchen konnte nur eine Diphenoloxidase-Aktivität nachgewiesen, ein Tyraminumsatz jedoch nicht beobachtet werden. Nellaiappan und Sugumaran zeigten die Fähigkeit des *L. polyphemus*-Hämocyanins, Methylcatechol, *N*-Acetyldopamin, Catechol und Dopamin gut, und schwach die Substrate Adrenalin, Nordrenalin und Tyramin umzusetzen ^[115]. Allerdings schrieben sie diese enzymatische Aktivität fälschlicherweise ^[114, 227] einer Tyrosinase in der Hämolymphe zu.

4.2.3.2 Aktivatoren der Phenoloxidase

Für die Aktivierung der Phenoloxidase-Aktivität in latenten Tyrosinasen und Hämocyanin gibt es zahlreiche Möglichkeiten (Tabelle 22 und Tabelle 23). Die Aktivierung von Hämocyaninen erfolgt in der Regel mit dem anionischen Detergenz SDS. Diese standardmäßige Verwendung wird hauptsächlich mit der leichten Handhabung und einer langen Tradition begründet. Alle untersuchten Hämocyanine weisen nach Behandlung mit SDS tatsächlich eine Diphenoloxidase-Aktivität auf. Dies ist auch für die Cheliceraten-Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* der Fall. Bei ersteren beiden kann durch Wahl eines geeigneten Puffer-Mediums zusätzlich eine Monophenolhydroxylase aktiviert werden.

Als zweiter guter Aktivator kann das kationische Detergenz CPC Catecholoxidase- (im Hämocyanin von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus*) und Cresolase-Aktivität (im Hämocyanin von *P. imperator*) induzieren (Abbildung 55). Photometrische und damit quantitative Untersuchungen sind mit CPC als Aktivator nicht möglich, da das Detergenz zusammen mit Hämocyanin eine milchige Trübung ausbildet. Es entstehen keine definierten Kristalle, die ausfallen, oder für die Protein-Denaturierung charakteristische Aggregate. Die Trübung ist abhängig von der MgCl_2 -Konzentration und geht nach einem längeren Beobachtungszeitraum (> 30 min) wieder zurück. Eine Diphenoloxidase-Aktivität ist durchaus vorhan-

den, die Probe färbt sich ein. Eine genaue Auswertung jedoch kann bei Verwendung dieser Aktivators nicht durchgeführt werden.

Weitere Aktivatoren der Catecholoxidase-Aktivität im Hämocyanin von *P. imperator* sind die Protease Trypsin, schwächer auch die zweite untersuchte Protease Chymotrypsin. Ethanol und Harnstoff können die Aktivität nur sehr schwach induzieren und werden als schlechte Aktivatoren in Tabelle 30 aufgelistet. Auch die Lipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin können die Diphenoloxidase aktivieren.

Jaenicke ^[114] untersuchte die Diphenoloxidase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin. Neben den hier bereits beschriebenen Aktivatoren SDS und CPC konnte auch Trypsin einen Diphenolumsatz im Hämocyanin der Spinne induzieren. Weitere untersuchte Substanzen wie 2-Propanol, Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid, Tween 20, Pepsin, Chymotrypsin, Papain oder Bromelain zeigten keine aktivierende Wirkung.

Die Aktivität des Hämocyanins von *L. polyphemus* konnten Nellaiappan und Sugumaran ^[115] neben dem hier beschriebenen SDS, CPC und Chymotrypsin mit Lipiden wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Linolenat, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin anregen. Die Aktivierung durch SDS und CPC erfolgte dabei in Konzentrationen unterhalb der CMC. Als Mechanismus wurde eine Konformationsänderung postuliert ^[215, 222].

Aktivator	<i>P. imperator</i>		<i>E. californicum</i>		<i>L. polyphemus</i>	
	MPO	DPO	MPO	DPO	MPO	DPO
SDS	++	++	++	++	++	++
CPC	++	++	+	+	×	++
Chymotrypsin		+		-		+
Trypsin	+	++	+			
Ethanol	-	×	-		-	
Harnstoff	-	×	-		-	
Phosphatidylcholin		++		++		++
Phosphatidylethanolamin		×		-		-
Phosphatidyleserin		-		-		-

Tabelle 30: Aktivatoren der Phenoloxidase-Aktivität im Cheliceraten-Hämocyanin.

Gute Aktivierung ++; schwache Aktivierung +; Aktivität eventuell vorhanden ×; keine Aktivierung -; weiße Fläche: nicht untersucht.

Auch wenn SDS jegliche physiologische Relevanz fehlt, hat sich seine Eignung als effektiver Aktivator bestätigt. Es wirkt bei sämtlichen untersuchten Hämocyaninen, ist ungiftig und für sowohl Nachweis von Phenoloxidaseen nach Gelelektrophorese als auch spektroskopische Experimente geeignet. Es wird nicht nur in dieser Arbeit, sondern seit Jahrzehnten bei Nachweisen der Phenoloxidase-Aktivität eingesetzt ^[205].

4.2.3.3 Optimierung der enzymatischen Aktivität

Bei dem Versuch den Substratumsatz des SDS-aktivierten *P. imperator*-Hämocyanins genauer zu analysieren, traten unerwartete Probleme auf: Komplexe Wechselwirkungen zwischen Substrat und Aktivator erlauben die Analyse der enzymkinetischen Messungen nach dem Michaelis-Menten-Formalismus nicht. Die Wechselwirkung zwischen Dopamin und SDS führt dazu, dass eine hohe Substratkonzentration die Aktivierung durch ebenfalls höhere SDS-Konzentrationen erfordert, während die gleiche SDS-Konzentration bei geringeren Substratmengen zu einer Hemmung der Aktivität führt.

Dieser Effekt der SDS-Abhängigkeit bezüglich der Aktivierung ist auch für das Hämocyanin der Spinne *E. californicum* bekannt: Bei einer Dopamin-Konzentration von 1 mM wird eine maximale Aktivierung mit 5 mM SDS erreicht, bei einer Substratkonzentration von 5 mM muss für die gleiche Aktivität circa die vierfache Menge an SDS eingesetzt werden^[114].

Trotz der sehr unterschiedlichen Bedingungen sind die Kurven der Aktivierungskinetik (Abbildung 109) ähnlich. Sowohl das Hämocyanin von *P. imperator* als auch von *E. cali-*

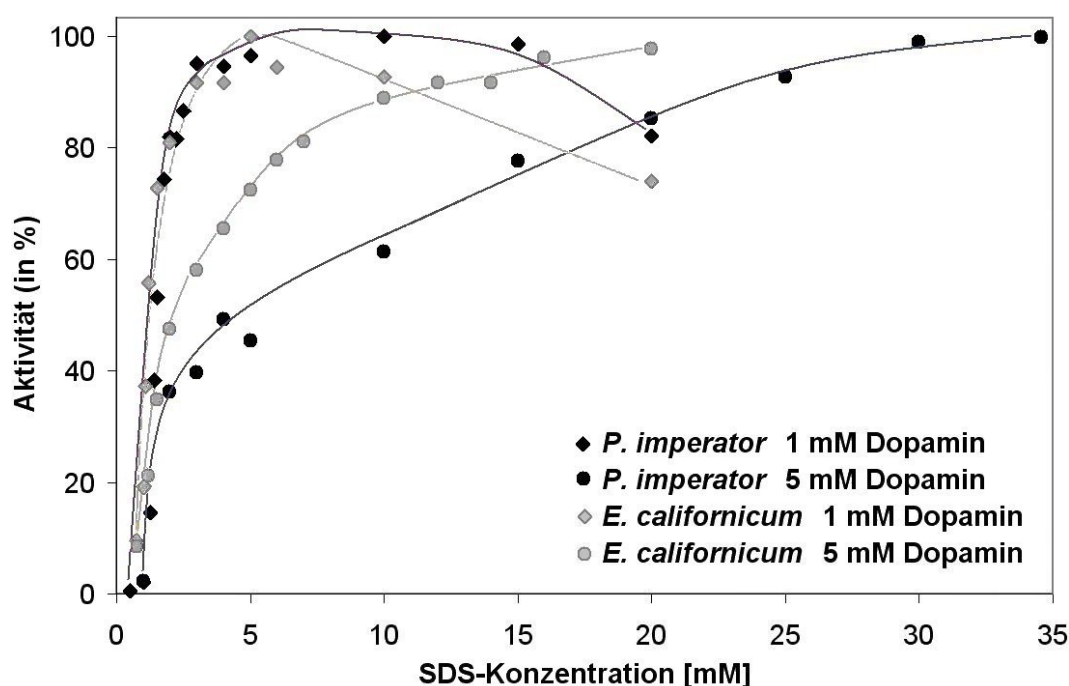


Abbildung 109: Abhängigkeit der Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von der SDS-Konzentration.

Das Hämocyanin von *P. imperator* wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) bei 25°C mit 1 mM beziehungsweise 5 mM Dopamin und verschiedenen Mengen SDS inkubiert. Der Substratumsatz wurde photometrisch bei 475 nm verfolgt.

Hämocyanin von *E. californicum* wurde für fünf Minuten mit der entsprechenden SDS-Konzentration vorinkubiert und die Reaktion in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,0) ebenfalls mit dem Dopachrom-Assay verfolgt. Hämocyanin-Konzentrationen 0,25 mg/ml (1 mM Dopamin) beziehungsweise 1,13 mg/ml (5 mM Dopamin).

Alle Daten wurden als Relativwerte abgetragen. Daten von *E. californicum* aus^[114].

fornicum werden bei geringer Substratkonzentration auch mit geringeren Mengen an SDS maximal aktiviert. So hat das Cheliceraten-Hämocyanin mit 1 mM Dopamin bereits bei einer SDS-Konzentration von 5 mM bis 10 mM die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht, bei einer weiteren Erhöhung der SDS-Konzentration nimmt die Geschwindigkeit ab und deutet damit eine Denaturierung an. Erhöhung der Substratkonzentration auf 5 mM Dopamin erfordert mehr als 20 mM SDS, um eine maximale Umsatzgeschwindigkeit zu erreichen.

Der Verlauf der Aktivierungskurve ist also von der Dopamin-Konzentration abhängig. Jede Substratkonzentration hat eine eigene optimale SDS-Konzentration, bei der die größte Aktivität messbar ist. Es kann festgestellt werden, dass keine allgemeingültigen optimalen Aktivierungsbedingungen existieren und eine komplexe Wechselwirkung zwischen dem Substrat Dopamin und dem zur Aktivierung verwendeten SDS vorliegt.

Welchen Einfluss hat die kritische micelläre Konzentration (CMC) auf die Aktivität des Hämocyanins? Ohne Ionen liegt die CMC von SDS bei circa 8 mM. Die Maximalaktivierung bei der Hämocyanine bei einer Substratkonzentration von 1 mM Dopamin mit 5 mM bis 10 mM SDS lässt hier auf einen Zusammenhang mit der CMC schließen. Weiterhin bestätigt die verschobene Maximalaktivierung bei 5 mM Dopamin zu höheren SDS-Konzentrationen die Hypothese der Wechselwirkung zwischen Substrat und Aktivator. Eventuell erhöht Dopamin die CMC und damit die benötigte SDS-Konzentration. Möglich wäre auch, dass Substrat und Aktivator um die gleiche Bindungsstelle am aktiven Zentrum beziehungsweise in der Nähe des aktiven Zentrums konkurrieren und sich gegenseitig blockieren. Genaue Bindungsstellen von SDS am Hämocyanin beziehungsweise deren Lage oder Einfluss von Tyrosin-Derivaten auf die CMC sind bisher noch nicht bekannt.

4.2.4 Effektoren der enzymatischen Aktivität

4.2.4.1 Einfluss von Puffer auf die enzymatische Aktivität

Obwohl SDS-aktiviertes Hämocyanin nicht als ein klassisches Modell-Enzym angesehen werden kann, können verschiedene Effektoren die Arbeitsweise des Hämocyanins beeinflussen und regulieren. Abhängigkeit vom Puffer-Medium ist in der Regel ein Laborartefakt und steht in keinem physiologischen Zusammenhang. Trotzdem muss diese Abhängigkeit *in vitro* berücksichtigt werden, vor allem dann, wenn bestimmte Substanzen die Charakteristika des zu untersuchenden Proteins verändern, so wie es hier beim Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität im Hämocyanin der Fall ist.

In der Regel werden Experimente zum Nachweis von Tyrosinasen in Phosphat-Puffer ^[111, 112, 115, 163-165 und andere] oder in Acetat- / Essigsäure-Puffer ^[207] durchgeführt. Die Catecholoxidase-Aktivität des Hämocyanins lässt sich in diesen Puffern auch tatsächlich sehr gut aktivieren und, aufgrund des zumeist neutralen oder leicht sauren pH-Wertes, mit wenig Autooxidation

des diphenolischen Substrates nachweisen. In diesen standardmäßig verwendeten Puffer-Medien ist eine Cresolase-Aktivität des Hämocyanins jedoch nicht möglich.

Puffer der 'Good'-Reihe (unter anderem Tris) sind in der Regel relativ frei von Nebeneffekten und zeigen nur geringe Wechselwirkungen mit Metallionen ^[323]. Photometrische Untersuchungen zur Puffer-Abhängigkeit zeigen, dass Dopamin sowohl von *P. imperator*- als auch von *E. californicum*-Hämocyanin (Abbildung 61a und Abbildung 62) gut, aber hinsichtlich des Puffers relativ unspezifisch umgesetzt wird. In Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 ist die enzymatische Aktivität eindeutig am stärksten. Die Puffersubstanz mit dem zweitstärksten Dopaminumsatz ist bei *P. imperator*-Hämocyanin Tris mit einem pH-Wert von 7,8. Die weiteren Puffersubstanzen (Phosphat, Hepes) oder Aqua dest. führen sowohl bei Skorpion- als auch bei Vogelspinnen-Hämocyanin ebenfalls zu einer deutlichen enzymatischen Aktivität mit mehr oder weniger geringen Unterschieden.

Neben der Puffer-Präferenz kann eine Bevorzugung hinsichtlich des neutralen pH-Wertes erkannt werden. Dieser Gesichtspunkt wird im nachfolgenden Abschnitt (Kapitel 4.2.4.2) diskutiert.

In Aqua dest., Phosphat-Puffer, Borat-Puffer oder Ringer-Lösung hat Hämocyanin von *P. imperator* keine Monophenolhydroxylase-Aktivität. In Tris- und in Hepes-Puffer dagegen findet ein Tyraminumsatz statt (Abbildung 61b). Auch Hämocyanin von *E. californicum* entwickelt in Tris-Puffer Monophenolhydroxylase-Aktivität. Untersuchungen zur Sauerstoffbindung von *E. californicum*-Hämocyanin in Tris- und in Hepes-Puffer lassen auf gleiche Bindungs-Qualität und -Quantität schließen ^[28]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auch Hämocyanin von *P. imperator* in Bezug auf die Bindung von Tris und Hepes als allosterische Effektoren ähnlich verhält. Hepes sowie Tris sollten als Konformations-beeinflussende Effektoren für das Hämocyanin von *P. imperator* weiter untersucht werden.

Warum kann Hämocyanin in allen Puffern Dopamin, aber nur in einigen Puffern Tyramin umsetzen? Hier existieren mehrere Hypothesen: Einmal spielt sicherlich die Inkubation mit SDS und die damit zusammenhängende Stabilität des aktiven Zentrums eine Rolle. Die Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins läuft innerhalb von Minuten ab; während dieser Zeitspanne wirkt das anionische Detergens nur aktivierend und denaturiert das Protein kaum. Beim Tyraminumsatz dagegen wirkt das SDS sehr lange auf das Hämocyanin ein und destabilisiert möglicherweise in dieser Zeit die Proteinstruktur beziehungsweise die korrekte Konformation des aktiven Zentrums. Die für den Substratumsatz notwendige Konfiguration kann dann nur unter optimalen Bedingungen eingestellt werden. Tris zum Beispiel ist bekannt, als Effektor an Hämocyanin zu binden ^[228]. Möglicherweise stabilisiert es durch seine Bindung die native Hämocyanin-Konformation generell beziehungsweise die Konformation, die zum Tyraminumsatz benötigt wird.

Die zweite denkbare Erklärung sieht die Puffersubstanz Tris beziehungsweise Hepes nicht in einer passiven Rolle, die Tyraminumsatz erlaubt, sondern als aktiven Ko-Aktivator: Die Puffersubstanzen (und in geringem Maß zweiwertige Kationen, wie in Kapitel 3.9.4 beschrieben

und Kapitel 4.4.3.2 diskutiert) führen mit dem Aktivator zu einer Monophenolhydroxylase-Konformation des Proteins.

Weiterhin muß eine Wechselwirkung mit dem Substrat selbst berücksichtigt werden. In Kapitel 3.6.2 wurde die optimale SDS-Konzentration zur Aktivierung der Diphenoloxidase-Aktivität untersucht; dabei ergab sich ein Zusammenhang zwischen SDS- und Substratkonzentration. Genauso ergeben sich bei der Überprüfung der Stabilität von Hämocyanin durch enzymatische Aktivität (Kapitel 4.3.2.1) Indizien, die darauf hinweisen, dass eventuell das Substrat eine Auswirkung auf die enzymatischen Fähigkeiten des Hämocyanins haben könnte.

Beispielsweise verbleiben falsch gefaltete Tyrosinasen humaner Melanomzellen im endoplasmatischen Retikulum, wo sie proteolytisch abgebaut werden ^[324]. Durch Tyrosin und Dopa kann jedoch ein Konformationswechsel induziert werden, der die Ausbildung von Proteolyse-resistenten Tyrosinasen fördert und zur Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum führt ^[324]. Hier induziert also das Substrat die korrekte Proteinfaltung und die enzymatische Aktivität. Möglicherweise liegt ein vergleichbarer Mechanismus bei der Cresolase-Aktivität des Hämocyanins vor.

4.2.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität

Wie sich bereits bei der Pufferabhängigkeit (Kapitel 3.8.1) andeutete, besitzt das Hämocyanin wie auch die meisten anderen Enzyme ein pH-Optimum. Die Diphenoloxidase des Cheliceraten-Hämocyanins wurde in 0,1 M Phosphat-Puffer auf seine pH-Abhängigkeit untersucht. Er wurde aufgrund der höchsten Dopaminumsatzrate ausgewählt und hat eine Pufferkapazität von pH 6,6 bis 8,0. Aufgrund des bereits diskutierten Zusammenhangs zwischen enzymatischer Aktivität und Puffer-Medium wurde darauf verzichtet, die Spanne des untersuchten pH-Rahmens zu vergrößern, da weitere, in anderen Bereichen puffernde Substanzen hätten benutzt werden müssen. Der untersuchte pH-Bereich entspricht den physiologischen Hämolymphe-pH-Werten von *P. imperator* und *E. californicum*: Der Skorpion hat in Ruhe einen pH von 7,5 und nach Aktivität einen pH-Wert von 7,2 in der Hämolymphe ^[33]. Bei *E. californicum* wird der Hämolymphe-pH in Ruhe mit Werten zwischen 7,5 und 7,9 angegeben ^[30, 31, 33, 154]. Nach lokomotorischer Aktivität sinkt er auf 7,0 in venösen und 7,25 in arteriellen Regionen ^[30].

Beide Cheliceraten-Hämocyanine zeigen am sauren Ende des überprüften pH-Bereichs die stärkste Aktivität. *P. imperator*-Hämocyanin hat sein pH-Optimum bei pH 6,6 (Abbildung 63). Dort ist die Catecholoxidase-Aktivität am stärksten, bei pH-Erhöhung sinkt sie ab und erreicht bei pH 7,6 ein Minimum. Bis pH 8,0 nimmt sie wieder leicht zu. Auch bei der Vogelspinne *E. californicum* nimmt die Aktivität mit steigender Basizität ab; ein Minimum kann nicht festgestellt werden (Abbildung 64).

Das pH-Optimum der Phenoloxidase-Aktivität der echten Tyrosinase aus Mushroom wird mit Werten zwischen pH 6,0 und 7,0 angegeben ^[325]. Dagegen haben Untersuchungen mit der Mushroom-Tyrosinase (Abbildung 65) gezeigt, dass in Phosphat-Puffer pH 7,0 die Aktivität

niedriger ist als bei pH 7,8. Bei Untersuchungen dieser Arbeit verhält sich Hämocyanin hinsichtlich des untersuchten pH-Bereichs demnach wie eine 'echte' Phenoloxidase.

4.2.4.3 Einfluss von Ionen auf die enzymatische Aktivität

4.2.4.3.1 Ionen-Zusammensetzung der Hämolymphe

Neben Puffer und pH-Wert stellen Ionen weitere Effektoren der enzymatischen Aktivität dar. Die Zusammensetzung der Vogelspinnen-Hämolymphe wurde von Schartau und Leidescher bestimmt ^[31]. Die Gesamtosmolarität der Hämolymphe wird mit 477 mosmol angegeben und entsteht vor allem durch anorganische Ionen. Phosphat, sowohl Protein-gebunden als auch anorganisch, findet sich in einer Gesamtmenge von etwa 3 mM in der Hämolymphe von *E. californicum*. Die Chlorid-Konzentration liegt bei circa 242 mM, Natrium bei 191 mM und Kalium bei 2 mM ^[31].

Die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen in der Cheliceraten-Hämolymphe *in vivo* wird mit Werten zwischen 1 mM und 25 mM angegeben ^[31]. Bei der Spinne *E. californicum* wurde von Schartau und Leidescher ^[31] eine Konzentration von 4 mM Mg^{2+} , von Decker ^[180] eine Konzentration von 1 mM Mg^{2+} , und von Paul et al. ^[33] eine Konzentration von 0,4 mM Mg^{2+} in der Hämolymphe beschrieben. Magnesium kann als allosterischer Effektor die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen ^[2, 229]. Beim 24-meren Hämocyanin der Crustacee *Callinassa californiensis* werden zwei verschiedene Arten von Bindungsstellen beschrieben, an die Mg^{2+} (kompetitiv mit H^+) binden kann ^[229].

Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie, am Institut für Analytische Chemie und Anorganische Chemie (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt, ergibt bei der Untersuchung der Hämolymphe von vier Individuen *P. imperator* einen Gehalt von 30 mg/l Magnesium, dies entspricht etwa 1,24 mM Mg^{2+} , in der Hämolymphe. Diese Untersuchung deckt sich mit der Messung von Paul et al. ^[33], bei der sich eine Mg^{2+} -Konzentration von 1,1 mM in der Skorpion-Hämolymphe ergibt.

Für Ca^{2+} geben alle Autoren übereinstimmend eine Konzentration von 4 mM in der Hämolymphe von *E. californicum* an ^[31, 33, 180]. Hämocyanin von *C. californiensis* hat für Ca^{2+} acht Bindungsstellen ^[229].

In der Hämolymphe der vier Skorpione wurde in dieser Arbeit ein Calciumgehalt von 180 mg/l in der Hämolymphe ermittelt, was circa 4,5 mM Ca^{2+} entspricht und ebenfalls den Ergebnissen von Paul et al. gleichkommt ^[33].

Tris und Hepes gehen mit Metall keinerlei Komplexe ein ^[326], daher sollte es zu keinen Wechselwirkungen zwischen Puffersubstanz und Metallionen kommen, die die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität beeinflussen könnten.

4.2.4.3.2 Einwertige Ionen – Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität

Die Diphenoloxidase-Aktivitäten der Cheliceraten-Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* sind in der Regel nicht von einwertigen Ionen abhängig (Abbildung 69 und Abbildung 74). Weder Na^+ , K^+ noch Cl^- beeinflussen den Dopaminumsatz in einer signifikanten konzentrationsabhängigen Weise. Versuche zur Diphenoloxidase-Aktivität mit *L. polyphemus*-Hämocyanin führen mit Na^+ zu einer generellen Abnahme der Aktivität, bei *E. californicum*-Hämocyanin steigert Na^+ den Dopaminumsatz (Tabelle 31). Es existiert jedoch kein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Na^+ -Menge und Veränderungen in der Aktivität.

Der Einfluss dieser Ionen auf die Cresolase-Aktivität wurde nur für das Skorpion-Hämocyanin untersucht (Abbildung 70): Die Monophenolhydroxylase- ist, wie bereits die Diphenoloxidase-Aktivität, nicht von der zugegebenen Menge NaCl abhängig. Der eindeutig vorhandene Tyraminumsatz wird bei Natriumsalzzugabe generell um etwa 20 % schwächer, das heißt Na^+ hemmt grundsätzlich die enzymatische Aktivität, ohne jedoch einen proportionalen Zusammenhang erkennen zu lassen. KCl inhibiert die Monophenolhydroxylase-Aktivität ebenfalls. Hier ist allerdings ein deutlicher antiproportionaler Zusammenhang zwischen der eingesetzten K^+ -Konzentration und dem Substratumsatz festzustellen: Je größer die Menge an zugegebenem KCl ist, desto schwächer wird die Cresolase-Aktivität.

4.2.4.3.3 Zweiwertige Ionen – Diphenoloxidase-Aktivität

Der Einfluss des zweifach positiv geladenen Calciums konnte aufgrund seines schlechten Löslichkeitsprodukts nicht untersucht werden. In einer Lösung mit SDS (Natriumdodecylsulfat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) und Ca^{2+} bildet sich Kalkseife $\text{Ca}(\text{DS})_2$, die unter den Reaktionsbedingungen ausfällt. Die Löslichkeit von $\text{Ca}(\text{DS})_2$ wird in Abbildung 29 beschrieben. Die Bildung weißer nadelförmige Kristalle verhindert die Beibehaltung einer bekannten oder konstanten SDS- beziehungsweise Ca^{2+} -Konzentration. Die Phenoloxidase-Aktivität selbst wird durch die Bildung von Kalkseife nicht behindert. Dies ist beim Nachweis der enzymatischen Aktivität nach nativer PAGE leicht zu erkennen, da sich trotz des $\text{Ca}(\text{DS})_2$ -Films auf der Reaktionslösung im Gel deutliche Banden anfärben (Abbildung 36).

Die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen dagegen kann konstant gehalten werden. Sie beeinflusst von allen untersuchten Ionen die enzymatische Aktivität des Skorpion-Hämocyanins am stärksten: Während es bei K^+ und Na^+ lediglich zu Aktivitätsschwankungen um circa $\pm 20\%$ kommt, vervielfacht sich die Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin durch Mg^{2+} beträchtlich.

Auch bei den beiden anderen untersuchten SDS-aktivierten Hämocyanin-Spezies verstärkt MgCl_2 den Diphenolumsatz proportional zur Mg^{2+} -Konzentration (Abbildung 110 und Tabelle 31). Bei einer Substratkonzentration von 1 mM Dopamin erreichen die Hämocyanine von *P. imperator* und *E. californicum* ihre maximale Aktivität bei circa 30 mM bis 35 mM Mg^{2+} .

<i>P. imperator</i>	Diphenoloxidase				Monophenolhydroxylase			
	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Mg²⁺	100 ± 8,54	797,6 ± 0,9	1001,2 ± 0,7	991,52 ± 0,0	100 ± 2,54	-42,2 ± 5,3	-66,5 ± 2,4	-81,6 ± 11,9
Na⁺	100 ± 5,77	-5,98 ± 1,3	-1,94 ± 4,1	13,44 ± 2,8	100 ± 5,39	-14,9 ± 1,5	-12,6 ± 3,4	-21,1 ± 2,9
K⁺	100 ± 5,77	-17,9 ± 3,6	-9,5 ± 11,7	-10,6 ± 10,4	100 ± 5,39	-18,6 ± 0,7	-27,9 ± 1,7	-37 ± 6,9
<i>L. polyphemus</i>	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Mg²⁺	100 ± 1,88	196,6 ± 4	380,8 ± 3,96	501,6 ± 3,5				
Na⁺	100 ± 1,91		-3,9 ± 6,4	-15,16 ± 3,78				
K⁺	100 ± 1,91		83,33 ± 1,39	-26,5 ± 0,53				
<i>E. californicum</i>	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Mg²⁺	100 ± 2,03	1252 ± 1,2	10516 ± 1,3	12577 ± 1,2	100 ± 57,3	381,1 ± 55	2310,2 ± 24	4748,2 ± 21
Na⁺	100 ± 3,36	17,64 ± 1,0	18,15 ± 10,4	-4,07 ± 13,1				
K⁺	100 ± 3,36	-15,6 ± 3,9	22,22 ± 22,8	-13,48 ± 7,9				
<i>E. californicum</i> diss	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Mg²⁺	100 ± 9,23	-0,02 ± 11	21,9 ± 12,83	25,83 ± 16,7				
<i>E. californicum</i> bc	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Mg²⁺	100 ± 3,71	-31,9 ± 6,1	-4,1 ± 3,41	10,01 ± 4,29				

Diphenoloxidase nach 7 min; Monophenolhydroxylase nach 14 h (*E. californicum* nach 9 h)

Tabelle 31: Wirkung von Ionen auf die Phenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin.

Die enzymatische Aktivität ohne Ionen wurde als 100 % gewertet; Veränderungen der Aktivität in Gegenwart verschiedener Salz-Konzentrationen wird als Relativwert ebenfalls in % angegeben. Alle Berechnungen Mittelwerte aus zwei bis sechs Messungen, mit Fehler des Mittelwertes. Weiße Fläche: Bedingungen nicht untersucht.

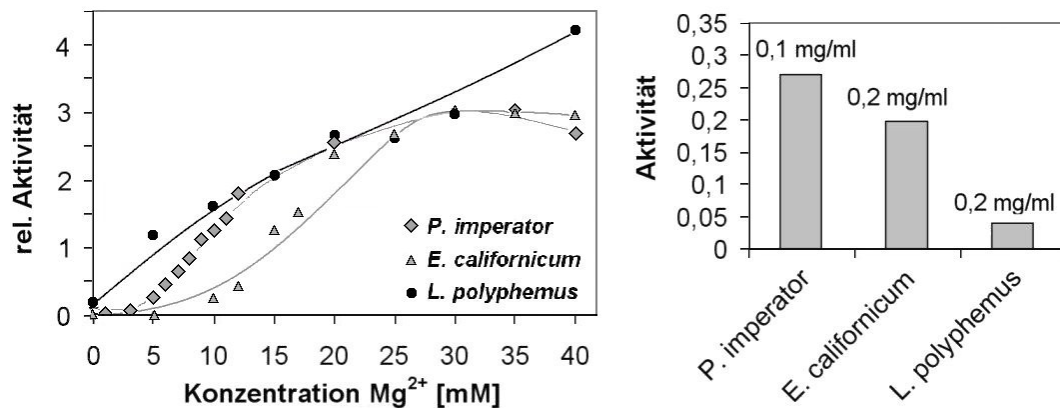


Abbildung 110: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von der Magnesium-Konzentration.

a Vergleich der Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des SDS-aktivierten Hämocyanins von *Pandinus imperator*, *Eurypelma californicum* (beides 24-mer) und *Limulus polyphemus* (48-mer) von der Magnesium-Konzentration. Die Aktivitäten aller drei Hämocyanine wurden auf einen gleich großen Wert bei 30 mM Mg²⁺ genormt. Aufgetragen wurde die relative Aktivität (willkürliche Einheiten) mit 1 mM Dopamin gegen die Magnesium-Konzentration.

b Absolutwerte der Diphenoloxidase-Aktivität bei 30 mM Mg²⁺. *E. californicum*- und *L. polyphemus*-Hämocyanin erreichen diese Werte bei einer Hämocyanin-Konzentration von 0,2 mg/ml, *P. imperator*-Hämocyanin bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

Hämocyanin von *L. polyphemus* dagegen scheint seine maximale Umsatzrate erst bei mehr als 40 mM Mg²⁺ zu erreichen (Abbildung 110). Eine Wirkung des Gegenions Cl⁻ kann ausgeschlossen werden.

Die Kurven zur Catecholoxidase-Aktivität in Abhängigkeit von der MgCl₂-Konzentration nehmen bei den drei Protein-Spezies sehr unterschiedliche Formen an (Abbildung 110a). Dies könnte eine charakteristische Enzymeigenschaft des jeweiligen Hämocyanins darstellen, wie beispielsweise die genaue Farbe im Dopachrom-Assay (Abbildung 43) (eventuell durch Weiterreaktion mit dem Hämocyanin) oder die Absolutwerte der Diphenoloxidase-Aktivität (Abbildung 110b). Andererseits könnte dies aber auch ein Hinweis auf verschiedene Aktivierungsmechanismen darstellen.

Wie in Kapitel 3.9.4 festgestellt, wird die Diphenoloxidase schwach bereits durch 30 mM Mg²⁺ (Abbildung 85) oder 30 mM Ca²⁺ (Abbildung 86) induziert, ohne dass ein Aktivator wie beispielsweise SDS eingesetzt werden muss. Hier lässt sich erkennen, dass, obwohl es sich aufgrund der Präzipitation von (Ca)₂DS (Abbildung 29) nicht untersuchen ließ, auch Calcium eine Aktivität-verstärkende Wirkung auf Hämocyanin haben muss. Weiterhin kann es bedeuten, dass die beiden zweiwertigen Kationen den Dopaminumsatz nicht nur als Effektor beschleunigen, sondern tatsächlich die Aktivität erhöhen, indem sie den Grad der Aktivierung verstärken.

In Abbildung 105 wurde die Diphenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin in verschiedenen Oligomerisierungszuständen betrachtet. Interessant ist auch die Wirkung, die MgCl₂ auf Hä-

mocyanin in seinen unterschiedlichen Dissoziierungszuständen nehmen kann. Anhaltspunkte zur Wirkweise des allosterischen Effektors Mg^{2+} auf die enzymatische Aktivität sind so zu erkennen. Während der Dopaminumsatz von 24-merem Hämocyanin (*P. imperator* und *E. californicum*) relativ schwach ist, wird er durch die Zugabe von Mg^{2+} um das mehr als 100fache verstärkt (Absorptionswert nach 6 min). Wie in Abbildung 111a zu sehen, bildet die Kurve der Catecholoxidase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin in Abhängigkeit von Mg^{2+} eine sigmoidale Form aus, die charakteristisch für allosterisch regulierte (und kooperative) Enzyme ist. Die aus dem Oligomer herausgelösten Untereinheiten des Dissoziats, beziehungsweise die isolierten Untereinheiten *bc* lassen diese typische Kurvenform vermissen. Während die Aktivität des oligomeren Vogelspinnen-Hämocyanins ohne Mg^{2+} eher schwach ist, ist der Dopaminumsatz bei Dissoziat und *bc* deutlich höher. Jedoch verdoppelt sich mit zusätzlichen 30 mM Mg^{2+} die Aktivität des *E. californicum*-Dissoziats und des Dimers lediglich, während die Absorption des 24-mers mehr als 100-mal stärker wird (Abbildung 105). Bei genauerer Untersuchung des Substratumsatzes in Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration (Abbildung 111) ist für das 24-mer eine Maximalaktivierung bei circa 30 mM bis 35 mM Mg^{2+} mit der stärksten Aktivitätszunahme um 17 mM festzustellen. Dissoziat hat ein Aktivitätsmaximum bei 15 mM Mg^{2+} , beim Dimer scheint die Aktivität hier im Gegensatz dazu maximal inhibiert zu werden.

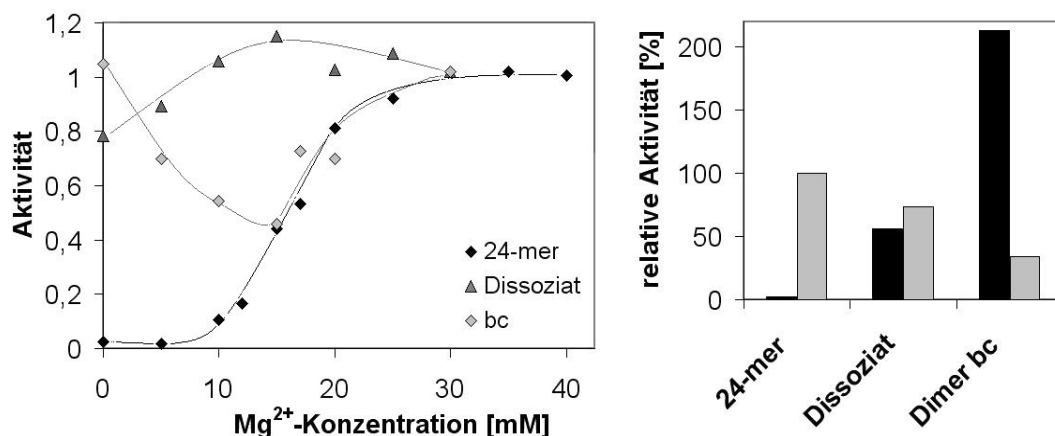


Abbildung 111: Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins von *E. californicum* von der Magnesium-Konzentration und dem Oligomerisierungsgrad.

a Vergleich der Abhängigkeit der Diphenoloxidase-Aktivität des SDS-aktivierten Hämocyanins in nativer 24-merer Form, als Dissoziat und als Dimer *bc* von der Magnesium-Konzentration. Die Aktivitäten aller drei Hämocyanin-Proben wurden auf 100 % Aktivität bei 30 mM Mg^{2+} genormt. Aufgetragen wurde die Aktivität (willkürliche Einheiten) gegen die Magnesium-Konzentration.

b Relative Diphenoloxidase-Aktivität bei 0 mM Mg^{2+} (schwarz) und 30 mM Mg^{2+} (grau); Hämocyanin-Konzentration 0,2 mg/ml. Die Aktivität wurde auf 30 mM Mg^{2+} normiert. Die Aktivität des Dimers *bc* wurde an die tatsächliche Anzahl der Monomere im 24-mer angepasst. (Im Ansatz nur Dimere, im nativen Hämocyanin auch andere Untereinheiten, daher wurde die Aktivität durch sechs dividiert.)

Ohne Mg^{2+} nimmt die absolute Aktivität mit dem Oligomerisierungsgrad zu (Abbildung 111b). Dies ist vermutlich auf die bereits diskutierte bessere Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum wie zum Beispiel beim Hämocyanin von *Cancer magister*, *Carcinus maenas* ^[112, 233] und *Eurypelma californicum* zurückzuführen (Kapitel 4.2.2). Mit Mg^{2+} nimmt die Aktivität mit dem Oligomerisierungsgrad ab. Möglicherweise ist für die unterschiedliche Magnesium-Abhängigkeit auch das veränderte Puffer-System verantwortlich zu machen (reiner Tris-Puffer, die anderen beiden Versuchssätzen mit zusätzlich 10 mM Glycin und 1 mM EDTA). Trotzdem unterscheiden sich die dissoziierten Untereinheiten und das Dimer, beide im gleichen Puffer, in ihrer Aktivität beträchtlich. Der Grund dafür könnte in der Untereinheiten-Trennung als Vorgang gesucht werden, denn der Unterschied dieser beiden Proben besteht lediglich darin, dass die enzymatisch inaktiven Untereinheiten entfernt wurden. Eventuell ist dieser Reinigungsschritt für den partiellen Verlust der Aktivität verantwortlich. Weiter wirkt, wie bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert, eine höhere SDS-Konzentration auf jede Untereinheit im Ansatz. Die effektivere Beeinflussung durch allosterische Effektoren wie Mg^{2+} könnte durch den höheren Oligomerisierungsgrad und bessere Kommunikation der Hämocyanin-Untereinheiten gegeben sein.

Die Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin ist also vom Oligomerisierungsgrad abhängig. Dies könnte der Grund sein, dass auch für das Hämocyanin von *Pandinus imperator* keine enzymatische Aktivität im Dissoziat oder bei einzelnen Untereinheiten festgestellt werden konnte. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ist das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* extrem stabil, Hämocyanin von *P. imperator* reagiert in allen untersuchten Belangen empfindlicher. Eventuell ist *P. imperator*-Dissoziat nicht mehr ausreichend stabil (und korrekt gefaltet), um noch enzymatisch tätig zu werden. Auch aus diesem Grund konnten die für die enzymatische Aktivität verantwortlichen Untereinheiten nicht festgestellt werden.

4.2.4.3.4 Zweiwertige Ionen — Monophenolhydroxylase-Aktivität

Sowohl das Hämocyanin von *P. imperator* als auch von *E. californicum* besitzt Monophenolhydroxylase-Aktivität. Ebenso ist bei beiden Hämocyaninen eine Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration vorhanden. Diese Abhängigkeit ist jedoch invers: Während die Cresolase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin proportional mit der Mg^{2+} -Konzentration steigt, nimmt die Cresolase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin antiproportional mit der Mg^{2+} -Konzentration ab (Tabelle 31).

Bei Spinnen-Hämocyanin ist der Tyraminumsatz ohne Mg^{2+} extrem schwach und auch bei photometrischen Messungen kaum vorhanden. Zugabe von Magnesiumsalzes verkürzt die "Verzögerungsphase" vor Beginn des Substratumsatzes und verstärkt den Umsatz so sehr, dass er sogar ohne photometrische Untersuchungen zu erkennen ist (Abbildung 73). Die Zugabe von 10 mM MgCl_2 zieht die drastischste Veränderung nach sich: Der Substratumsatz steigt insgesamt um mehr als das 35-fache an, und zwar ab einem klar zu erkennenden

Zeitpunkt, nach 7 h Inkubation. (Lange „Verzögerungsphase“, da die Hämocyanin-Präparation zwei Tage alt ist; siehe Kapitel 3.5.2.) Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration führt zu einer weiteren Verkürzung der „Verzögerungsphase“ beziehungsweise zu einem früheren Reaktionsstart und zu schnellerem Substratumsatz.

Der Tyraminumsatz von *P. imperator*-Hämocyanin nimmt mit steigender Mg^{2+} -Konzentration ab (Abbildung 68). Im Gegensatz zu Versuchen mit Spinnen-Hämocyanin ist ohne MgCl_2 eine deutliche und mit dem bloßen Auge gut erkennbare Braunfärbung das Ergebnis der Cresolase-Aktivität (Abbildung 42). Bei Zugabe von Mg^{2+} kommt es auch hier zu mehreren Veränderungen in der Reaktionskinetik: Erstens nimmt die Intensität der Färbung stark ab. Zweitens verkürzt sich mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration die Zeit, die benötigt wird, um in der Kinetik eine Plateauphase zu erreichen. Die Absorption der Probe nimmt nicht mehr zu, sondern bleibt nach der steileren Steigung zu Reaktionsbeginn, konstant. Drittens führt Erhöhung der Mg^{2+} -Menge zu einer Vorverlegung des Reaktionsbeginns, zur Verkürzung der „Verzögerungsphase“.

Tris wirkt hier als allosterischer Effektor, der, genau wie Hepes, die Cresolase-Aktivität im Hämocyanin zulässt. Der Mechanismus, der diese enzymatische Aktivität ermöglicht, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Vor Tris ist bekannt, dass es auch bei der Sauerstoffbindung auf Ebene der Kopplung der beiden dodekameren Halbmoleküle als allosterischer Effektor wirkt ^[228]. Möglicherweise reguliert es das aktive Zentrum nicht nur bei der Sauerstoffbindung, sondern auch der Sauerstoff-Katalyse.

4.3 Stabilität

4.3.1 Thermostabilität

Biotope mit hohen Temperaturen zwingen poikilotherme Tiere zur Anpassung durch biochemische, morphologische oder verhaltensökologische Adaptation. Von der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ist bekannt, dass ihr Hämocyanin gegenüber hohen Temperaturen sehr Konformations-stabil ist. Daher wurden auch die Auswirkungen von Hitze auf Hämocyanin des Kaiserskorpions *Pandinus imperator*, dessen Heimat der tropische Regenwald Westafrikas ist, getestet.

Das 24-mere Skorpion-Hämocyanin ist stabil bis zu einer Temperatur von 60°C, Denaturierungserscheinungen werden ab 70°C sichtbar. Diese Thermostabilität ist wahrscheinlich auf die oligomere Proteinstruktur zurückzuführen^[196]. Die Denaturierungstemperatur hängt von dem gewählten Puffer beziehungsweise der Anwesenheit bivalenter Kationen ab. Die höchste Stabilität weist das Hämocyanin in Pandinus-Puffer mit je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} auf. Unter diesen Bedingungen bleibt das Molekül bis 80°C (bei Betrachtung des Maximums der Fluoreszenzemission) beziehungsweise bis Temperaturen zwischen 70°C und 80°C (bei Betrachtung der Fluoreszenzintensität, Abbildung 26) stabil. In reinem Tris-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} liegen die maximalen Temperaturwerte 10°C niedriger.

Sterner et al.^[196] konnten zeigen, dass sowohl die Quartärstruktur als auch die Sauerstoff-Bindungsstellen des Hämocyanins von *E. californicum* bei Temperaturen bis zu 80°C stabil bleiben. Bei Zugabe der bivalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} in physiologischen Mengen (5 mM) erhöht sich die Temperaturstabilität sogar auf 90°C. Die stabilisierende Rolle, die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen auch beim Hämocyanin von *E. californicum* spielen, konnte mit Lichtstreuexperimenten belegt werden^[196].

Für das Hämocyanin von *P. imperator* liegt wahrscheinlich der gleiche Mechanismus zur Strukturhaltung vor wie bei Spinnen-Hämocyanin. Möglicherweise besetzen die bivalenten Kationen (allosterische) Bindungsstellen und stabilisieren durch van der Waals-Bindungen die Lage der Aminosäuren zueinander und damit auch die Gesamtstruktur.

Da Tris bei Experimenten mit 24-merem *E. californicum*-Hämocyanin als allosterischer Effektor wirkt^[228], könnte es ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität des Skorpion-Hämocyanins haben. Die Wirkung als Effektor wird durch die Einstellung der Monophenolhydroxylase-Konformation am *P. imperator*-Hämocyanin gezeigt. Damit kommt Tris für Skorpion-Hämocyanin als Stabilität-erhaltender Faktor ebenfalls in Frage.

Bei Untersuchung der Thermodenaturierung auf der Ebene der Sekundärstruktur ist in Tris-Puffer ein Verlust der Sekundärstrukturelemente ab circa 60°C zu verzeichnen (Abbildung 27). Bei einer Inkubationstemperatur von 95°C ist das Hämocyanin komplett denaturiert, es bilden sich Aggregate.

Der Sekundärstrukturverlust über den großen Temperaturbereich von 35°C kann ein Hinweis auf unterschiedliche Stabilitäten der drei verschiedenen Domänen mit ihren unterschiedlichen Faltungsmotiven sein ^[327-329]. Eine Unterscheidung im Hinblick auf die Thermostabilität der jeweiligen Domänen kann jedoch nicht vorgenommen werden.

Die Temperaturstabilität von *Pandinus imperator* ist sicherlich eine Anpassung an die klimatischen Bedingungen seines Lebensraums. So ist das Hämocyanin der Halbwüstenbewohnenden Spinne *Eurypelma californicum* an noch extremere Temperaturen angepasst. Die Hämocyanine von *Astacus leptodactylus* (Bewohner von Fließgewässern nicht über 20°C) und *Potamion potamios* (semiterrestrische Mittelmeerkrabbe, 5°C bis 30°C) denaturieren ab Temperaturen 59°C beziehungsweise 61°C ^[282]. Beim hexameren Hämocyanin der Languste *Panulirus vulgaris*, die die Gewässer des Mittelmeers und des Ostatlantiks mit Temperaturen nicht über 20°C bewohnt, kommt es ebenfalls ab 63°C zur irreversiblen Denaturierung ^[330]. Die hohe Temperaturstabilität für die Hämocyanine von *P. potamios*, *P. vulgaris* und *E. californicum* lassen sich wie das *P. imperator*-Hämocyanin gut mit den möglichen hohen Temperaturen im jeweiligen Biotop in Beziehung setzen.

Bei *A. leptodactylus* liegt der Grund für die ausgeprägte Temperaturstabilität in der Quartärstruktur des Hämocyaninmoleküles: Eine Disulfidbrücke zwischen den Hexameren ist für die ausgeprägte Stabilität verantwortlich ^[10]. Das Hämocyanin von *E. californicum* besitzt lediglich zwei konservierte Disulfidbrücken in den Untereinheiten, die Domäne III stabilisieren ^[8]. Allerdings wird das Molekül zusätzlich durch eine große Anzahl von nichtkovalenten Bindungen und zweiwertigen Kationen stabilisiert ^[186, 331].

Da die Sequenz von *P. imperator*-Hämocyanin noch nicht bekannt ist, kann die Struktur, die für die Temperaturstabilität verantwortlich ist, nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich zeichnet sich unter anderem eine der oben beschriebenen Strukturen oder Mechanismen verantwortlich.

4.3.2 Stabilität gegenüber Detergenzien und enzymatische Kontrolle der Funktionalität

Die Untersuchung der generellen Struktur-Stabilität des Hämocyanins gegenüber denaturierenden Detergenzien erlaubt keinerlei Aussagen von physiologischer Relevanz, lässt aber Rückschlüsse zum Aufbau von beispielsweise der Quartärstruktur zu.

Untersucht wurde die Stabilität von Skorpion-Hämocyanin gegenüber größeren Mengen der Detergenzien SDS und Guanidin-Hydrochlorid (Abbildung 112). SDS lagert sich an das Proteinrückgrat an, blockiert hydrophobe Wechselwirkungen und linearisiert damit das Molekül ^[197, 332, 333]. Guanidin dagegen erhöht die Löslichkeit der Peptidbindung und die von polaren Resten von Histidin, Glutamin und Asparagin ^[197].

In einer Konzentration von 5 mM oder mehr hat SDS bei 24-stündiger Inkubation die Quartärstruktur des respiratorischen Proteins zerstört (Abbildung 31). Mit steigender SDS-Konzentration nehmen die Anteile an 24-merem Protein ab, während mehr und mehr niedermolekulare Fragmente entstehen. Bei einer Konzentration von 20 mM SDS ist das oligomere Hämocyanin nach 24 h praktisch nicht mehr vorhanden.

Gegenüber Guanidin-Hydrochlorid-Konzentrationen von weniger als 1 M kann Hämocyanin seine Struktur größtenteils beibehalten. Danach beginnt es - vor allem über die Bildung von 12-meren Zwischenzuständen - zu zerfallen. Mehr Guanidin-Hydrochlorid (bis 1,5 M) kann nur mit MgCl_2 und CaCl_2 in der Lösung toleriert werden.

Während Guanidin-Hydrochlorid zuerst zu einer Zerstörung der Quartärstruktur zu führen scheint, zerfällt das Molekül mit SDS sofort in kleinere Bestandteile. Die Struktur-erhaltende Wirkung von Ca^{2+} und Mg^{2+} wird nach ihrer Bedeutung bei der Thermostabilität wiederum offensichtlich.

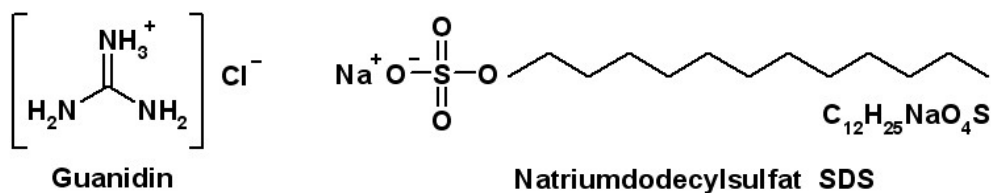


Abbildung 112: Struktur der Denaturierungsmittel Guanidin und SDS.

4.3.2.1 Stabilität und Funktionalität von nativem *P. imperator*-Hämocyanin

Der Aktivierung des Hämocyanins zur Phenoloxidase durch SDS steht die Denaturierung des Proteins gegenüber. Nur wenige Enzyme lassen sich durch SDS aktivieren. Neben Hämocyaninen werden auch die Prophenoloxidasen aus *Vicia faba* und *Dolichos lablab*, die Pyruvat-Oxidase und die Xenopus-Tyrosinase aus der inaktiven in die aktive Form umgewandelt ^[207, 210, 222, 223]. Alle diese Enzyme werden nach der Art ihrer Reaktion als Oxidoreduktase klassifiziert.

Allerdings ist der Unterschied zwischen Aktivierung und Denaturierung bezüglich der SDS-Menge nur sehr gering. So beträgt die optimale Menge zur Aktivierung der Phenoloxidase im Hämocyanin von *P. imperator* bei einer Substratkonzentration von 1 mM Dopamin 2 mM SDS (Abbildung 57a). Bei einer Substratkonzentration von 5 mM Dopamin muss für optimale Aktivierung circa 30 mM SDS eingesetzt werden (Abbildung 57b). (Dies allerdings nur bei kurzer Inkubation und enzymatischer Aktivität während maximal 20 min.) In einer Konzentration von 5 mM zerstört SDS bei 24-stündiger Inkubation die Quartärstruktur des Hämocyanins (Abbildung 31).

Längerfristige Stabilitätsuntersuchungen wurden mit einer SDS-Konzentration von 2 mM SDS, die zur Aktivierung standardmäßig verwendet wurde, durchgeführt. Das Hämocyanin

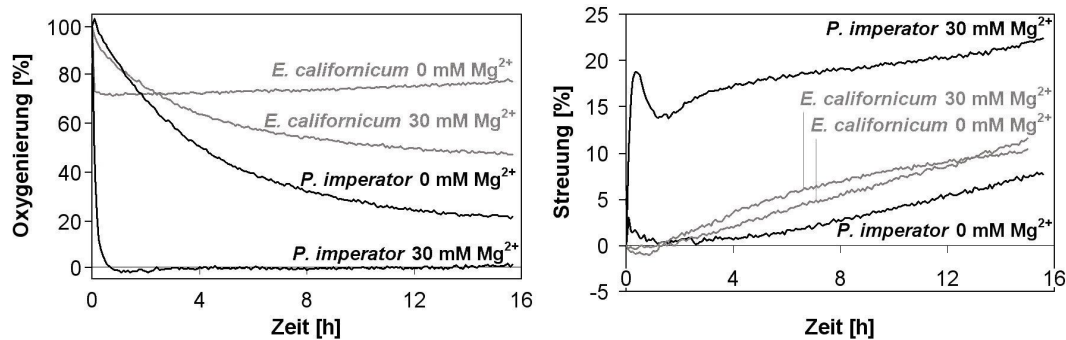


Abbildung 113: Oxygenierung und Streuung von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin mit SDS und Mg^{2+} .

Der Quotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ stellt die Sauerstoffbeladung und der Quotient $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ die Streuung dar. Ausgehend von 100 % Oxygenierung und 0 % Streuung zu Versuchsbeginn wurden die Messdaten in Relativwerte umgerechnet (Mittelwerte aus drei bis vier Messungen). Berechnungen zur Auswertung der Absorptionsquotienten in Kapitel 2.18.1.

a Oxygenierungsgrad und

b Streuung von Skorpion- (schwarz) und Spinnen-Hämocyanin (grau).

von *P. imperator* ist gegenüber dem Denaturierungsmittel SDS nur mäßig stabil. Das Agens beeinflusst nicht nur den Oxygenierungsgrad und das aktive Zentrum, sondern auch die Stabilität des gesamten Proteins.

Als Maß für die Stabilität des aktiven Zentrums beziehungsweise die Oxygenierung wurde der Absorptionsquotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ untersucht; als Maß für die Streuung, die unter anderem durch Protein-Denaturierung hervorgerufen wird, der Quotient $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ (Tabelle 20). Die charakteristische Absorptionsbande bei 340 nm, das Merkmal der Oxygenierung, verschwindet bei Inkubation von Hämocyanin mit 2 mM SDS nach und nach (Abbildung 28), die Sauerstoffbeladung nimmt relativ gleichmäßig ab und stellt sich nach knapp 16 h auf einen Oxygenierungsgrad von circa 20 % ein (Abbildung 113a). Während der langen Inkubationszeit nimmt die Streuung allmählich zu (Abbildung 113b).

In Kombination mit SDS wirkt sich das bivalente Kation Mg^{2+} negativ auf Oxygenierung und Stabilität des Skorpion-Hämocyanins aus. Zusammen mit Ca^{2+} wirkt Mg^{2+} erhaltend auf die Quartärstruktur von Hämocyanin [diese Arbeit, 2, 229]. Da das Hämocyanin von *P. imperator* den gebundenen Sauerstoff mit 30 mM $MgCl_2$ im Ansatz aber deutlich schneller verliert, ist seine Wirkung auf die Beladung hier offensichtlich gegenteilig und beeinflusst damit wahrscheinlich auf die Konformation des aktiven Zentrums.

Die abnehmende Stabilität des Hämocyanins vor allem mit SDS in Kombination mit $MgCl_2$ führt dazu, dass verschiedene andere Experimente nicht wie erhofft ausgewertet werden konnten; so zum Beispiel die Versuche, Veränderungen am Hämocyanin, die zur Phenoloxi-dase-Aktivität führen, mittels spektroskopischer Experimente zu untersuchen: Bei Fluoreszenz-Versuchen von Hämocyanin in Ringer-Lösung mit SDS, in Tris-Puffer mit SDS oder mit SDS und Mg^{2+} (Kapitel 3.9.5) kommt es erst zu einer hypsochromen Verschiebung

(Abbildung 87), deren Ursache nicht erklärt werden kann, und dann zur Deoxygenierung. In den Ansätzen mit SDS in Kombination mit Mg^{2+} wird die Stabilität des Proteins so weit herabgesetzt, dass es unter den (zur Aktivierung) gewählten Konzentrationsbedingungen (Fluoreszenz mit 0,1 mg/ml Hämocyanin, Absorptionversuche zur Stabilität und Substratumsatz mit 0,2 mg/ml) ausfällt.

Natürlich muss bei der Betrachtung dieser Daten klar unterschieden werden zwischen der Deoxygenierung und der Denaturierung des Hämocyanins. Auch ein Hämocyanin-Molekül, dessen vierundzwanzig Sauerstoffbindungscentren alle im deoxy-Zustand sind, behält seine native und intakte Konformation bei. Die Sauerstoffaffinität von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin ist allerdings so hoch, dass es bei normalem Sauerstoffpartialdruck voll oxygeniert ist ^[194]. Das SDS muss folglich die Konformation des aktiven Zentrums in irgendeiner Form beeinflussen. SDS-Moleküle sind deutlich größer als ein Sauerstoff-Molekül, und zudem geladen. Sollte SDS das aktive Zentrum selbst erreichen, wäre dafür ein gewisser Grad an Denaturierung oder zumindest Veränderung der Konformation nötig.

Ein Hinweis auf mögliche Denaturierung gibt die Streuung (Abbildung 113b). Bei dem Hämocyanin von *P. imperator* existiert kein Zusammenhang zwischen den Kurven der Deoxygenierung und der Streuung. Der größere Anteil des Sauerstoffverlustes ist demzufolge auf eine sinkende Affinität, und nur ein geringerer Teil auf die oben genannte Denaturierung zurückzuführen.

Die Funktionalität des mit SDS inkubierten Hämocyanins kann leicht durch enzymatische Tests nachgewiesen: Nur ein korrekt gefaltetes Protein kann Reaktionen richtig katalysieren. Daher wurde nach Inkubation mit SDS und $MgCl_2$ die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins untersucht.

Das Skorpion-Hämocyanin ist trotz des Sauerstoffverlustes von mehr als 60 % immer noch in der Lage, Dopamin umzusetzen (Abbildung 58a). Die Kinetik des Dopaminumsatzes nimmt eine hohe Anfangssteigung an. Mit 30 mM $MgCl_2$ im Ansatz hat *P. imperator*-Hämocyanin nur eine schwache Diphenoloxidase-Aktivität. Während bei nativem Hämocyanin der Dopaminumsatz mit Mg^{2+} stärker ist als ohne (Abbildung 66), ist es bei diesen Versuchen nicht der Fall.

Die Fähigkeit zum Substratumsatz bestätigt die Vermutung, dass zumindest ein Teil der aktiven Zentren noch in intakter Form vorliegen. Die mangelnde Sauerstoffbeladung des Proteins könnte für den gleichmäßigen linearen und niedrigen Dopaminumsatz verantwortlich sein (Abbildung 58a).

4.3.2.2 Stabilität und Funktionalität von nativem *E. californicum*-Hämocyanin

Das Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* zeigt sich unter den gleichen Versuchsbedingungen durch SDS extrem unbeeinflusst. Die Oxygenierung sinkt innerhalb weniger Minuten um einige Prozentpunkte ab, bleibt aber dann während der gesamten weiteren Versuchsdauer nahezu konstant (Abbildung 113). Die Streuung dagegen nimmt während des Versuchverlaufs kontinuierlich zu, sogar etwas stärker als bei *P. imperator*-Hämocyanin. Dies ist umso erstaunlicher, als das Hämocyanin von *E. californicum* bei der Temperaturstabilität und bei Untersuchungen von Conze^[282] und Hübler^[186] als extrem unempfindliches Protein beschrieben wird.

Mit Mg^{2+} im Ansatz verliert auch das *E. californicum*-Hämocyanin deutlich mehr Sauerstoff, wenn auch nicht so schnell wie das *P. imperator*-Hämocyanin. Die Sauerstoffbindung nimmt anfangs schnell, später langsamer ab und endet bei circa 50 % der Ausgangsoxygenierung. Die Streuung unterscheidet sich bei diesem Versuchsansatz nicht wesentlich von dem Experiment ohne Mg^{2+} . Der verstärkte Sauerstoffverlust ist demzufolge wahrscheinlich nicht auf eine stärkere Denaturierung (des aktiven Zentrums) zurückzuführen, Magnesium setzt die Sauerstoffaffinität lediglich herab.

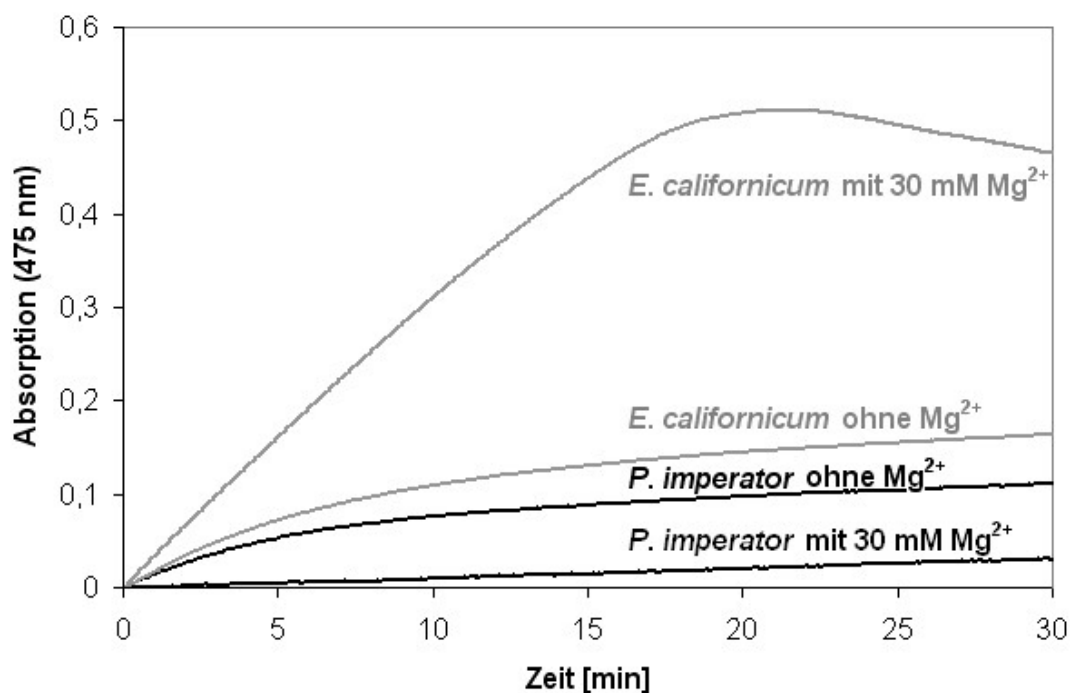


Abbildung 114: Dopaminumsatz von *Pandinus imperator*- und *Eurypelma californicum*-Hämocyanin nach Vorinkubation mit SDS.

Das Hämocyanin wurde 16,5 h mit 2 mM SDS und optional 30 mM $MgCl_2$ bei 25°C inkubiert. Danach wurde die Diphenolumsatz mit Dopamin bei 475 nm für 30 min beobachtet. Endkonzentrationen: Hämocyanin 0,18 mg/ml, SDS 1,8 mM, Dopamin 0,9 mM, Tris-Puffer 90 mM (pH 7,8). Autooxidation-korrigierte Mittelwerte aus zwei bis vier Messungen.

Auch die Funktionalität des Vogelspinnen-Hämocyanins wurde enzymatisch überprüft. Durch den nicht nennenswerten Sauerstoffverlust ist ein guter Umsatz von Diphenolen möglich (Abbildung 59a). Im direkten Vergleich mit nicht-inkubiertem Hämocyanin fällt die Umsatzrate nur geringfügig schwächer aus.

Zusätzliche 30 mM MgCl_2 im Ansatz bei der SDS-Inkubation setzen die Oxygenierung wie bei *P. imperator*-Hämocyanin herab. Trotzdem bleibt die Diphenoloxidase-Aktivität erhalten. Der Dopaminumsatz ist gegenüber dem Ansatz ohne MgCl_2 sogar deutlich stärker, wie es auch bei nicht vorinkubiertem Hämocyanin der Fall ist (Abbildung 72). Hier überwiegt die Reaktions-verstärkende Wirkung des Magnesiums (Abbildung 114).

Der Zusatz von MgCl_2 zeigt bei den beiden Hämocyanin-Spezies hinsichtlich des Substratumsatzes unterschiedliche Wirkung. Die Hämocyanine reagieren während der Vorinkubation gleich auf das Mg^{2+} , indem sie nämlich den gebundenen Sauerstoff leichter verlieren. Eventuell wird das aktive Zentrum durch SDS in Mitleidenschaft gezogen, höchstwahrscheinlich setzt Mg^{2+} aber vor allem die Sauerstoffaffinität herab.

Im nativen Zustand verstärkt Mg^{2+} bei beiden Hämocyaninen den Dopaminumsatz. Dagegen ist die Diphenoloxidase-Aktivität bei dem auf die SDS-Inkubation folgenden enzymatischen Test von *P. imperator*-Hämocyanin mit Mg^{2+} schwächer als ohne Mg^{2+} ; bei *E. californicum*-Hämocyanin ist er (wie aufgrund Kapitel 3.8.3.5.1 erwartet) mit Mg^{2+} stärker als ohne. Wahrscheinlich ist das stabilere Vogelspinnen-Hämocyanin im Gegensatz zu dem strukturschwächeren Skorpion-Hämocyanin noch ausreichend intakt, um Mg^{2+} als allosterischen Effektor binden und darauf reagieren zu können.

Obwohl sich mit diesen Versuchen die aktiven Zentren als funktionsfähig erwiesen haben, fehlt beiden Hämocyaninen nun eine Monophenolhydroxylase-Aktivität (Abbildung 58b und Abbildung 59b). Normalerweise beginnt der Monophenolumsatz von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin nach einer längeren "Verzögerungsphase" von bis zu sechs Stunden. Insofern war die Inkubation mit SDS als eine Vorinkubation angesehen und der sofortige Beginn der Katalyse erwartet worden. Warum kommt es dann nicht zu einem Tyraminumsatz? Höchstwahrscheinlich ist eine 16-stündige Vorinkubation zu lang. Ein Protein, das wie *P. imperator*-Hämocyanin am Ende der Stabilitätsuntersuchungen nur noch zu 20 % bis 30 % oxygeniert ist und strukturelle Einbußen hat hinnehmen müssen, wird nicht mehr zu einer ordnungsgemäßen Katalyseleistung fähig sein. Warum ist dann aber auch *E. californicum*-Hämocyanin, trotz einer bis zu 100 %-igen Oxygenierung, nicht zu einem Umsatz des Tyramins fähig? Dies weist darauf hin, dass es noch zu einer weiteren strukturellen Veränderung als der durch SDS induzierten kommen muss, um einen Monophenolumsatz zu ermöglichen. Nach Vorinkubation des Hämocyanins mit SDS müsste es dann zuerst noch zu dieser zweiten Konformationsänderung kommen, bevor ein Tyraminumsatz möglich ist. Diese Änderung kann dann an dem partiell vorgeschädigten Hämocyanin entweder gar

nicht oder nicht mehr innerhalb des beobachteten Zeitraums von weiteren sieben Stunden vorgenommen werden.

Als Auslöser für eine zweite Konformationsänderung kommt nur das Substrat selbst in Frage. Dies ist beispielsweise von humanen Tyrosinasen bekannt, bei denen eine unkorekte Faltung durch die Substrate Tyrosin und Dopa korrigiert werden und das Enzym funktionsfähig werden kann ^[324].

Weitere, eventuell Konformations-beeinflussende Effektoren sollen in Kapitel 4.4.3 diskutiert werden.

4.3.2.3 Stabilität und Funktionalität von *P. imperator*-Dissoziat und *E. californicum*-Dimer *bc*

Mit Hämocyanin-Dissoziat von *P. imperator* und dem Hämocyanin-Dimer *bc* von *E. californicum* wurden identische Versuche zur Stabilität durchgeführt (Tabelle 21).

Aus der Oligomerstruktur herausgelöst verlieren die Untereinheiten des *P. imperator*-Dissoziats ihren Sauerstoff bereits innerhalb von fünf Minuten (Abbildung 115a). Der Absorptionsquotient sinkt innerhalb dieser Zeitspanne im Ansatz ohne Mg^{2+} auf 65 %, mit Mg^{2+} auf 42 % des Ausgangswertes. Der Endwert der Oxygenierung liegt unabhängig von Magnesium bei circa 30 % Sauerstoffbeladung. Auffällig ist, dass die Beladung vor allem im Ansatz mit Mg^{2+} stark schwankt.

Das *bc*-Dimer von *E. californicum* wurde ausgewählt, weil es beim Spinnen-Hämocyanin für die Diphenoloxidase- und eventuell auch für die Monophenolhydroxylase-Aktivität verantwortlich ist. Mit nur zwei Untereinheiten nimmt die Komplexität des zu untersuchenden Systems und die gegenseitige Beeinflussung ab. Allerdings können sich die Untereinheiten nicht mehr wie im engen Verbund des nativen Oligomers wechselseitig stabilisieren.

Die beiden Untereinheiten *b* und *c* zeigen sich ähnlich haltbar wie das komplette, native Spinnen-Hämocyanin und erweisen sich damit sehr stabil gegenüber SDS. Über den gesamten Reaktionsverlauf verlieren die beiden Untereinheiten ihren Sauerstoff nicht. Mit Mg^{2+} geben die Untereinheiten *bc* den Sauerstoff kontinuierlich ab und der Absorptionsquotient nähert sich langsam einem nach sieben bis acht Stunden konstantem Niveau von circa 50 % Oxygenierung an. Damit sind das Untereinheiten-Dimer und das 24-mere Protein mit Magnesium in ihrem Oxygenierungsgrad und damit auch mit dem aktiven Zentrum vergleichbar stabil (Abbildung 115).

Nicht mehr zum 24-mer assoziierte Hämocyanin-Monomere von *E. californicum* haben eine deutlich höhere Sauerstoffaffinität als das native Oligomer ^[17]. Bei einer Temperatur von 20°C und pH-Werten zwischen 6,5 und 9,6 haben die Untereinheiten *a* bis *g* und das Dimer *bc* einen Halbsättigungsdruck p_{50} von 3 Torr bis 6 Torr. Das 24-mer hat bei pH 7,0 einen Halbsättigungsdruck p_{50} von 32 Torr, bei pH-Zunahme bei 7,6 sinkt er auf 15 Torr ab ^[194].

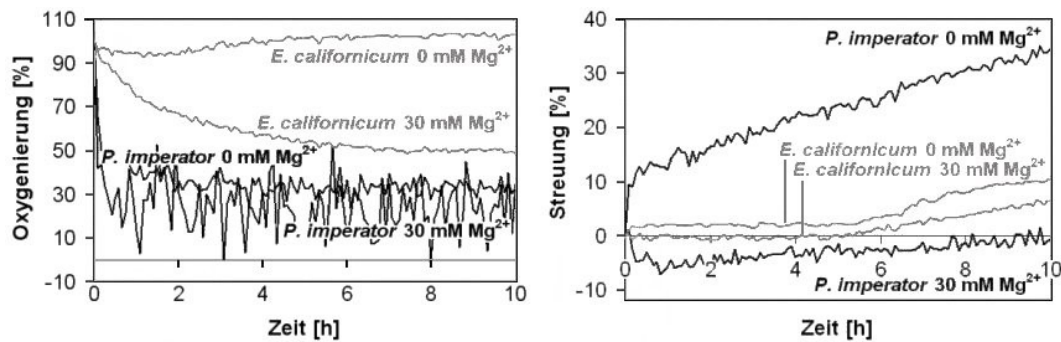


Abbildung 115: Oxygenierung und Streuung von *Pandinus imperator*-Dissoziat und *Eurypelma californicum* Dimer *bc* mit SDS und Mg^{2+} .

Der Quotient $^{340\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ stellt die Sauerstoffbeladung und der Quotient $^{250\text{ nm}} / ^{280\text{ nm}}$ die Streuung dar. Ausgehend von 100 % Oxygenierung und 0 % Streuung zu Versuchsbeginn wurden die Messdaten in Relativwerte umgerechnet (Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen). Berechnungen zur Auswertung der Absorptionsquotienten in Kapitel 2.18.1.

a Oxygenierungsgrad und

b Streuung von Skorpion- (schwarz) und Spinnen-Hämocyanin (grau).

Diese Werte bestätigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche (Ansätze ohne Mg^{2+}): Das Dimer *bc* verliert während der gesamten Beobachtung so gut wie keinen Sauerstoff, während bei dem nativen Molekül die Oxygenierung um circa 25 % abnimmt (vergleiche Abbildung 113a und Abbildung 115a). Dies ist wiederum ein Indiz dafür, dass der Verlust der Absorptionsbande bei 340 nm vor allem durch Deoxygenierung zustande kommt.

Das Hämocyanin von *P. imperator* hat bei pH 7,0 einen Halbsättigungsdruck p_{50} von 14,7 Torr und bei pH 7,6 einen Halbsättigungsdruck p_{50} von 8,7 Torr^[28]. Untersuchungen an isolierten Untereinheiten existieren nicht. Die Monomere von *P. imperator*-Hämocyanin müssen nicht in identischer Weise wie bei *E. californicum* eine höhere Sauerstoffaffinität als das oligomere Gesamtprotein haben. Aufgrund der existierenden und der hier gewonnenen Daten kann keine eindeutige Aussage hinsichtlich Sauerstoffaffinität mit und ohne Mg^{2+} von 24-merem Oligomer und Dissoziat gemacht werden. Generell wäre die Aufnahme von Sauerstoff-Bindungskurven von *P. imperator*-Hämocyanin in verschiedenen Oligomerisierungszuständen, bei unterschiedlichen Temperaturen, verschiedenen Ionenkonzentrationen und Effektoren (Phosphat, Tris oder Hepes) notwendig.

Die Funktionalität des mit SDS inkubierten Hämocyanins wurde wiederum durch enzymatische Tests überprüft. Da es bei dem *E. californicum*-Dimer *bc* bei der Vorinkubation im Ansatz ohne Mg^{2+} kaum zu Veränderungen im Oxygenierungsgrad kommt, entspricht der Dopaminumsatz des Dimers nach 16 h Inkubation mit SDS den Erwartungen (Abbildung 60). Die aktiven Zentren sind in ihrer funktionellen Form erhalten geblieben. Mit Mg^{2+} im Ansatz nimmt die Oxygenierung von *bc* zwar ab, das Protein ist aber ebenfalls noch - wenn auch etwas schwächer - enzymatisch aktiv. Ohne 16-stündige Vorinkubation ist der Substratumsatz von *bc* in Tris-Puffer mit pH 7,8 neunmal stärker als mit Vorinkubation. Bei Vergleich der

Kinetiken fallen die unterschiedlichen Kurvenformen auf: Beim Substratumsatzes ohne Vorinkubation ist der Graph zuerst sehr steil und flacht dann etwas ab. Dagegen nimmt der Graph des Dopaminumsatzes mit Vorinkubation direkt einen linearen Verlauf.

Die enzymatische Aktivität von *P. imperator*-Dissoziat nach Vorinkubation wurde nicht untersucht, da bereits in nicht-vorinkubiertem Dissoziat weder eine Cresolase- noch eine Catecholoxidase-Aktivität induziert werden kann.

4.4 Regulation der Mono- und Diphenoloxidase-Aktivität

Vergleicht man bei Tyrosinasen die mit spektroskopischen Mitteln erfasste Umsatzkinetik von Mono- und Diphenolen, so zeigt sich ein charakteristischer Unterschied: Während Diphenole sofort umgesetzt werden, entsteht bei Monophenolen eine sogenannte Lag-Phase von wenigen Minuten, bevor der Substratumsatz beginnt. Zu begründen ist dieser Umstand damit, dass die aktiven Zentren der Phenoloxidase im Ruhezustand zu mehr als 85 % in der met-Form vorliegen^[88, 94] (Abbildung 116). Nur die aktiven Zentren, die nicht im met-Zustand vorliegen, können die Hydroxylierung von Monophenolen katalysieren. Kann ein Teil der so gebildeten Diphenole vom aktiven Zentrum wegdiffundieren, bevor sie zum Chinon oxidiert werden, überführen die freien Diphenole durch Reduktion die met-Zentren in den deoxy-Zustand und machen sie nach erfolgter Oxygenierung als Reaktionspartner für die Monophenole verfügbar^[230]. Die Lag-Phase beim Umsatz von Monophenolen durch Tyrosinase kann demnach durch den Zusatz von katalytischen Mengen an Diphenol eliminiert werden^[232].

Die spannendste Frage zur Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität im Häemocyanin ist tatsächlich die nach den genauen Vorgängen am aktiven Zentrum. Beide Vorgänge werden durch das gleiche aktive Zentrum katalysiert. Unklar ist, ob ein monophenolisches Substrat zuerst hydroxyliert wird, sich dann vom aktiven Zentrum ablöst und danach wieder neu bindet um oxidiert zu werden, oder ob beide Reaktionen direkt nacheinander erfolgen. Zumindest bei der Katalyse durch Tyrosinasen muss sich ein Anteil der Substrate bereits als Diphenol wieder ablösen, um, wie oben beschrieben, die met-Zentren in den Monophenolhydroxylase-Zyklus einzubringen. Mechanistisch anspruchsvoller als die Oxidation ist der erste Schritt der enzymatischen Aktivität von Tyrosinasen, nämlich die Einführung einer Hydroxy-Gruppe an *ortho*-Position in den aromatischen Ring. Auf der Basis der zu Beginn 2006 veröffentlichten Kristallstruktur der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*^[70] kann der Mechanismus der Hydroxylierung, bei der es sich um eine elektrophile aromatische Substitution handelt, folgendermaßen ablaufen: Das sich dem oxygenierten Kupferzentrum annähernde Substrat wird durch His¹⁹⁴ (CuB) dergestalt vororientiert, dass die C-O-Bindung auf CuA hin ausgerichtet ist. Das Substrat bindet an CuA in *trans*-Position zu His⁶³ und wird hydroxyliert. Die leichte Rotationen des Peroxyliganden und des Substrats am Ende dieser Reaktion erlaubt den elektrophilen Angriff auf den aromatischen Ring mit Spaltung der O-O-Bindung (Abbildung 117)^[55, 86, 87].

Anhand der aktiven Zentren von *Limulus polyphemus*-Häemocyanin^[15] und der Catecholoxidase von *Ipomoea batatas*^[73] können Substrate und ihr Raumbedarf abgeschätzt werden. Beispielsweise orientiert sich Tyrosin mit seinem Benzolring nahezu senkrecht zu der Cu-O₂-Cu-Ebene am aktiven Zentrum, und hat in *ortho*-Position engen Kontakt zu einem der beiden Sauerstoff-Atome an CuA^[88, 106]. Bei *I. batatas* ist dieses CuA durch ein Phenylalanin abge-

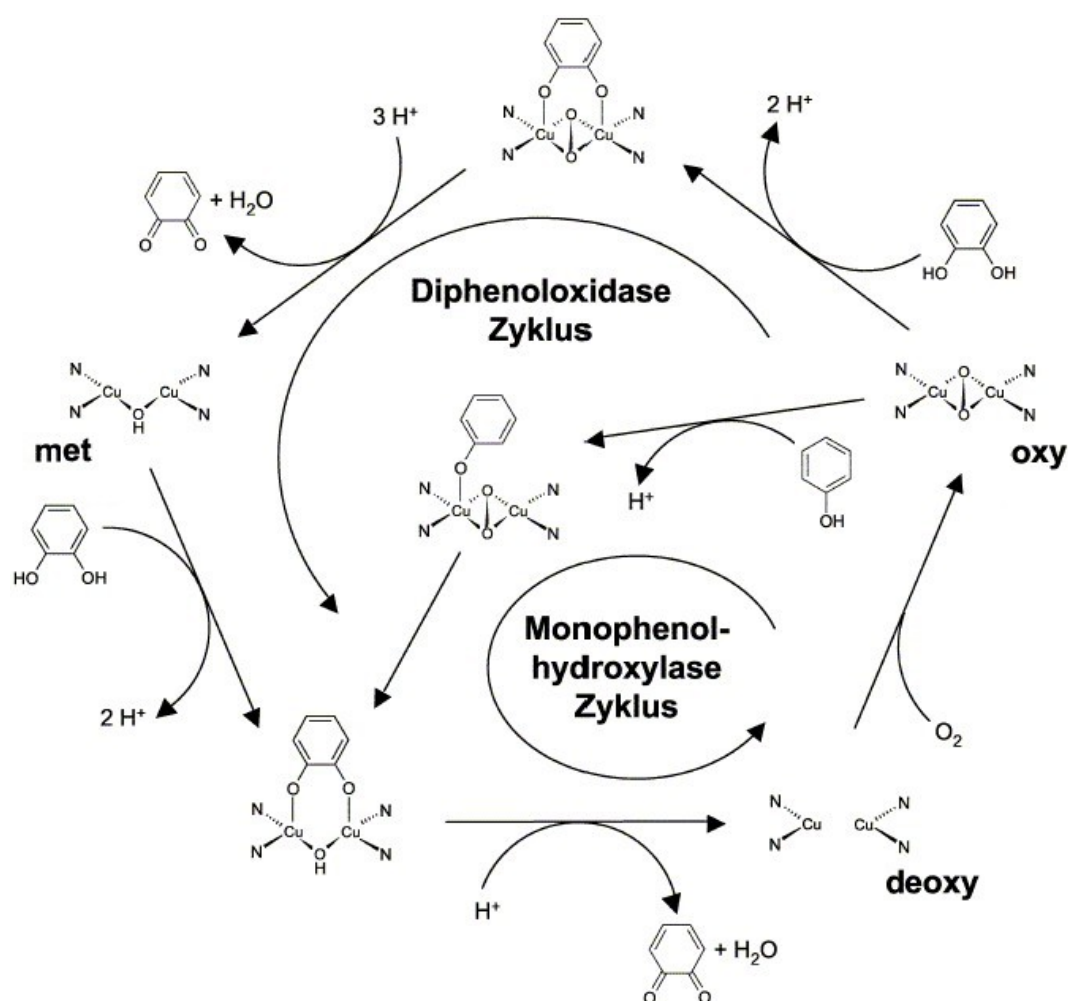


Abbildung 116: Modell zur Katalyse am aktiven Zentrum der Phenoloxidasen.

Der Übersichtlichkeit wegen sind nur vier der sechs Stickstoffliganden dargestellt (aus ^[57], verändert nach ^[114]).

Deoxygenierte Kupferzentren (Cu^+) binden erst Sauerstoff, dann das Substrat (diese Reihenfolge ist zumindest für Diphenole sichergestellt ^[73]). Nach der Oxidation wird das entstandene Chinon freigesetzt und das aktive Zentrum bleibt in met-Form zurück (Kupferionen als Cu^{2+} , obwohl kein Sauerstoff gebunden ist). Durch eine weitere Oxidation eines zweiten Diphenols kehrt das aktive Zentrum in die Ausgangsform zurück (Reduktion zu Cu^+). Bei jedem Durchlauf des Diphenoloxidase-Zyklus werden zwei Diphenole zu Chinonen oxidiert. Im Monophenolhydroxylase-Zyklus erfolgt nach Sauerstoff- und Substratbindung an einem deoxy-Zentrum zuerst eine Hydroxylierung, danach eine Oxidation zum Chinon.

schirmt ^[86]. Möglicherweise verhindert dies die Hydroxylase-Aktivität bei der Süßkartoffel und erlaubt lediglich eine Oxidierung des Substrates, wie es von Klabunde ^[73] und Eicken ^[334] vorgeschlagen wird ^[55, 86, 106].

Bekannt ist, dass in der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* das CuB zur korrekten Koordination des monophenolischen Substrats an CuA benötigt wird, an dem anschließend die Hydroxylierung stattfindet ^[55]. Noch ungeklärt war, ob die anschließende Oxidierung mit der Hydroxylierung in einem kombinierten Reaktionsschritt stattfindet, oder ob

des Substratmolekül abdissoziiert, neu bindet und dass an einem oder eventuell beiden Kupfer-Atomen zum Chinon oxidiert wird.

Diese korrekte Koordinierung des monophenolischen Substrates an eines der beiden Kupferzentren macht wahrscheinlich die Komplexität der Cresolase-Aktivität aus. Das Substrat kann nur in der passenden Konfiguration hydroxyliert werden, während bei der Oxidation von Diphenolen ein nur relativ lockerer Kontakt zwischen den Reaktionspartnern ausreichend beziehungsweise notwendig ist. Das heißt, dass die Katalyse von Tyrosinasen in einem Schritt stattfindet, wie dies kürzlich intensiv anhand der Röntgenstruktur diskutiert worden ist ^[55, 335].

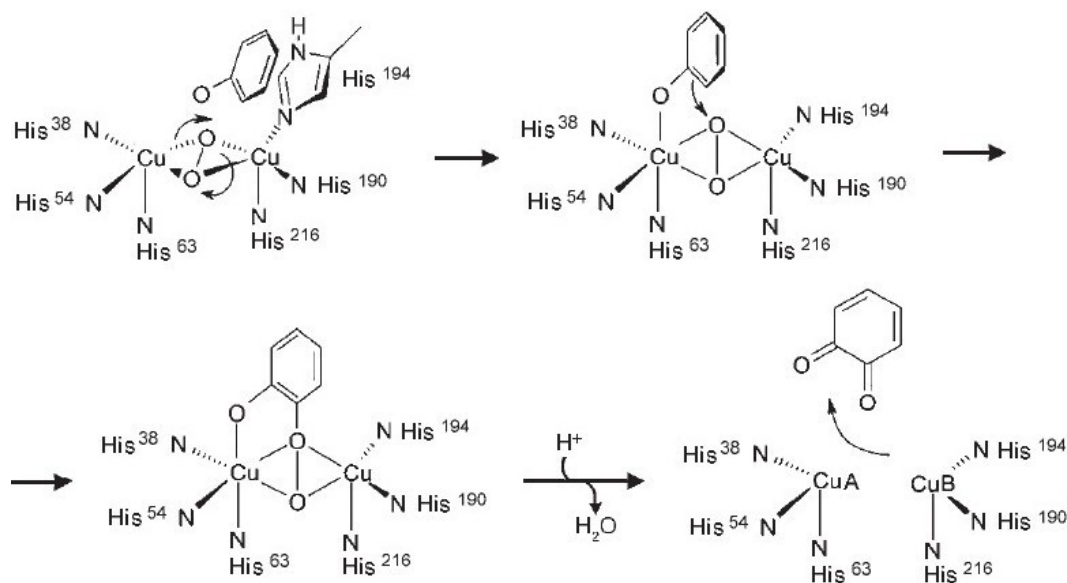


Abbildung 117: Schema zum Mechanismus der Tyrosinase (verändert, aus ^[55]).

4.4.1 Einfluss von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität

Beim spektroskopischen Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität von Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* entsteht in der Kinetik erwartungsgemäß keine Lag-Phase. In den Versuchen zur Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin beginnt die Färbereaktion erst nach einer längeren "Verzögerungsphase". Sie ist, wie in Kapitel 3.5.2 (Tabelle 25) beschrieben, unter anderem von dem Alter und der Hämocyanin-Präparation selbst abhängig.

Für einen Tyramin-Umsatz durch Tyrosinase sind Kinetiken in dieser Form nicht unerwartet, sie kennzeichnen die Lag-Phase von Monophenolen ^[88, 94]. Diese Lag-Phase ist, in Abhängigkeit von der Tyrosinase selbst (individuelle Umsatzgeschwindigkeit), ihrer Konzentration, der Substratkonzentration und anderen Parametern, lediglich einige Sekunden bis Minuten lang ^[114, 231]. Bei Arthropoden-Tyrosinasen (*Palinurus elephas* und *Astacus leptodactylus*) beispielsweise beträgt sie bei einer Enzymkonzentration von weniger als 1,3 µg/ml circa acht Minuten ^[114].

Für die Hämocyanine würde dies bedeuten, dass ihre aktiven Zentren ebenfalls, wie bei Tyrosinasen, hauptsächlich im met-Zustand vorliegen^[94]. Diese lange Lag-Phase müsste dahingehend interpretiert werden, dass noch mehr Kupferzentren in der met-Form vorliegen als es bei den Tyrosinasen der Fall ist, beziehungsweise dass diese nur sehr langsam in den oxy-Zustand überführt werden können. Tatsächlich liegen Hämocyanine von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* bei normalem Sauerstoffpartialdruck aber vollständig oxygeniert vor^[194]. Dies wird auch durch den typischen Absorptionspeak bei 340 nm bestätigt. Der Grund für das verzögerte Einsetzen der Färbereaktion muss daher durch den Aktivierungsmechanismus von Hämocyanin zur Phenoloxidase-Aktivität bedingt sein.

Um zu zeigen, dass die "Verzögerungsphase" beim Monophenolumsatz von Hämocyanin durch eine wahrscheinliche Konformationsänderung bedingt wird, wurde die Wirkung von katalytischen Diphenol-Konzentrationen auf den Tyraminumsatz von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin untersucht (Abbildung 77). Dabei ermöglichten die Versuchsergebnisse wider Erwarten nur den Schluss, dass auch bei Cheliceraten-Hämocyanin die Umwandlung von met-Zentren in oxygenierte Zentren die Ursache für die lange Phase ohne Substratumsatz ist: Nach Zugabe von katalytischen Mengen an Diphenol (Dopamin) beginnt der Tyraminumsatz ohne sichtbare Verzögerung.

Diese Interpretation steht im Gegensatz zu Ergebnisse von Sterner^[194] und Decker^[28]. Während sich oxygenierten Tyrosinase schon nach kurzer Zeit wieder in die met-Form zurückverwandelt, verbleibt oxygeniertes Hämocyanin über Jahre stabil und mit Sauerstoff beladen^[93, 94, 194]. Welche strukturellen Unterschiede am aktiven Zentrum dafür verantwortlich sind, ist nicht bekannt.

Das beschriebene Modell für den Katalysemechanismus der Tyrosinasen wurde anhand von enzymatischen und spektroskopischen Daten von Tyrosinasen entwickelt. Sie stammten nicht aus Arthropoden beziehungsweise von Hämocyaninen^[57, 70, 88, 336]. Daher ist nicht unbedingt davon auszugehen, dass dieses Modell ohne Einschränkungen auf Cheliceraten-Hämocyanin übertragen werden kann. Jaenicke gelang es, diese Daten zumindest auf Arthropoden- beziehungsweise Crustaceen-Tyrosinase (von *P. elephas* und *A. leptodactylus*) zu übertragen^[114]. Trotzdem erfordert die Datenlage der Versuche in Abbildung 77, dass in Erwägung gezogen werden muss, ob auch bei Hämocyanin ein Teil der aktiven Zentren in der met-Form vorliegen. Weiterführende Untersuchungen zu diesem Themenkomplex sind erforderlich.

4.4.2 Gemeinsamer Umsatz der Substrate Tyramin und Dopamin

Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität am aktiven Zentrum von Hämocyanin von *P. imperator* und *E. californicum* zeigen, dass sich beide Cheliceraten-Hämocyanine hinsichtlich ihrer Substratspezifität in Bezug auf Mono- und Diphenolen gleich verhalten (Abbildung 78 und Abbildung 79). Strenggenommen ist dabei die Bezeichnung 'Substratspezifität' zu ungenau beziehungsweise zu schwach, da hier zwei unterschiedliche

Reaktionen ablaufen. Durch die 'Cresolase-Konformation' (Protein-Konformation, die für den Monophenolumsatz verantwortlich ist) wird der Diphenolumsatz nicht inhibiert: Während einem Tyraminumsatz beginnt auch die Diphenoloxidase sofort zu arbeiten; und wie die 'echten' Phenoloxidasen können die aktiven Zentren des Hämocyanins sofort Diphenole oxidieren. Umgekehrt inhibiert auch ein bereits stattfindender Diphenolumsatz nicht die Reorientierung des Proteins, die für die Monophenolhydroxylase notwendig ist. Die 'Catecholoxidase-Konformation' verhindert den Monophenolumsatz nicht.

Das aktive Zentrum der Hämocyanine ist also, einmal aktiviert, für sowohl mono- als auch diphenolische Substrate Katalyse-bereit. Hinsichtlich der Reaktionsspezifität verhält sich das Hämocyanin gleich. Eine 'Catecholoxidase-Konformation' beziehungsweise 'Cresolase-Konformation' als zwei verschiedene Zustände, in dem eine enzymatische Aktivität die andere ausschließt, existiert nicht. Wahrscheinlich muss die 'Cresolase-Konformation' eher als Erweiterung der 'Catecholoxidase-Konformation' angesehen werden: Die ursprüngliche enzymatische Aktivität wird beibehalten, eine weitere kommt hinzu.

4.4.3 Regulation der Monophenolhydroxylase-Aktivität von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

4.4.3.1 Regulation der Aktivität durch den Puffer

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität von Hämocyanin ist extrem vom gewählten Puffer-Medium abhängig. Tris-Puffer und Hepes-Puffer ermöglichen einen Tyraminumsatz. Erlauben diese Puffersubstanzen den Monophenolumsatz lediglich, oder steuern sie aktiv dazu bei? Höchstwahrscheinlich tragen Tris und Hepes tatsächlich zur Ausbildung der 'Cres-Konformation' bei, da beispielsweise in physiologischer Ringer-Lösung kein Monophenol umgesetzt werden kann.

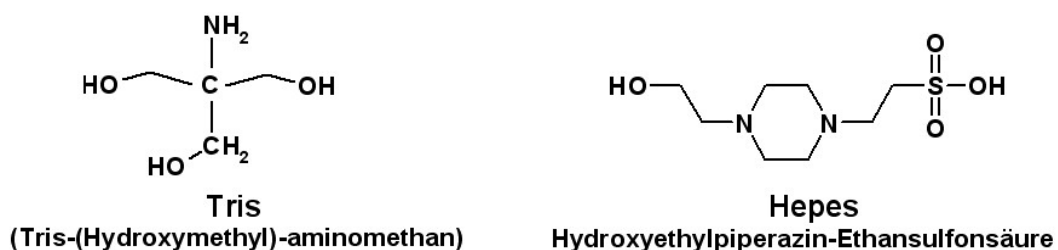


Abbildung 118: Strukturformeln der Puffersubstanzen Tris und Hepes.

Bei dem Hämocyanin von *E. californicum* wirken sowohl Tris als auch Hepes (Abbildung 118) als allosterische Effektoren ^[228]. Möglicherweise erfolgt ihre Bindung an die Kontaktstelle der beiden Dodekamere, wobei aliphatische Hydroxy-Gruppen der beiden Puffersubstanzen eine Rolle spielen könnten ^[194]. Das physiologische Äquivalent zu Tris beziehungsweise Hepes ist nicht bekannt. Der genaue Mechanismus, der es dem Hämocyanin von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* ermöglicht, unter bestimmten Bedingungen eine Mo-

nophenolhydroxylase-Aktivität zu entwickeln, ist noch ungeklärt. Der postulierte Konformationsübergang, der letztendlich dem Hämocyanin eine Cresolase-Aktivität erlaubt, wird von der Puffersubstanz (mit-)eingestellt, aber nicht verhindert: Phosphat-Puffer, in dem allein kein Tyraminumsatz möglich ist, inhibiert die einmal begonnene Katalyse (in Tris-Puffer) nur rudimentär (Abbildung 81). Dies ist umso interessanter, als dass zahlreiche Enzyme wie zum Beispiel Urease oder Carboxypeptidase, desgleichen verschiedene Kinasen und Dehydroxynasen, durch Phosphat-Puffer inhibiert werden ^[337]. Im Fall einer Inkubation in Phosphat-Puffer, zu dem nach 5 h Tris-Puffer dazugegeben wird, kommt es innerhalb von zehn weiteren Stunden nicht zu einer Reaktion. Hier kommt entweder die inhibierende Wirkung von Phosphat-Puffer zum Tragen, oder es überwiegt die deoxygenierende / denaturierende Wirkung des Aktivators SDS (Kapitel 3.3.2.1: Hämocyanin ist nur noch zu circa 50 % oxygeniert).

4.4.3.2 Regulation der Aktivität durch zweiwertige Kationen

Neben der Puffersubstanz kann als zweiter Effektor Magnesium postuliert werden. Erschwerend für alle Erklärungsansätze ist, dass MgCl_2 entgegengesetzte Auswirkungen auf die Monophenolhydroxylase-Aktivität von *P. imperator*-Hämocyanin einerseits und *E. californicum*-Hämocyanin andererseits hat. Die Vorstellung ist, dass Mg^{2+} und die Puffersubstanz in der "Verzögerungsphase" zu einer Änderung der Konfiguration führen, die dann einen Monophenolumsatz am aktiven Zentrum zulässt. Gegen diese Hypothese spricht, dass die Monophenolhydroxylase-Aktivität bei *P. imperator*-Hämocyanin in der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen sehr schwach ist. Für diese Hypothese spricht einmal die Verstärkung der Diphenoloxidase-Aktivität, und als weitere wichtige Argumente, zweitens die aktivierende / verstärkende Wirkung von MgCl_2 auf die kaum vorhandenen Monophenolhydroxylase des *E. californicum*-Hämocyanins, und drittens die aktivierende Wirkung auf den Diphenolumsatz bei Abwesenheit von anderen Aktivatoren (Kapitel 3.9.4): Durch Zugabe von 30 mM MgCl_2 kann die Diphenoloxidase des Hämocyanins von *P. imperator* und *E. californicum* ohne den üblichen Aktivator SDS aktiviert werden (Abbildung 85). Im Vergleich zu mit SDS aktiviertem Hämocyanin ist die Aktivität zwar mehr als zehnmal schwächer, aber deutlich vorhanden. Zugabe von 30 mM CaCl_2 kann sogar bei allen drei untersuchten Cheliceraten-Hämocyaninen (*P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus*) die enzymatische Aktivität ohne die Einwirkung von SDS induzieren (Abbildung 86).

SDS als Aktivator der Phenoloxidase-Aktivität ist ein schon fast traditionelles Agens (erste Anwendung 1957) und wegen seiner leichten Handhabung weit verbreitet. Trotzdem bleibt es ein unphysiologisches Detergens, und lässt die Frage nach einem physiologischen Aktivator (wenn er denn überhaupt vorhanden und die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins nicht nur ein im Labor vorhandenes Artefakt ist) offen. Magnesium oder Calcium dagegen sind als Aktivatoren im physiologischen Sinn durchaus vorstellbar. Ca^{2+} und Mg^{2+} können vom Organismus gespeichert und im Bedarfsfall freigesetzt werden. Ein Mechanismus vergleichbar mit

der Muskelkontraktion bei den Säugetieren, bei der zur Bewegung der Myosin-Filamente aus Zisternen Calcium ausgeschüttet wird, wäre denkbar. Bisher fehlt jedoch jede Kenntnis über das Vorhandensein von Ionen-Speicherorten bei den Cheliceraten.

Die Wirkung von Mg^{2+} speziell wurde untersucht, indem Hämocyanin von *P. imperator* in Tris-Puffer zur Phenoloxidase aktiviert und $MgCl_2$ entweder dazugegeben oder durch EDTA aus der Lösung entfernt wurde. Der Versuchsverlauf beginnt mit für die jeweiligen Bedingungen charakteristische Absorptionszunahmen. Die Diphenoloxidase-Aktivität wird durch Mg^{2+} erwartungsgemäß verstärkt, und durch EDTA zum Erliegen gebracht; hier greift das Kation wie erwartet in den Reaktionsmechanismus ein (Abbildung 82). Bei der Monophenolhydroxylase-Aktivität führen Zugabe von $MgCl_2$ sowohl EDTA jedoch nur zu einer Abnahme der Absorption und zu einer Verringerung der Tyraminumsatzrate (Abbildung 83 und Abbildung 84). Möglicherweise kann das Hämocyanin nach Konformationseinstellung durch einen ersten Effektor auch bei dessen Entfernung nicht mehr auf einen zweiten, späteren Effektor reagieren.

4.4.3.3 Wirkung des Substrats

Wie bereits festgestellt, sollte mit SDS vorinkubiertes Hämocyanin eine Monophenolhydroxylase-Aktivität besitzen. Die Stabilität des aktiven Zentrums wird durch den Diphenolumsatz belegt (Abbildung 58a und Abbildung 59a). Der nicht vorhandene Tyraminumsatz bietet zwei Interpretationsmöglichkeiten:

Die 'Catecholoxidase-Konformation' muss als die Standard-Konformation des enzymatisch aktiven Hämocyanins betrachtet werden, die 'Cresolase-Konformation' als eine wesentlich empfindlichere Erweiterung, die deutlich anfälliger auf beispielsweise die lange Vorinkubation reagiert.

Andererseits kann das Ausbleiben des Tyraminumsatzes auch darauf hinweisen, dass es zu einer weiteren strukturellen Veränderung als der durch SDS induzierten kommen muss, um einen Monophenolumsatz zu ermöglichen. Als Auslöser für die zweite Konformationsänderung kommt nur das Substrat selbst in Frage.

Tatsächlich können Dopa und Tyrosin in Melanomzellen einen Konformationsübergang von falsch gefalteter Tyrosinase in die korrekte native Form induzieren^[324]. In ungefärbten Melanomzellen beruht der Verlust der Pigmentierung auf der Suppression von Melanocyten-spezifischen Proteinen^[338]. Die exprimierte Tyrosinase verbleibt dabei als unreife 70 kDa Glykoform im endoplasmatischen Retikulum, wo sie durch das Proteasom abgebaut wird. Dopa und Tyrosin führen zu einer Stabilisierung des Proteins, die die Tyrosinase widerstandsfähig gegenüber Proteasen macht, eine Ausschleusung aus dem endoplasmatischen Retikulum erlaubt und durch Konformationsänderung enzymatische Aktivität induziert^[324]. Es ist dem-

nach durchaus vorstellbar, dass auch die für das Hämocyanin postulierte Konformationsänderung durch das Substrat für die Monophenolhydroxylase-Aktivität selbst ausgelöst wird.

4.4.3.4 Veränderungen am Hämocyanin zur Aktivierung der Phenoloxidase

Wie kommt es zu der Veränderung, die es Hämocyanin ermöglicht, mittels Monophenolhydroxylase-Aktivität Tyramin umzusetzen? Dieser Frage wurde in Kapitel 3.9 mit verschiedenen Methoden wie die Aufnahme von Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren von *P. imperator*-Hämocyanin in verschiedenen Puffer-Medien, zum Teil auch während des Tyraminumsatzes, nachgegangen.

Außer der erwarteten Deoxygenierung bei Hämocyanin-Inkubation mit SDS konnten keine Strukturveränderungen am respiratorischen Protein von *P. imperator*, die die Befähigung zum Tyraminumsatz erklären würden, festgestellt werden. Die Deoxygenierung durch den Aktivator SDS beginnt sofort bei Mischung der Lösungen und ist zum Großteil bereits abgeschlossen, bevor der Tyraminumsatz beginnt. Ein Zusammenhang der Fluoreszenz und des Substratumsatzes kann nicht festgelegt werden.

Bei Hämocyanin-Inkubation in Tris-Puffer mit SDS kommt es zu einem hypsochromen Shift im Fluoreszenzemissionsspektrum, der zwar reproduzierbar ist, aber nicht erklärt werden kann.

Auch auf Sekundärstrukturebene kommt es zu keinen sichtbaren Veränderungen, die die Monophenolhydroxylase-Aktivität erklären lassen. Das Hämocyanin-Molekül ist so groß, dass nur kleine Rearrangements einzelner Aminosäuren oder Kettenbereiche eventuell nicht auffallen. Insgesamt sind die eingesetzten Methoden zur Detektion einer relativ kleinen strukturellen Veränderung nicht geeignet. Nach der erfolgreichen Charakterisierung der Cresolase-Aktivität von Cheliceraten-Hämocyanin erfordert die Aufklärung dieser Fragestellung einen anderen Ansatz. Der Idealfall wäre eine Kristallstrukturanalyse von nativem und von aktiviertem Hämocyanin. Auch das Bindungsverhalten von Tris und / oder Hepes an Skorpion-Hämocyanin sollte mittels ITC untersucht werden, ebenso die Bindungsaffinitäten von Ca^{2+} und Mg^{2+} .

4.5 Immunabwehr der Cheliceraten

Das Immunsystem der Insekten ist sehr gut untersucht ^[122, 145, 146, 239, 246, 252, 339-343 und andere], vom Immunsystem der Cheliceraten dagegen ist nur relativ wenig bekannt ^[241, 242].

Das Insekten-Immunsystem ähnelt dem angeborenen Immunsystem der Vertebraten ^[103], die Abwehrreaktionen gegen die als 'nicht-selbst' erkannten Organismen werden in eine zelluläre und eine humorale Immunantwort unterteilt.

Bei der zellulären Immunantwort kommt es bei den Insekten-Hämocyten, die anhand morphologischer Kriterien in verschiedenen Zelltypen eingeteilt werden, zu einer Veränderung in Aussehen, Verhalten und Konzentrationen der verschiedenen Zelltypen ^[103]. Kleinere Partikel können phagozytiert werden, größere Partikel (Protozoen, Pilzsporen, Parasiten, deren Eier und / oder Larven) werden durch Knötchenbildung („nodule formation“) oder Einkapselung unschädlich gemacht werden. Bei der Knötchenbildung verklumpen die Partikel und zerfallende Hämocyten zu Aggregaten ^[235]. Bei der zellulären Einkapselung kommt es nach Freisetzung bestimmter Signalstoffe aus den granulären Hämocyten zur Anheftung an die Partikel, Plasmacyten lagern sich an ^[103, 235, 344]. Die Kapsel besteht aus zahlreichen Schichten der Hämocyten, die sich abflachen und eng um den fremden Partikel herum anlagern. Der Partikel wird abgetötet oder zumindest in seiner Bewegungsfähigkeit und Wachstum gehemmt ^[344].

Einkapselung und Knötchenbildung kann wie der Wundverschluss von einer Melaninablagerung begleitet werden ^[235, 240]. Die Synthese von Melanin, seinen Intermediärprodukten Chinon, und eventuell auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies tragen zur Abtötung der eingekapselten Partikel bei ^[67, 239, 345]. Bei Insekten befindet sich die inaktive Prophenoloxidase, verantwortliches Enzym für die Melaninbildung, abhängig von der Spezies in der Hämolymphe, in den Hämocyten, oder in beidem ^[103].

Bei manchen Insekten findet sich auch zellfreie Einkapselung, bei welcher die Auflagerung des einkapselnden Melanins auf die Oberfläche des Fremdkörpers aus der Hämolymphe ohne Zellbeteiligung erfolgt ^[235].

Neben der Phenoloxidase sind noch andere humorale Faktoren an der Abwehrreaktion beteiligt. Neben Lysozym finden sich weitere lytisch wirkende Proteine wie zum Beispiel Hämolysine ^[67, 346]. Verschiedene antimikrobielle Peptide wurden in den letzten 35 Jahren nachgewiesen, die zum Teil konstitutiv in der Hämolymphe vorliegen, oder nach Provokation des Immunsystems synthetisiert werden. Durch Injektion abgetöteter Bakterien können Insekten gegen an sich letale Bakterien-Injektionen unempfindlich gemacht werden. Dieser Impfungsähnliche Schutz konnte unter anderem den von Boman und Hultmark 1987 ^[252] identifizierten und charakterisierten Cecropinen, den ersten entdeckten antimikrobiellen Peptiden der Insekten, zugeschrieben werden.

Die zellulären Abwehrreaktionen der Crustaceen ähneln denen der Insekten. Eindringene Mikroorganismen lösen Phagozytose, Knötchenbildung oder Einkapselung aus. Auch hier spielt das Prophenoloxidase-aktivierende-System eine wichtige Rolle: Ihm werden Fremderkennung, opsonisierende Wirkung bei Phagozytose und Einkapselung, Steuerung der Melanisierung und cytotoxische Wirkung zugeschrieben [235, 347, 348].

Das Immunsystem anderer Invertebraten wie Myriapoden und Cheliceraten ist kaum erforscht. Bekannt ist, dass sich auch in der Hämolymphe der Pfeilschwanzkrebse Abwehrmoleküle wie zum Beispiel Lektin oder C-reaktives Protein und eine 'nicht-selbst'-getriggerte Gerinnungskaskade finden [349]. Die Hämocyten der Hämolymphe werden anhand ihrer sekretorischen Granula in L- (large) und S- (small) Hämocyten eingeteilt [119, 142]; sie speichern zahlreiche Moleküle und Komponenten des Immunsystems. So befinden sich in den L-Granula beispielsweise Gerinnungsfaktoren, Big Defensin, Lektine und antimikrobielle Peptide; in den S-Granula werden unter anderem Tachystatin, Tachycitin oder Tachyplesin gespeichert [116, 120, 349] (Abbildung 119). Diese gespeicherten Peptide werden zum Beispiel von Iwanaga [116, 349] ausführlich beschrieben.

Die Hämocyten reagieren bei Kontakt mit LPS oder β -1,3-Glucan mit Degranulation und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Diese Gerinnungskaskade wurde erstmals 1956 von Bang [350] bei *Limulus polyphemus* beschrieben: Diverse Gerinnungsfaktoren aus den L- und S-Granula werden freigesetzt und autokatalytisch zu aktiven Serinproteasen, die wiederum weitere Serinproteasen aktivieren [116, 137, 139, 140, 142, 143, 165, 351] (Abbildung 119).

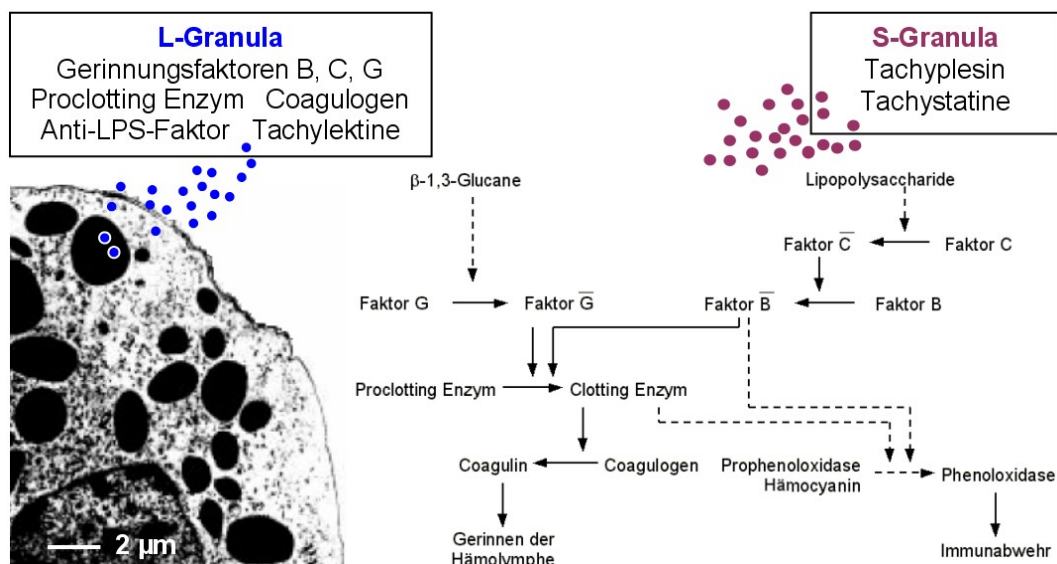


Abbildung 119: Abwehrmechanismus der Hämocyten vom Pfeilschwanzkreb.

Die Hämocyten (*Tachyplesus tridentatus*, elektronenmikroskopische Aufnahme) erkennen charakteristische Oberflächenstrukturen von pathogenen Mikroorganismen und Bakterien und initiieren die Exocytose der L- und S-Granula. Die freigesetzten Gerinnungsfaktoren werden von Lipopolysacchariden und β -Glucanen aktiviert, es kommt zur Hämolymphegerinnung. Die Pathogene werden durch Lektine immobilisiert und von antibakteriellen Substanzen unschädlich gemacht. Verändert nach [107, 116, 352].

4.5.1 Lysozym

Lysozym ist ein weit im Tier- und Pflanzenreich verbreitetes Enzym, das vor allem Gram-positive Bakterien abtötet ^[245-247, 251]. Es wird in der Regel konstitutiv exprimiert, bei Bedarf steigt die Syntheserate an ^[246, 252].

Über die Existenz von Lysozym bei den Arachnida ist nur sehr wenig bekannt ^[242]. Weberknechte besitzen Lysozym in den Nephrocyten ^[242], bei Zecken konnte es unter anderem im Verdauungssystem nachgewiesen werden ^[241, 254]. Über eine cDNA-Suche konnte kürzlich bei der Vogelspinne *Acanthoscurria gomesiana* ein Transkript mit Ähnlichkeit zu Lysozym in den Hämocyten belegt werden ^[108]. Eventuell besitzt die Wolfsspinne *Hygrolycosa rubrofasciata*, die der selben Ordnung wie die Vogelspinne angehört, Lysozym ^[353]. Weiterhin existieren über das Vorhandensein von Lysozym in Webspinnen oder anderen Ordnungen der Spinnentiere keine Untersuchungen.

In der Hämolymphe von *E. californicum* und *P. imperator* lässt sich kein Lysozym nachweisen. Das Testsystem detektierte in der Positivkontrolle, der Hämolymphe von *Locusta migratoria*, die nachgewiesenermaßen Lysozym besitzt ^[269], eine deutliche lytische Aktivität. Daher ist davon auszugehen, dass weder *E. californicum* noch *P. imperator* Lysozym besitzen.

Bei den zahlreichen Veröffentlichungen zu den ausführlichen Untersuchungen der Hämolymphe von Pfeilschwanzkrebsen (siehe unter anderem ^[116]) wird das Vorhandensein von Lysozym nicht thematisiert oder diskutiert. Dieses Fehlen von Lysozym ist unerwartet, da es in seinem Vorkommen ein über alle Stämme verteiltes Enzym ist (Tabelle 28). Allerdings sind auch andere Arthropoden bekannt, die nachweislich kein Lysozym besitzen, wie zum Beispiel die Diptere *Phormia terranovae* ^[354].

4.5.2 Lektin

Die Lektine der Säugetiere binden sich spezifisch an Zucker in den Seitenketten von Glykoproteinen pathogenen Ursprungs. Von dort können sie biochemische Reaktionen auszulösen, wie zum Beispiel Opsonisierung, Zellaggregation und Aktivierung des Komplementsystems ^[355]. Sie bestehen in der Regel aus Oligomeren mit unterschiedlicher Anzahl von Untereinheiten, zusammengehalten durch Disulfidbrücken oder nicht-kovalente Bindungen ^[356].

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein kohlehydratfreies Protein, das bei Säugetieren in der Leber gebildet wird. Es gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, deren Konzentrationen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen ansteigen. Aufgrund seines Aufbaus aus fünf identischen Untereinheiten wird es der Pentraxin-Familie zugerechnet. Es ist ein Pathogen-erkennendes Protein, das an den Phosphorylcholin-Anteil bestimmter Lipopolysaccharide in der Wand von Bakterien und Pilze bindet und sie präzipitiert. Weiterhin wirkt es als Opsonin, es bereitet die fremden Partikel zur Endocytose durch Phagocyten vor und aktiviert die Komplement-Kaskade ^[355].

Konstitutiv in der Hämolymphe beziehungsweise dem Serum der Pfeilschwanzkrebse sind vor allem Hämagglutinine, C-reaktives Protein und Lektine vorhanden. Im Gegensatz zu dem humanen C-reaktiven Protein, dessen Konzentration nur bei entzündlichen Prozessen über 0,1 mg/l ansteigt, findet sich das in der Hämolymphe von *Limulus polyphemus* exprimierte CRP mit einer Konzentration von 1 mg/ml bis 5 mg/ml ^[357]. Hinsichtlich seiner agglutinierenden Aktivität und der Wirkung auf die Phagozytose hat Pfeilschwanzkrebs-CRP Gemeinsamkeiten mit Immunglobulinen; es liegt jedoch keine Sequenzhomologie zwischen den beiden Proteinen vor ^[358, 359].

Auch in der Hämolymphe von *Eurypelma californicum* können hämagglutinierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Schafererythrocyten bilden, mit der Hämolymphe von *E. californicum* und *L. polyphemus* inkubiert, Aggregate, die mit bloßem Auge gesehen werden können. Komponenten in der Hämolymphe müssen diese Vertebratenzellen als fremd erkannt haben und die Hämagglutininierung als erste Abwehrmaßnahmen induziert haben.

Nachdem Lektine bei zahlreichen Tieren und Pflanzen ^[360] nachgewiesen werden können, ist es nicht überraschend, dass auch die Hämolymphe der Spinne *E. californicum* Hämagglutinine enthält. Damit ist zumindest bei diesen Abwehrmolekülen gelungen, Übereinstimmungen zwischen dem Immunsystem der Pfeilschwanzkrebse und der Vogelspinne aufzuzeigen.

Nachdem die ersten Lektine als Phytohämagglutinine wahrscheinlich bereits 1888 durch Stillmark ^[361] beschrieben wurden, war Noguchi ^[362] 1903 der erste, der sich mit Hämagglutininen in der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* beschäftigte. Daraufhin wurden zahlreiche N-Acetylneuraminsäure-bindenden Lektine aus der *L. polyphemus*-Hämolymphe und der anderer Pfeilschwanzkrebse isoliert: Bei *L. polyphemus* findet sich neben einem calciumabhängigen Agglutinin mit 460 kDa ^[363] auch Liphemin mit 436 kDa ^[364] und Polyphemin, das *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv), wie die anderen beiden Moleküle auch, calciumabhängig agglutiniert ^[365]. In *Tachypleus tridentatus* findet sich ebenfalls ein calciumabhängiges 533 kDa schweres Protein, das immunologisch sehr eng verwandt mit Liphemin ist ^[364, 366]. Auch bei *Carcinoscorpius rotundicauda* findet sich ein Protein mit 420 kDa, aus 16 Untereinheiten zwei verschiedener Typen mit je 27 kDa und 28 kDa, das calciumabhängig besonders Pferderythrocyten gut aggregiert ^[367, 368]. Weitere Lektine, zum Beispiel Tachylektine von *T. tridentatus* oder Limunectin von *L. polyphemus* werden in den L-Granula der Hämocyten gespeichert und bei Pathogen-Kontakt frei ^[369-371].

Vor allem Polyphemin aus der Hämolymphe von *L. polyphemus* zeigt eine mögliche und interessante Verbindung zwischen dem Immunsystem der Cheliceraten und dem respiratorischen Pigment Hämocyanin: Bei der Isolation des Polyphemins wird auch eine signifikante Menge Kupfer angesammelt ^[372]. Gilbridge und Pistole ^[372] schließen daraus, dass das Hämocyanin von *L. polyphemus* unter anderem als Agglutinin wirken könnte. Möglich wäre auch, dass Polyphemin ebenfalls Kupfer enthält, oder die Metallatome unspezifisch an das Lektin gebunden wurden. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da 95 % des Kupfers in der Hämolymphe an Hämocyanin gebunden sind ^[373]. Das Metall ist stabil in das Hämocyanin

eingebaut und kann nur unter extremen Bedingungen aus dem Molekül freigesetzt werden^[374].

4.5.3 Protease-Inhibitoren

Proteasen spielen eine wichtige Rolle für das Immunsystem der Arthropoden. Sie erst ermöglichen beispielsweise Entomopathogenen das Durchdringen der Kutikula. Auch die weitere Gewebsinvasion erfordert die Wirkung dieser Enzyme. Auf der anderen Seite steuern sie verschiedene Kaskaden und deaktivieren Proteasen, die von den eindringenden Pathogenen freigesetzt werden; dabei wird ein empfindliches Gleichgewicht zwischen aktiven Proteasen und Protease-Inhibitoren gewahrt. Zum Beispiel regulieren Proteasen das Immunsystem und die Gerinnung. Bei den Pfeilschwanzkrebsen kann die Gerinnungskaskade durch LPS oder β -1,3-Glucan aktiviert werden. Bei Kontakt mit LPS wird die Serinprotease Faktor C autokatalytisch zum aktiven Faktor $\bar{C}$ aktiviert, der daraufhin Faktor B, ebenfalls eine Serinprotease, in den aktiven Faktor $\bar{B}$ umwandelt. Dieser wiederum konvertiert das Proclotting Enzym zum Clotting Enzym, welches Coagulogen in ein unlösliches Coagulin umwandelt^[116]. Eine andere Serinprotease, Faktor G, reagiert empfindlich auf die Anwesenheit von β -1,3-Glucanen und aktiviert sich zu Faktor $\bar{G}$, der das Proclotting Enzym direkt spaltet^[107] (Abbildung 119).

Zwei dieser Serinproteasen, nämlich Faktor $\bar{B}$ und das Clotting Enzym, beide aus den L-Granula der Hämocyten, können laut Nagai und Kawabata^[107] auch das Hämocyanin von *Tachypleus tridentatus* dergestalt aktivieren, dass es als Phenoloxidase wirkt. Dabei kommt es allerdings nicht zu einem proteolytischen Vorgang, sondern vielmehr zu einer Komplexbildung, wie Versuche mit dem „active site-masked“ Clotting Enzym zeigen. Dies ist bei dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* nicht der Fall. Bereits in meiner Diplomarbeit^[150] wurden Versuche unternommen, mit dem Inhalt der Hämocyten von *Limulus polyphemus* (erhältlich als Amoebocyte Lysate (Single Test Vials), Fa. Charles River Endosafe, South Carolina, USA) das Spinnen-Hämocyanin zu aktivieren. Ebenso ohne enzymatische Aktivität waren Versuche (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Sucharit Bhakdi vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Unikliniken Mainz), bei denen Spinnen-Hämolymphe mit Bakterien und bakteriellen Proteasen inkubiert wurde.

Auch auf eine LPS-Injektion reagiert das Immunsystem der Spinne nicht auf eine direkt nachweisbare Art. Wie in Abbildung 90 zu sehen, lässt sich durch Stimulation des Immunsystems weder eine Synthese von Proteasen noch von Protease-Inhibitoren induzieren: Zwischen den Ansätzen mit Hämolymphe behandelter und unbehandelter Spinnen besteht kein Unterschied. Allerdings ist wahrscheinlich in der Hämolymphe ein konstitutiver Protease-Inhibitor vorhanden. Er wirkt auf Thermolysin, nicht aber auf Trypsin.

4.5.4 Antimikrobielle Fragmente aus Hämocyanin

In der Hämolymphe von zwei Garnelen der Art *Pennaeus vannamei* und *P. stylirostris* können Peptide mit antifungaler Aktivität nachgewiesen werden ^[134]. Diese Moleküle entstehen vermutlich durch proteolytische Spaltung des Hämocyanins, da sie 95 % bis 100 % Sequenzidentität mit dem C-Terminus des Garnelen-Hämocyanins aufweisen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Hämocyanin der Vogelspinne *E. californicum* mit den Proteasen Trypsin und Papain verdaut, in dem Bestreben, ebenfalls antimikrobiell wirksame Hämocyanin-Fragmente zu erhalten. Trypsin beispielsweise spaltet spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Bei einem „virtuellen Verdau“ der Aminosäuresequenzen des *E. californicum*-Hämocyanins findet das Programm „Genedoc“ zwischen 66 und 74 mögliche Schnittstellen in den Untereinheiten. Tatsächlich entstehen zahlreiche Banden mit Molekulargewichten hauptsächlich zwischen 70 kDa und 20 kDa (Abbildung 91). Sowohl dieser Hämocyanin-Verdau als auch Hämolymphe wurde auf inhibierende Eigenschaften hinsichtlich des Wachstums von Mikroorganismen untersucht. Das Wachstum der Mikroorganismen konnte mit Hämocyanin (intakt oder in Fragmenten) allerdings nicht gehemmt werden.

Die Vogelspinnen im Institut werden unter eher ungünstigen Bedingungen gehalten, da in dem Tierstall ohne konstante Lufttrocknung die Schimmelbildung durch ein relativ feuchtes Milieu begünstigt wird. Frühere Beobachtungen zeigen, dass ohne diese Entfeuchtung bei *E. californicum* von Hämocyanin Fragmente abgespalten werden ^[150]. Eine MALDI-Analyse eines dieser Fragmente ergab, dass es sich dabei 45 kDa schwere Teile aus der ersten Domäne der Hämocyanin-Untereinheit *a* handelt ^[150]. Prinzipiell scheint also auch das Immunsystem der Vogelspinne ähnlich zu reagieren wie bei den Crustaceen *Penaeus sp.*.

Dieses Hämocyanin-Teilstück ist deutlich größer als die bei *Penaeus sp.* beschriebenen Peptide. Dieses und andere Fragmente hatten auf das Wachstum der Testorganismen *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Saccharomyces cerevisiae* keine inhibierende Wirkung. Möglicherweise wirken die Fragment und / oder die durch Proteasen erzeugten Bruchstücke (wie bei *Penaeus sp.*) eher antifungal und wirken nicht auf die eingesetzten Bakterien und Hefe. Eine größere Bandbreite an Testorganismen wäre wünschenswert gewesen.

Der Versuch, das 45 kDa-Fragment der Untereinheit *a* zu isolieren, wurde nicht unternommen. Das Fragment ist bei der Reinigung des Hämocyanin durch SEC nicht zu erkennen, sondern wird erst bei Überbeladung einer SDS-PAGE sichtbar. Die Konzentration der verschiedenen Hämocyanin-Bruchstücke konnte nicht festgestellt werden. Das Hämocyanin liegt bei den Cheliceraten in sehr hoher Konzentration in der Hämolymphe vor. Paul et al. ^[32] konnte zeigen, dass *E. californicum* nicht die gesamte Menge des respiratorischen Protein benötigt, um seinen Sauerstoff-Bedarf zu decken. Daher ist es wahrscheinlich, dass die

Konzentration der Hämocyanin-Fragmente in der Hämolymphe erheblich ansteigen kann und eventuell bei den Versuchen in einer zu geringen Konzentration eingesetzt wurde.

4.5.5 Immunstimulation zum Nachweis antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind bei zahlreichen Organismen, vor allem bei den Insekten bekannt. Sie wirken unspezifisch und daher sehr ökonomisch, und können eindringende Pathogene sehr schnell nach deren Eindringen abwehren. Oft werden antimikrobielle Peptide sogar konstitutiv exprimiert ^[375, 376].

Bei den Invertebraten haben die AMP in Abhängigkeit der Spezies unterschiedlich Synthesorte. So wird die Synthese der AMP holometaboler Insekten durch Infektion induziert; sie findet im Fettkörper statt, die Peptide werden dann in die Hämolymphe abgegeben. Bei hemimetabolen Insekten, Asseln, Garnelen und Pfeilschwanzkrebse sind die meisten AMP konstitutiv in den granulären Hämocyten vorhanden; bei zahlreichen Arachniden finden sie sich auch im Gift ^[375].

Eine Reihe von antimikrobiellen Peptiden entsteht durch die Abspaltung von größeren Proteinen, deren eigentliche Funktion nichts mit dem Immunsystem zu tun hat ^[134, 377, 378].

Das Hämocyanin könnte neben seiner eigentlichen Funktion als respiratorisches Pigment im Immunsystem involviert sein: Als Ersatz für eine Tyrosinase oder als Quelle von antimikrobiellen Peptiden (Kapitel 4.5.4). Möglicherweise finden sich weitere antimikrobielle Peptide bei Vogelspinne oder Skorpion, ähnlich wie beispielsweise Polyphemusin, Tachyplesin, Tachycitin, Tachystatin und andere bei den Pfeilschwanzkreben ^[66, 116, 127, 135, 379, 380].

Antimikrobielle Peptide wurden von mir anhand ihrer Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur verschiedenen Gruppen zugeordnet (Abbildung 120). Andere Autoren folgen bei der Einteilung wahrscheinlichen Wirkungsmechanismen, Sequenzhomologie, funktioneller Ähnlichkeit oder dreidimensionaler Struktur ^[128, 343, 375, 376, 378, 381-384 und andere]. Die meisten AMP besitzen hydrophobe Eigenschaften und eine kationische Ladung. Sie weisen nur geringe Größe auf und nehmen eine amphipathische Struktur an, die höchstwahrscheinlich essentiell für ihren Wirkungsmechanismus ist (Abbildung 6).

Die meisten AMP von Cheliceraten werden in den Giften von Spinne oder Skorpionen gefunden. Sie sind Bestandteile einer komplexen Mischung aus Myo- und Neurotoxinen, Proteinen, Polypeptiden, Nukleinsäuren und anorganischen Salzen ^[385].

In der Hämolymphe von Spinnen konnten tatsächlich erst zwei AMP nachgewiesen werden: So findet sich bei der Vogelspinne *Acanthoscurria gomesiana* Acanthoscurrin, ein Glycinreiches lineares kationisches Peptid der Hämocyten ^[375]. Ebenfalls in den Hämocyten findet sich Gomesin, ein 2,27 kDa schweres Peptid aus 18 Aminosäuren ^[386]. Es hat zwei Disulfid-

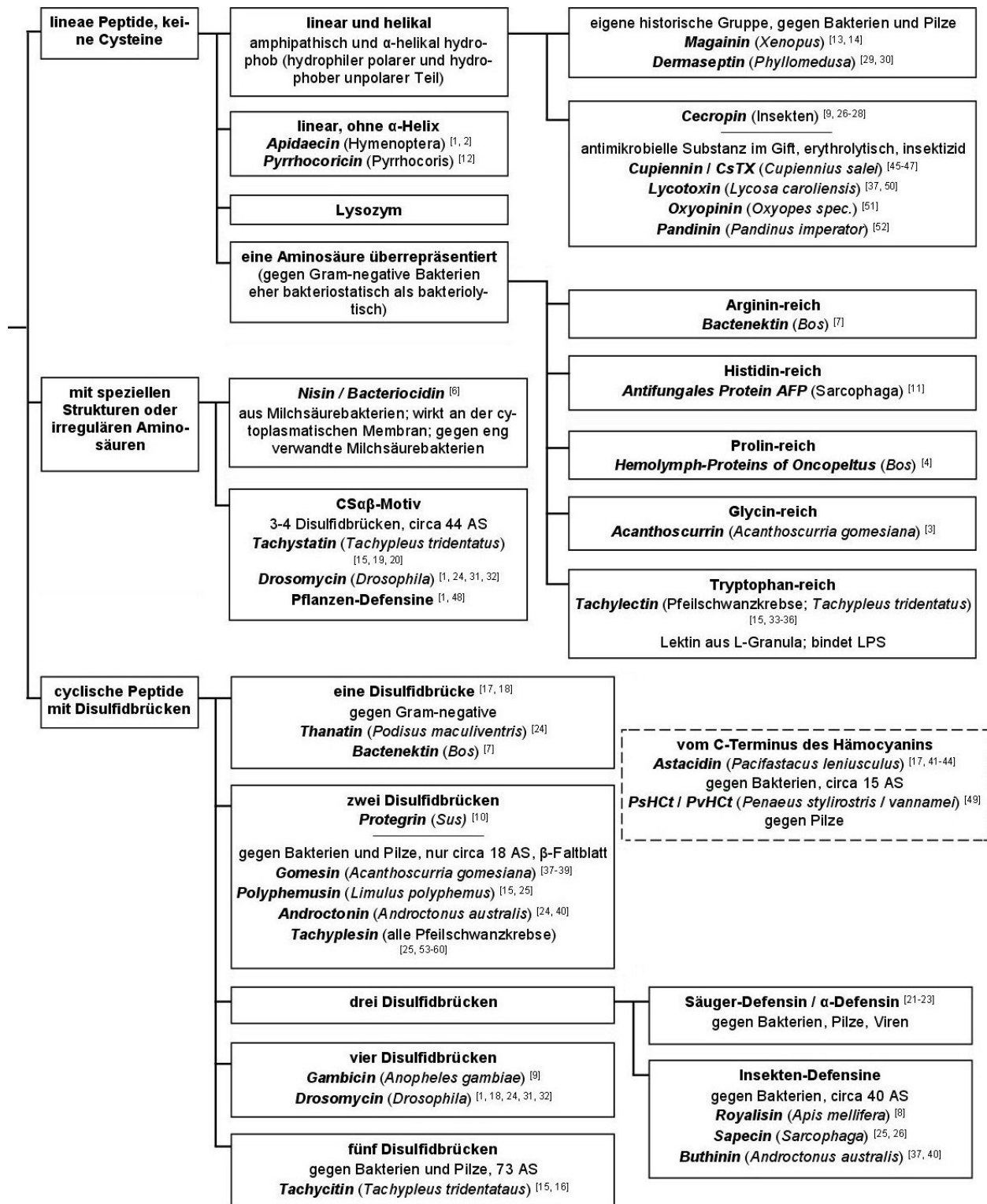


Abbildung 120: Strukturelle Einteilung der antimikrobiellen Peptide aus Cheliceraten.

Die AMP (antimikrobiellen Peptide) wurden anhand ihrer Primär- und Sekundärstruktur verschiedenen Gruppen zugeordnet. Falls für eine bestimmte Gruppe (zum jetzigen Zeitpunkt noch) keine Cheliceraten-AMP existieren, wurden exemplarisch Vertreter anderer Tiergruppen ausgewählt. Astacidin, PsHct und PvHct (und zahlreiche andere) spalten sich von bereits existierenden Peptiden mit gänzlich anderer Funktion ab, und wurden daher als eigene Gruppe in dieses Schema eingefügt.

Literaturnachweise für diese Abbildung finden sich separat am Ende der Arbeit Seite 301.

brücken und seine Sequenz ähnelt dem Tachyplesin und Polyphemusin der Pfeilschwanzkrebse und dem hydrophilen Androctonin aus der Hämolymphe von *Androctonus australis* ^[387]. Da das Genom der Vogelspinne noch nicht durchsequenziert wurde, ist eine Suche nach ähnlichen Peptiden bei *E. californicum* zur Zeit noch nicht möglich.

Trotz der in der Regel konstitutiven Synthese von AMP bei den Spinnentieren wurde versucht, das Immunsystem von *E. californicum* solchermaßen anzuregen, dass neue AMP (beispielsweise durch Abspaltung von Hämocyanin) entstehen oder die Synthese von bereits vorhandenen AMP verstärkt wird.

Den Spinnen wurde zur Anregung des Immunsystems Suspensionen mit *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, LPS oder Zymosan-Überstand injiziert. Da die Tiere die Injektion von fremden Partikeln und lebenden Mikroorganismen überlebten, muss ihr Immunsystem diese Pathogene erfolgreich abgewehrt haben. Die Schwierigkeit besteht demzufolge darin, die wirksamen Komponenten der Immunabwehr nicht nur so indirekt, sondern auch in einem geeigneten Testsystem nachzuweisen, zu identifizieren und zu isolieren.

Mit einem Test zur Wachstums-Hemmung verschiedener Mikroorganismen gelang dies nicht. Tatsächlich überlebten Spinnen eine Injektion von *M. luteus*, die Hämolymphe konnte aber gleichzeitig nicht das Wachstum von *M. luteus* auf Agarplatten inhibieren.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine hochauflösende Trennungsmethode, mit der Veränderungen in der Hämolymphe-Zusammensetzung detektiert werden könne. Nach Immunstimulation mit LPS konnten vier neue Protein-Spots in der Hämolymphe von behandelten Spinnen nachgewiesen werden.

Analyse mittels MALDI-TOF konnte Spot D (Abbildung 95) als Fragment der *E. californicum*-Hämocyanin-Untereinheit *f* identifizieren. Die weiteren Spots sind mit Spinnen-Hämocyanin nicht identisch; sie müssen zur weiteren Untersuchung sequenziert werden.

Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte neben dem Bruchstück der Untereinheit *a* ^[150] also zumindest ein weiteres Hämocyanin-Fragment nachgewiesen werden; nämlich das C-terminale Ende der Untereinheit *f*. Durch andere Methoden wie zum Beispiel Western Blotting, die prinzipiell geeignet gewesen wäre, über Hämocyanin-Antikörper-Bindung Fragmente nachzuweisen, konnte weder dieses Hämocyanin-Bruchstück von 30 kDa noch das von Untereinheit *a* mit 45 kDa ^[150] entdeckt werden (Kapitel 3.10.5.2).

Die beiden Bruchstücke sind vermutlich bei einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems, sei es durch die Injektion von LPS oder durch schlechte Umweltbedingungen (Schimmelbildung) durch Spaltung des Hämocyanins entstanden. Die Kapazität zur Sauerstoffbindung des Gesamt-Hämocyanins in der Spinnen-Hämolymphe ist in der Regel um ein Vielfaches größer als der Bedarf ^[34]. Eine Funktion des Hämocyanins als Quelle von antimikrobiellen Peptiden ist demnach durchaus denkbar.

Mit mittlerweile zwei verschiedenen Hämocyanin-Fragmenten sollten in Anlehnung an Destoumieux-Garzón ^[134] eine Testreihe mit zahlreichen verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt werden, um die tatsächliche antimikrobielle Aktivität von Hämocyanin beziehungsweise seiner Spaltprodukte zu erforschen. Aufgrund der bekannten Sequenz des *E. californicum*-Hämocyanins könnten die Fragmente synthetisch hergestellt werden und damit auch in hohen Konzentrationen eingesetzt werden.

Bei den verschiedenen Versuchen zur Stimulation des Immunsystems von *E. californicum* wurde den Spinnen die Mikroorganismen-Suspension entweder injiziert oder über ein Braunüle verabreicht. Bei größeren Mengen injizierter Flüssigkeit tritt die Injektionslösungen meistens durch den hohen Druck im Opistosoma sofort wieder aus. Daher wurden die Lösungen zum Teil über die weiche Plastiknadel einer Braunüle appliziert und diese dann verschlossen. Um ein Herausrutschen der Braunüle zu verhindern, wurden die Spinnen in einem kleinen Plastikschildchen eingesperrt, das mit Watte ausgestopft war und Bewegung der Spinnen verhindern sollte. Trotzdem konnten sich zwei Tiere von den Plastiknadeln befreien; ihre ausgetretene Hämolymphe färbte die Watte blau und braun (Abbildung 92). Wie von Hübler beschrieben, bleibt das respiratorische Protein von *E. californicum* bei Temperatur bis 75°C stabil ^[305]. Daher besteht kein Grund zur Annahme, dass dieses Hämocyanin nach weniger als 24 h und Temperatur von circa 22°C nicht ebenfalls in seiner nativen Form verblieben sein soll. Die Braunfärbung der Hämolymphe ist möglicherweise durch eine Melanisierungsreaktion entstanden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hämocyanin von *Pandinus imperator*

Bei dem Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* handelt es sich um ein 24-meres respiratorisches Pigment, das circa 85 % des Proteins in der Hämolymphe ausmacht.

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und dynamischer Lichtstreuung kann die äußere Dimension des gereinigten *P. imperator*-Hämocyanins auf circa 20 x 20 x 10 nm abgeschätzt werden. Bei analytischer Ultrazentrifugation ergibt sich ein Sedimentationskoeffizient von 37 S ($S_{20, w}$), der in guter Übereinstimmung zu dem anderer Skorpion-Hämocyanine und zu dem Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* steht.

Auch das spektroskopische Verhalten von *P. imperator*- und *E. californicum*-Hämocyanin ist ähnlich: Im oxygenierten Zustand finden sich drei Absorptionsmaxima bei 280 nm, 340 nm und 560 nm, deren Intensitäten sich im Verhältnis 100 : 24 : 2 zueinander befinden.

Fluoreszenzemissionsspektren von *Pandinus imperator*-Hämocyanin zeigen zwei Maxima: Einmal bei 304 nm, wahrscheinlich durch Tyrosine verursacht, und ein größeres Maximum bei 325 nm, hervorgerufen durch Tryptophane.

Die Sekundärstrukturanalyse von *P. imperator*-Hämocyanin ergibt 33 % α -helikale Anteile im Protein, 20 % β -Faltblätter, 17 % Turns und 29 % statistisches Zufallsknäuel. Das Hämocyanin von *P. imperator* ähnelt in seinem Aufbau damit dem von *Buthus indicus*, *Eurypelma californicum*, *Limulus polyphemus* und anderen Arthropoden-Hämocyaninen.

Bei Untersuchungen im nativen Polyacrylamidgel ohne Calcium- und Magnesium-Ionen läuft Hämocyanin von *P. imperator* trotz Übereinstimmung in äußerer Form und Dimension sowie gleichem Molekulargewicht weiter ins Gel ein als Hämocyanin von *E. californicum*. Zudem zerbricht es während der Wanderung durch die Gelmatrix teilweise in seine dodekameren Halbmoleküle. Dieses Auseinanderfallen in 12-mere kann durch Anwesenheit von zusätzlichen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen in Trenn- und Sammelgel verhindert werden.

Trennung der Untereinheiten

Die Dissoziation der Untereinheiten wird weniger durch den pH-Wert als vielmehr durch einen Mangel der Struktur-erhaltenden Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} ausgelöst. Nach alkalischer Dissoziation entstehen monomere Dissoziationsprodukte, die eine Größe von circa 4 S haben; es existiert kein Dimer.

Die dissoziierten Untereinheiten können mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule und einem KCl-Gradienten im Elutionsmittel aus Dissoziationspuffer isoliert werden. Das 24-mere Hämocyanin setzt sich aus elf elektrophoretisch und sieben bis neun immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten mit Molekulargewichten um 66 kDa zusammen.

Enzymatische Aktivität von Hämocyanin

Nach derzeitigen Erkenntnissen besitzen Vogelspinnen und Skorpione keine echte Tyrosinase. Nahezu identische Strukturen der aktiven Zentren von Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Hämocyaninen legen jedoch nahe, dass Hämocyanin mit seiner Monophenolhydroxylase- und / oder Diphenoloxidase-Aktivität den Platz des fehlenden Enzyms Tyrosinase einnehmen könnte.

Während mittlerweile anerkannt ist, dass es sich bei der Diphenoloxidase-Aktivität der Hämocyanine von Crustaceen und Cheliceraten um eine allgemeine Eigenschaft handelt, konnte von mir erstmals reproduzierbar eine Monophenolhydroxylase-Aktivität für die Hämocyanine von *Pandinus imperator* und *Eurypelma californicum* nachgewiesen und charakterisiert werden.

Die Aktivität kann mit verschiedenen Aktivatoren induziert werden. So kann die Diphenoloxidase durch Trypsin, Chymotrypsin und durch die Lipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin aktiviert werden. Sowohl Di- als auch Monophenolhydroxylase-Aktivität werden durch SDS, Trypsin und CPC induziert; letzteres ist für photometrische Untersuchungen allerdings nicht geeignet. Tatsächlich stellt das anionische Detergenz SDS, dessen standardmäßige Verwendung mit leichter Handhabung und einer langen Tradition begründet wird, den besten Aktivator für sowohl Diphenoloxidase- und Monophenolhydroxylase-Aktivität dar.

Der Puffer hat sich bei den Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität als ausschlaggebend herausgestellt. Während die Diphenoloxidase von Cheliceraten-Hämocyanin relativ unspezifisch in allen untersuchten Puffern aktiviert werden konnte, konnte im Gegensatz dazu in Aqua dest., Phosphat-Puffer, Borat-Puffer oder Ringer-Lösung keine Monophenolhydroxylase-Aktivität induziert werden. In Tris- und in Hepes-Puffer dagegen findet neben Dopamin- auch Tyraminumsatz statt. Untersuchungen zur Sauerstoffbindung von *E. californicum*-Hämocyanin in Tris- und in Hepes-Puffer lassen auf gleiche Bindungs-Qualität und -Quantität schließen, was die Vermutung nahe legt, dass sie sich als allosterische Effektoren verhalten.

Bei Untersuchungen zur pH-Präferenz der enzymatischen Aktivität verhält sich Hämocyanin wie eine echte Phenoloxidase (Vergleich mit Mushroom-Tyrosinase). Beide Cheliceraten-Hämocyanine zeigen am sauren Ende des überprüften pH-Bereichs (von pH 6,6 bis 8,0) die stärkste Aktivität.

Hinsichtlich der Substratspezifität werden die Diphenole Dopamin und L-Dopa gut umgesetzt, ebenso die Monophenole Tyramin und Methylphenol (*p*-Cresol). Wenig bis kaum können 4-*tert*-Butylphenol und 2,4-*di-tert*-Butylphenol sowie das schwer lösliche Tyrosin umgesetzt

werden. Das Hämocyanin ist somit ein Katalysator, der zwei enzymatische Aktivitäten in sich vereint. Diese können unter verschiedenen Bedingungen getrennt voneinander induziert werden, im Gegensatz zu den echten Tyrosinase, bei denen immer beide Reaktionsschritte (Hydroxylierung und Oxidation) ablaufen.

Die Untersuchung der Skorpion-Hämolymphe mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie ergibt einen Gehalt von 30 mg/l Magnesium ($1,24 \text{ mM Mg}^{2+}$) und einen Calciumgehalt von 180 mg/l ($4,5 \text{ mM Ca}^{2+}$).

Von allen untersuchten Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- beeinflusst Mg^{2+} die enzymatische Aktivität des Hämocyanins am deutlichsten. Die Diphenoloxidase-Aktivität von *P. imperator*-, *E. californicum* und *L. polyphemus*-Hämocyanin wird durch Mg^{2+} beträchtlich verstärkt. Dies ist auch bei anderen Oligomerisierungszuständen des Hämocyanins (*P. imperator*-Dissoziat, *E. californicum*-Dimer *bc*) der Fall. Die Monophenolhydroxylase von *E. californicum*-Hämocyanin wird ebenfalls durch Mg^{2+} verstärkt, die von *P. imperator*-Hämocyanin dagegen gehemmt. Die Ursache für diese Unterschiede ist noch unklar.

Der starke Einfluss von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} wird auch dadurch offensichtlich, dass durch Zugabe des Metallsalzes die Diphenoloxidase des Hämocyanins von *P. imperator*, *E. californicum* und *L. polyphemus* ohne den üblichen Aktivator SDS aktiviert werden kann. Die Aktivität ist im Vergleich zu dem mit SDS aktivierten Hämocyanin zwar schwächer, aber eindeutig vorhanden. Als Aktivatoren im physiologischen Sinn sind Magnesium oder Calcium durchaus vorstellbar.

Stabilität und enzymatische Kontrolle der Funktionalität

Versuche zur Stabilität des Hämocyanins zeigen, dass die Widerstandsfähigkeit des Proteins gegenüber der Temperatur für den Lebensraum des Skorpions (tropische Wälder Westafrikas) ausreichend ist. Das Medium, in dem sich das Hämocyanin befindet, ist dabei entscheidend für die Thermostabilität der Struktur. Die in der Hämolymphe enthaltenen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen stabilisieren die Quartär- und Sekundärstruktur des Proteins. Unter diesen Bedingungen kann es Temperaturen bis 80°C tolerieren, wie Untersuchungen mit Circular dichroismus- und Fluoreszenzspektroskopie belegen.

Die Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien (SDS und Guanidin-Hydrochlorid) wird durch Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen ebenso verbessert.

Die stabilisierende Rolle von Mg^{2+} -Ionen erstreckt sich nicht auf das aktive Zentrum des Hämocyanins. Hämocyanin von *P. imperator* verliert bei Inkubation mit SDS und Mg^{2+} den gebundenen Sauerstoff deutlich schneller als bei Inkubation nur mit SDS. Ein ähnliches Verhalten kann auch für *P. imperator*-Dissoziat und Hämocyanin von *E. californicum* (oligomeres Protein und Dimer *bc*) aufgezeigt werden.

Da die alleinige Untersuchung der generellen Struktur-Stabilität des Hämocyanins gegenüber denaturierenden Detergenzien keinerlei Aussagen von physiologischer Relevanz erlaubt, wurde die Funktionalität des mit SDS inkubierten Hämocyanins überprüft.

Sowohl das Hämocyanin von *Pandinus imperator* als auch von *Eurypelma californicum* besitzen nach fünfzehn Stunden Inkubation mit SDS noch immer Diphenoloxidase-Aktivität. Obgleich sich mit diesen Versuchen das aktive Zentrum als funktionsfähig gezeigt hat, ist keines der beiden Hämocyanine zu einem Tyraminumsatz fähig. Intuitiv gesehen ist die Inkubation mit SDS eine Art Vorinkubation, der sofortige Beginn des Tyraminumsatzes wurde erwartet. Entweder war jedoch die Vorinkubation zu lang, oder es muss noch zu einer weiteren strukturellen Veränderung als der durch SDS induzierten kommen, um einen Monophenolumsatz zu ermöglichen. Als Auslöser für die zweite Konformationsänderung kommt nur das Substrat in Frage.

Initiation der Monophenolhydroxylase-Aktivität

Die Monophenolhydroxylase-Aktivität von Hämocyanin ist extrem vom gewählten Puffer-Medium abhängig. Tris-Puffer und Hepes-Puffer ermöglichen einen Tyraminumsatz, während in Wasser, Ringer-Lösung, Phosphat- oder Borat-Puffer nur eine Diphenoloxidase-Aktivierung initiiert werden kann.

Mg²⁺ wirkt dabei als Regulator der Phenoloxidase-Aktivität. Die Diphenoloxidase-Aktivität wird durch Mg²⁺ verstärkt, und nach Entfernung des Mg²⁺ (durch EDTA) zum Erliegen gebracht. Die eingestellte Monophenolhydroxylase-Aktivität kann durch Zugabe eines anderen Puffers oder durch Zugabe beziehungsweise Entfernung von Mg²⁺ nicht grundlegend verändert werden.

Eine Detektion möglicher kleiner struktureller Veränderungen konnte durch Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren nicht nachgewiesen werden.

Wie sehr die Hämocyanine letztendlich echten Tyrosinasen ähneln, wird durch die Lag-Phase deutlich: Während Diphenole durch Tyrosinasen sofort umgesetzt werden, entsteht bei Monophenolen eine sogenannte Lag-Phase von wenigen Minuten, bevor der Substratumsatz beginnt. Begründet wird dieser Umstand damit, dass die aktiven Zentren der Phenoloxidase im Ruhezustand zu mehr als 85 % in der met-Form vorliegen und nur die aktiven Zentren, die nicht im met-Zustand vorliegen, die Hydroxylierung von Monophenolen katalysieren können. Die Lag-Phase beim Umsatz von Monophenolen durch Tyrosinasen und Hämocyanin kann durch den Zusatz von katalytischen Mengen an Diphenol eliminiert werden. Damit wird allerdings den Ergebnissen widersprochen, die Cheliceraten-Hämocyanin bei normalem Sauerstoffpartialdruck als vollständig mit Sauerstoff beladen finden.

Immunabwehr der Cheliceraten

Das Immunsystem der Cheliceraten ist kaum untersucht. Sie besitzen ein angeborenes Immunsystem, das Abwehrreaktionen gegen als 'nicht-selbst' erkannte Organismen auslöst. Diese Reaktionen werden in zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt.

Bestandteil der humoralen Immunantwort sind unter anderem Lysozym und Lektin. Über die Existenz von Lysozym bei den Arachnida ist nur sehr wenig bekannt; Weberknechte und möglicherweise Zecken besitzen Lysozym, ebenso die Spinnen *Acanthoscurria gomesiana* und *Hygrolycosa rubrofasciata*. In der Hämolymphe von *E. californicum* und *P. imperator* dagegen lässt sich kein Lysozym nachweisen.

Lektine finden sich bei der Vogelspinne *E. californicum* und dem Pfeilschwanzkrebs *L. polyphemus*. Die Hämolymphe beider Cheliceraten hat keine hämolysierende Aktivität.

Antimikrobielle Peptide können das Wachstum von Mikroorganismen verhindern. In der Hämolymphe der Vogelspinne existieren Mechanismen, die es den Tieren ermöglichen, Injektionen von lebenden *Micrococcus luteus*, *Eschericia coli*, *Salmonella typhimurium* oder *Saccharomyces cerevisiae* zu überleben. Welche Faktoren dies sind, konnte trotz intensiven Nachforschungen nicht aufgedeckt werden. Allerdings entstehen in der Hämolymphe nach Mikroorganismen-Injektion in die Spinnen mindesten vier neue Proteine, die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden, aber nicht weiter charakterisiert werden konnten.

Das Fehlen einer 'echten' Phenoloxidase-Aktivität mit der Fähigkeit, sowohl mono- als auch diphenolische Substrate umzusetzen, stützt die Hypothese, dass aktiviertes Hämocyanin an die Stelle von Phenoloxidasen treten kann.

6 LITERATUR

1. Storch V, Welsch U
Kurzes Lehrbuch der Zoologie
1994 Gustav Fischer Verlag Stuttgart
2. van Holde K, Miller K
Hemocyanins
1995 Adv Protein Chem (47) pp 1-81
3. Decker H, Terwilliger N
Cops and Robbers: Putative Evolution of Copper Oxygen-Binding Proteins
2000 J Exp Biol (203) pp 1777-1782
4. van Holde K, Miller K, Decker H
Hemocyanins and Invertebrate Evolution
2001 J Biol Chem (276) pp 15563-15566
5. Burmester T
Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily
2001 Mol Biol Evol (18) pp 184-195
6. Burmester T
Origin and Evolution of Arthropod Hemocyanins and Related Proteins
2002 J Comp Physiol [b] (172) pp 95-107
7. Beintema J, Stam W, Hazes B, Smidt M
Evolution of Arthropod Hemocyanins and Insect Storage Proteins (Hexamerins)
1994 Mol Biol Evol (11) pp 493-503
8. Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T
Complete Sequence of the 24-mer Hemocyanin of the Tarantula *Eurypelma californicum*.
Structure and Intramolecular Evolution of the Subunits
2000 J Biol Chem (275) pp 39339-39344
9. Linzen B
Blaues Blut: Struktur und Evolution der Hämocyanine
1989 Naturwissenschaften (76) pp 206-211
10. Markl J, Decker H
Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins
1992 Adv Comp Environ Phys (13) pp 325-376
11. Terwilliger N, Dangott L, Ryan M
Cryptocyanin, a Crustacean Molting Protein: Evolutionary Link with Arthropod Hemocyanins
and Insect Hexamerins
1999 Proc Natl Acad Sci USA (96) pp 2013-2018
12. Burmester T
Identification, Molecular Cloning, and Phylogenetic Analysis of a Non-Respiratory Pseudo-
Hemocyanin of *Homarus americanus*
1999 J Biol Chem (274) pp 13217-13222

13. Gaykema W, Hol W, Vereijken J, Soeter N, Bak H, Beintema J
3.2 Å Structure of the Copper-Containing Oxygen-Carrying Protein *Palinurus interruptus* Haemocyanin
1984 Nature (309) pp 23-29
14. Volbeda A, Hol W
Crystal Structure of Hexameric Haemocyanin from *Panulirus interruptus* Refined at 3.2 Å Resolution
1989 J Mol Biol (209) pp 249-279
15. Magnus K, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol W
Crystallographic Analysis of Oxygenated and Deoxygenated States of Arthropod Hemocyanin Shows Unusual Differences
1994 Proteins (19) pp 302-309
16. Jaenicke E, Decker H, Gebauer W, Markl J, Burmester T
Identification, Structure, and Properties of Hemocyanins from Diplopod Myriapoda
1999 J Biol Chem (274) pp 29071-29074
17. Decker H, Markl J, Loewe R, Linzen B
Hemocyanins in Spiders, VIII. Oxygen Affinity of the individual Subunits isolated from *Eurypelma californicum* Hemocyanin
1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (360) pp 1505-1507
18. Savel-Niemann A, Markl J, Linzen B
Hemocyanins in Spiders. XXII. Range of Allosteric Interaction in a four-hexamer Hemocyanin. Co-Operativity and Bohr Effect in Dissociation Intermediates
1988 J Mol Biol (204) pp 385-395
19. Koshland D, Jr., Nemethy G, Filmer D
Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits
1966 Biochemistry (5) pp 365-385
20. Adair G
The Hemoglobin System. VI. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin
1925 J Biol Chem (63) pp 529-545
21. Pauling L
The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation
1935 Proc Natl Acad Sci USA (21) pp 186-191
22. Monod J, Wyman J, Changeux J
On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model
1965 J Mol Biol (12) pp 88-118
23. Decker H, Sterner R
Nested Allostery of Arthropodan Hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The Role of Protons
1990 J Mol Biol (211) pp 281-293
24. de Haas F, van Bruggen E
The Interhexameric Contacts in the four-hexameric Hemocyanin from the Tarantula *Eurypelma californicum*. A Tentative Mechanism for Cooperative Behavior
1994 J Mol Biol (237) pp 464-478

-
25. Decker H, Savel-Niemann A, Korschenhausen D, Eckerskorn E, Markl J
Allosteric Oxygen-Binding Properties of Reassembled Tarantula (*Eurypelma californicum*) Hemocyanin with Incorporated apo- or met-Subunits
1989 Biol Chem Hoppe Seyler (370) pp 511-523
 26. Decker H, Robert C, Gill S
Nesting - An Extension of the Allosteric Model and its Application to Tarantula Hemocyanin in Linzen B
Invertebrate Oxygen Carriers
1986 Springer Heidelberg
 27. Loewe R, Linzen B
Haemocyanins in Spiders, II. Automatic Recording of Oxygen Bindingcurves, and the Effect of Mg^{2+} on Oxygen Affinity, Cooperativity, and Subunit Association of *Cupiennius salei* Haemocyanin
1975 J Comp Physiol (98) pp 147-156
 28. Decker H
Nested Allosterity in Scorpion Hemocyanin (*Pandinus imperator*)
1990 Biophys Chem (37) pp 257-263
 29. Robert C, Decker H, Richey B, Gill S, Wyman J
Nesting: Hierarchies of Allosteric Interactions
1987 Proc Natl Acad Sci USA (84) pp 1891-1895
 30. Hellmann N
Bohr-Effect and Buffering Capacity of Hemocyanin from the Tarantula *E. californicum*
2004 Biophys Chem (109) pp 157-167
 31. Schartau W, Leidescher T
Composition of the Hemolymph of the Tarantula *Eurypelma californicum*
1983 J Comp Physiol (152) pp 73-77
 32. Paul R, Bergner B, Pfeffer-Seidl A, Decker H, Efinger R, Storz H
Gas Transport in the Haemolymph of Arachnids - Oxygen Transport and the Physiological Role of Haemocyanin
1994 J Exp Biol (188) pp 25-46
 33. Paul R, Pfeffer-Seidl A, Efinger R, Pörtner H, Storz H
Gas Transport in the Haemolymph of Arachnids - Carbon Dioxide Transport and Acid-Base Balance
1994 J Exp Biol (188) pp 47-63
 34. Paul R, Decker H, Schartau W
Das blaue Blut der Vogelspinnen
1992 Naturwissenschaftliche Rundschau (6) pp 216-223
 35. Jaenicke E, Foll R, Decker H
Spider Hemocyanin Binds Ecdysone and 20-OH-Ecdysone
1999 J Biol Chem (274) pp 34267-34271
 36. Adachi K, Endo H, Watanabe T, Nishioka T, Hirata T
Hemocyanin in the Exoskeleton of Crustaceans: Enzymatic Properties and Immunolocalization
2005 Pigment Cell Res (18) pp 136-143

37. Linzen B, Soeter N, Riggs A, Schneider H, Schartau W, Moore M, Yokota E, Behrens P, Nakashima H, Takagi T, Nemoto T, Vereijken J, Bak H, Beintema J, Volbeda A, Gaykema W, Hol W
The Structure of Arthropod Hemocyanins
1985 Science (229) pp 519-524
38. Markl J, Kempter B, Linzen B, Bijlholt M, van Bruggen E
Hemocyanins in Spiders, XVI. Subunit Topography and a Model of the Quaternary Structure of *Eurypelma* Hemocyanin
1981 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (362) pp 1631-1641
39. Schartau W, Eyerle F, Reisinger P, Geisert H, Storz H, Linzen B
Hemocyanins in Spiders, XIX. Complete Amino-Acid Sequence of Subunit *d* from *Eurypelma californicum* Hemocyanin, and Comparison to Chain *e*
1983 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (364) pp 1383-1409
40. Schartau W, Metzger W, Sonner P, Geisert H, Storz H
Hemocyanins in Spiders, XXIII. Complete Amino-Acid Sequence of Subunit *a* of *Eurypelma californicum* Hemocyanin
1990 Biol Chem Hoppe Seyler (371) pp 557-565
41. Schneider HJ, Drexel R, Feldmaier G, Linzen B, Lottspeich F, Henschen A
Hemocyanins in Spiders, XVIII. Complete Amino-Acid Sequence of Subunit *e* from *Eurypelma californicum* hemocyanin
1983 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (364) pp 1357-1381
42. Markl J
Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine
1995 Forschungsmagazin der Universität Mainz (1/95) pp 50-59
43. Heimerl R, Decker H
Zur Struktur und Funktion des Skorpionhämocyanins (*Pandinus imperator*)
1989 Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (82) pp 226-227
44. Ali S, Zaidi Z, Abbasi A
Oxygen Transport Proteins: I. Structure and Organization of Hemocyanin from Scorpion (*Buthus indicus*)
1995 Comp Biochem Physiol A Physiol (112) pp 225-232
45. Ali S, Abbasi A, Stoeva S, Kayed R, Dolashka-Angelova P, Schwarz H, Voelter W
Oxygen Transport Proteins: III. Structural Studies of the Scorpion (*Buthus indicus*) Hemocyanin, Partial Primary Structure of its Subunit *Bsin1*
2000 Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol (126) pp 361-376
46. Linzen B
Subunit Heterogeneity in Arthropod Hemocyanins
1983 Life Chem Rep Suppl (1) pp 27-38
47. Markl J
Evolution and Function of Structurally Diverse Subunits in the Respiratory Protein Hemocyanin from Arthropods
1986 Biological Bulletin (171) pp 90-115

-
48. Perbandt M, Guthöhrlein E, Rypniewski W, Idakieva K, Stoeva S, Voelter W, Genov N, Betzel C
The Structure of a Functional Unit from the Wall of a Gastropod Hemocyanin Offers a Possible Mechanism for Cooperativity
2003 *Biochemistry* (42) pp 6341-6346
 49. Cuff M, Miller K, van Holde K, Hendrickson W
Crystal Structure of a Functional Unit from *Octopus* Hemocyanin
1998 *J Mol Biol* (278) pp 855-870
 50. van Holde K
Respiratory Proteins of Invertebrates: Structure, Function and Evolution
1997/98 *Zoology* (100) pp 287-297
 51. Harris J, Markl J
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): A Biomedical Review
1999 *Micron* (30) pp 597-623
 52. Salvato B, Beltramini M
Hemocyanins: Molecular Architecture, Structure and Reactivity of the Binuclear Copper Site
1990 *Life Chem Rep* (8) pp 1-47
 53. Gielens C, Benoy C, Preaux G, Lontie R
Presence of Only Seven Functional Units in the Polypeptide Chain of the Haemocyanin of the Cephalopod *Octopus vulgaris*
in Linzen B
Invertebrate Oxygen Carriers
1986 Springer Heidelberg
 54. Falbe J, Regitz M
Römpf Chemie Lexikon (Band 6)
1992 Georg Thieme Verlag Stuttgart
 55. Decker H, Schweikardt T, Tuzcek F
The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered?
2006 *Angew Chem Int Ed Engl* (45) pp 4546-4550
 56. Riley P
Melanin
1997 *Int J Biochem Cell Biol* (29) pp 1235-1239
 57. Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F
Tyrosinase: A Comprehensive Review of its Mechanism
1995 *Biochim Biophys Acta* (1247) pp 1-11
 58. Sugumaran M
Comparative Biochemistry of Eumelanogenesis and the Protective Roles of Phenoloxidase and Melanin in Insects
2002 *Pigment Cell Res* (15) pp 2-9
 59. Furumura M, Solano F, Matsunaga N, Sakai C, Spritz R, Hearing V
Metal Ligand-binding Specificities of the Tyrosinase-Related Proteins
1998 *Biochem Biophys Res Commun* (242) pp 579-585

60. Falbe J, Regitz M
Römpf Chemie Lexikon (Band 4)
1991 Georg Thieme Verlag Stuttgart
61. Johansson M, Söderhäll K
The Prophenoloxidase Activating System and Associated Proteins in Invertebrates
1996 Prog Mol Subcell Biol (15) pp 46-66
62. Holick M
Vitamin D: Importance in the Prevention of Cancers, Type 1 Diabetes, Heart Disease, and Osteoporosis
2004 Am J Clin Nutr (79) pp 362-371
63. Peter M
Die molekulare Architektur des Exoskeletts von Insekten
1993 Chemie in unserer Zeit (27) pp 189-197
64. Hopkins T, Kramer K
Insect Cuticle Sclerotisation
1992 Annu Rev Entomol (37) pp 273-302
65. Decker H, Ryan M, Jaenicke E, Terwilliger N
SDS-Induced Phenoloxidase Activity of Hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*
2001 J Biol Chem (276) pp 17796-17799
66. Nagai T, Osaki T, Kawabata S
Functional Conversion of Hemocyanin to Phenoloxidase by Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides
2001 J Biol Chem (276) pp 27166-27170
67. Trenczek T
Immunität bei Insekten?
1992 Biologie in unserer Zeit (4) pp 212-217
68. Lai-Fook J
The Repair of Wounds in the Integument of Insects
1966 J Insect Physiol (12) pp 195-226
69. Sugumaran M
Role of Insect Cuticle in Immunity
in Söderhäll K, Iwanaga S, Vastha G
New Directions in Invertebrate Immunity
1996 SOS Publications Fair Haven
70. Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M
Crystallographic Evidence that the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase is Flexible During Catalysis
2006 J Biol Chem (281) pp 8981-8990
71. Hazes B, Magnus K, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk K, Hol W
Crystal Structure of Deoxygenated *Limulus polyphemus* Subunit II Hemocyanin at 2.18 Å Resolution: Clues for a Mechanism for Allosteric Regulation
1993 Protein Sci (2) pp 597-619

-
72. Hazes B, Magnus K, Kalk K, Bonaventura C, Hol W
Nitrate Binding to *Limulus polyphemus* Subunit Type II Hemocyanin and its Functional Implications
1996 J Mol Biol (262) pp 532-541
73. Klabunde T, Eicken C, Sacchettini J, Krebs B
Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center
1998 Nat Struct Biol (5) pp 1084-1090
74. Durstewitz G, Terwilliger N
cDNA Cloning of a Developmentally Regulated Hemocyanin Subunit in the Crustacean *Cancer magister* and Phylogenetic Analysis of the Hemocyanin Gene Family
1997 Mol Biol Evol (14) pp 266-276
75. Jaenicke E, Decker H
Tyrosinases from Crustaceans form Hexamers
2003 Biochem J (371) pp 515-523
76. van Gelder C, Flurkey W, Wichers H
Sequence and Structural Features of Plant and Fungal Tyrosinases
1997 Phytochemistry (45) pp 1309-1323
77. Burmester T, Scheller K
Common Origin of Arthropod Tyrosinase, Arthropod Hemocyanin, Insect Hexamerin, and Dipteran Arylphorin Receptor
1996 J Mol Evol (42) pp 713-728
78. Chase M, Raina K, Bruno J, Sugumaran M
Purification, Characterization and Molecular Cloning of Prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*
2000 Insect Biochem Mol Biol (30) pp 953-967
79. Aspán A, Söderhäll K
Purification of Prophenoloxidase from Crayfish Blood Cells, and its Activation by an Endogenous Serine Proteinase
1991 Insect Biochem (21) pp 363-373
80. Fujimoto K, Masuda K, Asada N, Ohnishi E
Purification and Characterization of Prophenoloxidases from Pupae of *Drosophila melanogaster*
1993 J Biochem (Tokyo) (113) pp 285-291
81. Hara T, Miyoshi T, Tsukamoto T
Comparative Studies of Larval and Pupal Phenoloxidase of the Housefly, *Musca domestica* L
1993 Comp Biochem Physiol B (106) pp 287-292
82. Hall M, Scott T, Sugumaran M, Söderhäll K, Law J
Proenzyme of *Manduca sexta* Phenol Oxidase: Purification, Activation, Substrate Specificity of the Active Enzyme, and Molecular Cloning
1995 Proc Natl Acad Sci USA (92) pp 7764-7768
83. Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, Matsuura S, Ashida M
Molecular Cloning of Insect Pro-Phenol Oxidase: A Copper-Containing Protein Homologous to Arthropod Hemocyanin
1995 Proc Natl Acad Sci USA (92) pp 7774-7778

84. Sritunyalucksana K, Söderhäll K
The proPO and Clotting System in Crustaceans
2000 Aquaculture (191) pp 53-69
85. Volbeda A, Feiters M, Vincent M, Bouwman E, Dobson B, Kalk K, Reedijk J, Hol W
Spectroscopic Investigations of *Panulirus interruptus* Hemocyanin in the Crystalline State
1989 Eur J Biochem (181) pp 669-673
86. Decker H, Tuczek F
Tyrosinase / Catecholoxidase Activity of Hemocyanins: Structural Basis and Molecular Mechanism
2000 Trends Biochem Sci (25) pp 392-397
87. Decker H, Dillinger R, Tuczek F
How does Tyrosinase work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology
2000 Angew Chem Int Ed (39) pp 1591-1595
88. Solomon E, Sundaram U, Machonkin T
Multicopper Oxidases and Oxygenases
1996 Chem Rev (96) pp 2563-2606
89. Cabanes J, Garcia-Canovas F, Lozano J, Garcia-Carmona F
A Kinetic Study of the Melanization Pathway Between L-Tyrosine and Dopachrome
1987 Biochim Biophys Acta (923) pp 187-195
90. Lerch K
Copper Monooxygenases: Tyrosinase and Dopamine-Monooxygenase
in Siegel H
Metal Ions in Biological Systems
1981 Marcel Dekker New York
91. Rodriguez-Lopez J, Fenoll L, Penalver M, Garcia-Ruiz P, Varon R, Martinez-Ortiz F, Garcia-Canovas F, Tudela J
Tyrosinase Action on Monophenols: Evidence for Direct Enzymatic Release of o-Diphenol
2001 Biochim Biophys Acta (1548) pp 238-256
92. Eicken C, Zippel F, Buldt-Karentzopoulos K, Krebs B
Biochemical and Spectroscopic Characterization of Catechol Oxidase from Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a Type-3 Dicopper Center
1998 FEBS Lett (436) pp 293-299
93. Jolley R, Jr., Evans L, Makino N, Mason H
Oxytyrosinase
1974 J Biol Chem (249) pp 335-345
94. Wilcox D, Porras A, Hwang Y, Lerch K, Winkler M, Solomon E
Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase
1985 J Am Chem Soc (107) pp 4015-4027
95. Himmelwright R, Eickman N, LuBien C, Lerch K, Solomon E
Chemical and Spectroscopic Studies of the Binuclear Copper Active Site of *Neurospora* Tyrosinase: Comparison to Hemocyanins
1980 J Am Chem Soc (102) pp 7339-7344

-
96. Söderhäll K, Cerenius L
Role of the Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrate Immunity
1998 Curr Opin Immunol (10) pp 23-28
97. Aspán A, Huang T, Cerenius L, Söderhäll K
cDNA Cloning of Prophenoloxidase from the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*
and its Activation
1995 Proc Natl Acad Sci USA (92) pp 939-943
98. Chosa N, Fukumitsu T, Fujimoto K, Ohnishi E
Activation of Prophenoloxidase A1 by an Activating Enzyme in *Drosophila melanogaster*
1997 Insect Biochem Mol Biol (27) pp 61-68
99. Ashida M
Purification and Characterization of Prophenoloxidase from Hemolymph of the Silkworm
Bombyx mori
1971 Arch Biochem Biophys (144) pp 749-762
100. Aspán A, Sturtevant J, Smith V, Söderhäll K
Purification and Characterization of a Prophenoloxidase Activating Enzyme from Crayfish
Blood Cells
1990 Insect Biochem (20) pp 709-718
101. Ashida M, Dohke K
Activation of Pro-Phenoloxidase by the Activating Enzyme of the Silkworm, *Bombyx mori*
1980 Insect Biochem (10) pp 37-47
102. Simonet G, Claeys I, Broeck J
Structural and Functional Properties of a Novel Serine Protease Inhibiting Peptide Family in
Arthropods
2002 Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol (132) pp 247-255
103. Gillespie J, Kanost M, Trenczek T
Biological Mediators of Insect Immunity
1997 Annu Rev Entomol (42) pp 611-643
104. Ashida M, Brey P
Role of the Integument in Insect Defense: Pro-Phenol Oxidase Cascade in the Cuticular Matrix
1995 Proc Natl Acad Sci USA (92) pp 10698-10702
105. Söderhäll K, Aspán A, Duvic B
The proPO-System and Associated Proteins; Role in Cellular Communication in Arthropods
1990 Res Immunol (141) pp 896-907
106. Decker H, Rimke T
Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity
1998 J Biol Chem (273) pp 25889-25892
107. Nagai T, Kawabata S
A Link between Blood Coagulation and Phenol Oxidase Activation in Arthropod Host Defense
2000 J Biol Chem (275) pp 29264-29267
108. Lorenzini D, Silva P, Jr, Soares M, Arruda P, Setubal J, Daffre S
Discovery of Immune-Related Genes Expressed in Hemocytes of the Tarantula Spider
Acanthoscurria gomesiana
2006 Dev Comp Immunol (30) pp 545-556

109. Siddiqui N, Preaux G, Gielens C
Intrinsic and Induced o-Diphenoloxidase Activity of beta-Hemocyanin of *Helix pomatia*
2004 Micron (35) pp 91-92
110. Siddiqui N, Akosung R, Gielens C
Location of Intrinsic and Inducible Phenoloxidase Activity in Molluscan Hemocyanin
2006 Biochem Biophys Res Commun (348) pp 1138-1144
111. Salvato B, Santamaria M, Beltramini M, Alzuet G, Casella L
The Enzymatic Properties of *Octopus vulgaris* Hemocyanin: o-Diphenol Oxidase Activity
1998 Biochemistry (37) pp 14065-14077
112. Zlateva T, Di Muro P, Salvato B, Beltramini M
The o-Diphenol Oxidase Activity of Arthropod Hemocyanin
1996 FEBS Lett (384) pp 251-254
113. Adachi K, Hirata T, Nishioka T, Sakaguchi M
Hemocyte Components in Crustaceans Convert Hemocyanin into a Phenoloxidase-like Enzyme
2003 Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol (134) pp 135-141
114. Jaenicke E
Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen
2002 Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität; Mainz
115. Nellaiappan K, Sugumaran M
On the Presence of Phenoloxidase in the Hemolymph of the Horseshoe Crab, *Limulus*
1996 Comp Biochem Physiol (113 B) pp 163-169
116. Iwanaga S, Kawabata S, Muta T
New Types of Clotting Factors and Defense Molecules found in Horseshoe Crab Hemolymph: Their Structures and Functions
1998 J Biochem (Tokyo) (123) pp 1-15
117. Sugumaran M, Nellaiappan K
Lysolecithin - A Potent Activator of Prophenoloxidase from the Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*
1991 Biochem Biophys Res Commun (176) pp 1371-1376
118. Hughes A
Evolution of the Arthropod Prophenoloxidase / Hexamerin Protein Family
1999 Immunogenetics (49) pp 106-114
119. Iwanaga S, Kawabata S
Evolution and Phylogeny of Defense Molecules Associated with Innate Immunity in Horseshoe Crab
1998 Front Biosci (3) pp 973-984
120. Iwanaga S
The Molecular Basis of Innate Immunity in the Horseshoe Crab
2002 Curr Opin Immunol (14) pp 87-95
121. Medzhitov R, Janeway C, Jr.
Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways
2000 Immunol Rev (173) pp 89-97

-
122. Schmidt O, Theopold U, Strand M
Innate Immunity and its Evasion and Suppression by Hymenopteran Endoparasitoids
2001 Bioessays (23) pp 344-351
123. Scholz F, Beetz S, Lesch C, Holthusen T, Trenczek T
Wie wehren sich Insekten gegen Krankheitserreger?
1999 Spiegel der Forschung (16) pp 46-54
124. Kawabata S, Nagayama R, Hirata M, Shigenaga T, Agarwala KL, Saito T, Cho J, Na-kajima H, Takagi T, Iwanaga S
Tachycitin, a Small Granular Component in Horseshoe Crab Hemocytes, is an Antimicrobial Protein with Chitin-Binding Activity
1996 J Biochem (Tokyo) (120) pp 1253-1260
125. Beisel HG, Kawabata S, Iwanaga S, Huber R, Bode W
Tachylectin-2: Crystal Structure of a Specific GlcNAc / GalNAc-binding Lectin Involved in the Innate Immunity Host Defense of the Japanese Horseshoe Crab *Tachypleus tridentatus*
1999 Embo J (18) pp 2313-2322
126. Faye I, Wyatt G
The Synthesis of Antibacterial Proteins in Isolated Fat Body from *Cecropia* Silkworm Pupae
1980 Experientia (36) pp 1325-1326
127. Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y
Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and Chemical Structure
1988 J Biol Chem (263) pp 16709-16713
128. Bachère E, Destoumieux D, Bulet P
Penaeidins, Antimicrobial Peptides of Shrimp: A Comparison with other Effectors of Innate Immunity
2000 Aquaculture (191) pp 71-88
129. Boman H
Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review
1998 Scand J Immunol (48) pp 15-25
130. Matsuzaki K
Why and How are Peptide-Lipid Interactions utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes
1999 Biochim Biophys Acta (1462) pp 1-10
131. Oren Z, Shai Y
Mode of Action of Linear Amphipathic alpha-helical Antimicrobial Peptides
1998 Biopolymers (47) pp 451-463
132. Yeaman M, Yount N
Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance
2003 Pharmacol Rev (55) pp 27-55
133. Hancock R, Chapple D
Peptide Antibiotics
1999 Antimicrob Agents Chemother (43) pp 1317-1323

134. Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachère E
Crustacean Immunity. Antifungal Peptides are Generated from the C-terminus of Shrimp Hemocyanin in Response to Microbial Challenge
2001 J Biol Chem (276) pp 47070-47077
135. Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, Yoshikawa K, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y
Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II, and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity
1989 J Biochem (Tokyo) (106) pp 663-668
136. Kawano K, Yoneya T, Miyata T, Yoshikawa K, Tokunaga F, Terada Y, Iwanaga S
Antimicrobial Peptide, Tachyplesin I, Isolated from Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*). NMR Determination of the beta-Sheet Structure
1990 J Biol Chem (265) pp 15365-15367
137. Nakamura T, Morita T, Iwanaga S
Lipopolysaccharide-Sensitive Serine-Protease Zymogen (Factor C) found in *Limulus* Hemocytes. Isolation and Characterization
1986 Eur J Biochem (154) pp 511-521
138. Liang S, Sakmar T, Liu T
Studies on *Limulus* Amoebocyte Lysate. III. Purification of an Endotoxin-binding Protein from *Limulus* Amoebocyte Membranes
1980 J Biol Chem (255) pp 5586-5590
139. Nakamura T, Horiuchi T, Morita T, Iwanaga S
Purification and Properties of Intracellular Clotting Factor, Factor B, from Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*) Hemocytes
1986 J Biochem (Tokyo) (99) pp 847-857
140. Muta T, Seki N, Takaki Y, Hashimoto R, Oda T, Iwanaga A, Tokunaga F, Iwanaga S
Purified Horseshoe Crab Factor G. Reconstitution and Characterization of the (1→3)-beta-D-Glucan-sensitive Serine Protease Cascade
1995 J Biol Chem (270) pp 892-897
141. Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S
A New (1→3)-beta-D-Glucan-Mediated Coagulation Pathway Found in *Limulus* Amoebocytes
1981 FEBS Letters (129) pp 318-321
142. Muta T, Iwanaga S
Clotting and Immune Defense in Limulidae
1996 Prog Mol Subcell Biol (15) pp 154-189
143. Nakamura T, Morita T, Iwanaga S
Intracellular Proclotting Enzyme in *Limulus* (*Tachypleus tridentatus*) Hemocytes: Its Purification and Properties
1985 J Biochem (Tokyo) (97) pp 1561-1574
144. Muta T, Hashimoto R, Miyata T, Nishimura H, Toh Y, Iwanaga S
Proclotting Enzyme from Horseshoe Crab Hemocytes. cDNA Cloning, Disulfide Locations, and Subcellular Localization
1990 J Biol Chem (265) pp 22426-22433
145. Ratcliffe N, Leonard C, Rowley A
Prophenoloxidase Activation: Nonself Recognition and Cell Cooperation in Insect Immunity
1984 Science (226) pp 557-559

-
146. Hoffmann J
Innate immunity of Insects
1995 Curr Opin Immunol (7) pp 4-10
147. Söderhäll K, Levin J, Armstrong P
The Effects of beta-1,3-Glucans on Blood Coagulation and Amebocyte Release in the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*
1985 Biol Bull (169) pp 661-674
148. Söderhäll K
Prophenoloxidase Activating System and Melanization - A Recognition Mechanism of Arthropods? A Review
1982 Dev Comp Immunol (6) pp 601-611
149. Nappi A, Sugumaran M
Some Biochemical Aspects of Eumelanin in Insect Immunity
in Pathak J
Insect Immunity
1993 Oxford and IBH Publishing New Delhi
150. Nillius D
Zum Immunsystem der Cheliceraten *Eurypelma californicum* und *Pandinus imperator*
2002 Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität; Mainz
151. van Holde K, Weischet W
Boundary Analysis of Sedimentation Velocity Experiments with Monodisperse and Paucidisperse Solutes
1978 Biopolymers (17) pp 1387-1403
152. Demeler B, Saber H
Determination of Molecular Parameters by Fitting Sedimentation Data to Finite-Element solutions of the Lamm Equation
1998 Biophys J (74) pp 444-454
153. Demeler B, Saber H, Hansen J
Identification and Interpretation of Complexity in Sedimentation Velocity Boundaries
1997 Biophys J (72) pp 397-407
154. Loewe R, Linzen B
Haemocyanins in Spiders, I. Subunits and Stability Region of *Dugesia californica* Haemocyanin
1973 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (354) pp 182-188
155. Holtzhauer M
Elektrophoretische Techniken
in Holtzhauer MH
Methoden in der Proteinanalytik
1996 Springer Verlag
156. Berkelman T, Stenstedt T
2-D Elektrophoresis. Using Immobilized pH Gradients. Principles and Methods
1998 Amersham Pharmacia Biotech
157. Laemmli U
Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4
1970 Nature (227) pp 680-685

158. See Y, Jackowski G
Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Electrophoresis
in Creighton T
Protein Structure - A Practical Approach
1995 Oxford University Press New York
159. Hames B
in Hames B, Rickwood D
Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach
1981 IRL Press Ltd. Oxford
160. Weeke B
Crossed Immunoelectrophoresis
1973 Scand J Immunol Suppl (1) pp 47-56
161. Blum H, Beier H, Gross H
Improved Silverstaining of Plant Proteins, RNA, and DNA
1987 Electrophoresis (8) pp 93-99
162. Herlinger E, Jameson R, Linert W
Spontaneous Autoxidation of Dopamine
1995 J Chem Soc Perkin Trans (2) pp 259-263
163. Winder A, Harris H
New Assays for the Tyrosine Hydroxylase and Dopa Oxidase Activities of Tyrosinase
1991 Eur J Biochem (198) pp 317-326
164. Winder A
A Stopped Spectrophotometric Assay for the Dopa Oxidase Activity of Tyrosinase
1994 J Biochem Biophys Methods (28) pp 173-183
165. Nellaiappan K, Vinayakam A
A Method for Demonstrating Prophenoloxidase after Electrophoresis
1993 Biotechnic and Histochemistry (68) pp 193-195
166. Jaenicke E, persönliche Mitteilung; 2006
167. Mason H
The Chemistry of Melanin III. Mechanism of the Oxidation of Dihydroxyphenylalanine by Tyrosinase
1948 J Biol Chem (172) pp
168. Burzio L, Waite J
Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides
2000 Biochemistry (39) pp 11147-11153
169. Waite J
Calculating Extinction Coefficients for Enzymatically Produced o-Quinones
1976 Anal Biochem (75) pp 211-218
170. Burzio L, Waite J
Reactivity of Peptidyl-Tyrosine to Hydroxylation and Cross-Linking
2001 Protein Sci (10) pp 735-740

-
171. Stewart J
Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate
1980 Anal Biochem (104) pp 10-14
172. Zuidam N, de Vreeh R, Crommelin D
Characterization of Liposomes
in Torchilin V, Weissig V
Liposomes. Practical Approach
2002 Oxford, University Press Oxford
173. Schmidt W
Optische Spektroskopie
2000 Wiley-VCH
174. Wedde M, Griesch J, Fröbisch A, Podsiadlowski L
A Microtiterplate Azocoll Assay for Measurement of Proteases and Protease Inhibitors
Involved in Insect-Pathogen-Interactions
in Techniques in Insect Immunology
175. Dutkiewicz E, Jakubowska A
Effect of Elektrolytes on the Physicochemical Behaviour of Sodium Dodecyl Sulphate Micelles
2002 Colloid Polym Sci (280) pp 1009-1014
176. Lamy J, Bijlholt M, Sizaret P, Lamy J, van Bruggen E
Quaternary Structure of Scorpion (*Androctonus australis*) Hemocyanin. Localization of
Subunits with Immunological Methods and Electron Microscopy
1981 Biochemistry (20) pp 1849-1856
177. Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B
Subunit Heterogeneity in Arthropod Hemocyanins: I. Chelicerata
1979 J Comp Physiol [b] (130) pp 283-292
178. Stratakis E, Linzen B
Carbonate Dehydratase (Carbonic Anhydrase) in a Spider. Association with the Hemolymph
Lipoprotein
1984 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (365) pp 1187-1197
179. Lenhartz E
Einführung in die Chemische Physiologie
1959 Springer Verlag Berlin
180. Decker H
Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma
californicum*
1981 Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität; München
181. Heimerl R
Physikochemische und immunologische Charakterisierung des Hämocyanins des Kai-
serskorpions *Pandinus imperator*
1989 Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität; München
182. Waschbüsch D
Charakterisierung von Hämocyaninen und Untersuchung der Proteinstabilität des
Hämocyanins des Kaiserskorpions *Pandinus imperator* mit hydrodynamischen
Methoden
2004 Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität; Mainz

183. Lawrence R
Fluorescence in Arthropoda
1954 J Ent Soc South Africa (17) pp 167-170
184. Pavan M, Vachon M
Existence of a Fluorescent Substance in the Skin of Scorpions (Arachnida)
1954 C R Hebd Seances Acad Sci (239) pp 1700-1702
185. Stahnke H
UV-Light, a Useful Field Tool
1972 BioScience (22) pp 604-607
186. Hübler R, Fertl B, Hellmann N, Decker H
On the Stability of the 24-meric Hemocyanin from *Eurypelma californicum*
1998 Biochim Biophys Acta (1383) pp 327-339
187. Heintze U
Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung des *Pandinus imperator*-Hämocyanins
1991 Diplomarbeit; Ludwig-Maximilians-Universität; München
188. van Bruggen F, Bijlholt M, Schutter W, Wichertjes T, Bonaventura J, Bonaventura C, Lamy J, Lamy J, Leclerc M, Schneider H, Markl J, Linzen B
The Role of Structurally Diverse Subunits in the Assembly of Three Cheliceratan Hemocyanins
1980 FEBS Lett (116) pp 207-210
189. Jeffrey P, Shaw D, Treacy G
Hemocyanin from the Australian Freshwater Crayfish *Cherax destructor*. Characterization of a Dimeric Subunit and its Involvement in the Formation of the 25 S Component
1978 Biochemistry (17) pp 3078-3084
190. Loewe R
Hemocyanins in Spiders, V. Fluorimetric Recording of Oxygen Binding Curves, and its Application to the Analysis of Allosteric Interactions in *Eurypelma californicum* Hemocyanin
1978 J Comp Physiol B (128) pp 161-168
191. Boteva R, Ricchelli F, Sartor G, Decker H
Fluorescence Properties of Hemocyanin from Tarantula (*Eurypelma californicum*): A Comparison between the whole Molecule and Isolated Subunits
1993 J Photochem Photobiol B Biol (17) pp 145-153
192. Brenowitz M, Bonaventura C, Bonaventura J, Gianazza E
Subunit Composition of High Molecular Weight Oligomer: *Limulus polyphemus* Hemocyanin
1981 Arch Biochem Biophys (210) pp 748-761
193. Lamy J, Lamy J, Weill J, Bonaventura J, Bonaventura C, Brenowitz M
Immunological Correlates between the Multiple Hemocyanin Subunits of *Limulus polyphemus* and *Tachypleus tridentatus*
1979 Arch Biochem Biophys (196) pp 324-339
194. Sterner R
Allosterie bei Arthropoden-Hämocyaninen: Analyse der Bindung von Sauerstoff und Protonen sowie Nachweis von Konformationsübergängen
1991 Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität; München

-
195. Baviere M, Bazin B, Aude R
Calcium Effects on the Solubility of Sodium Dodecyl Sulfate in Sodium Chloride Solutions
1983 Journal of Colloid and Interface Science (92) pp 580-583
196. Sterner R, Vogl T, Hinz H, Penz F, Hoff R, Föll R, Decker H
Extreme Thermostability of Tarantula Hemocyanin
1995 FEBS Lett (364) pp 9-12
197. Nozaki Y, Tanford C
The Solubility of Amino Acids, Diglycine, and Triglycine in Aqueous Guanidine Hydrochloride Solutions
1970 J Biol Chem (245) pp 1648-1652
198. Morioka C, Tachi Y, Suzuki S, Itoh S
Significant Enhancement of Monooxygenase Activity of Oxygen Carrier Protein Hemocyanin by Urea
2006 J Am Chem Soc (128) pp 6788-6789
199. Jaenicke E, Decker H
Functional Changes in the Family of Type 3 Copper Proteins during Evolution
2004 Chembiochem (5) pp 163-169
200. Jiang H, Wang Y, Yu X, Kanost M
Prophenoloxidase-Activating Proteinase-2 from Hemolymph of *Manduca sexta*. A Bacteria-Inducible Serine Proteinase Containing two Clip Domains
2003 J Biol Chem (278) pp 3552-3561
201. Ashida M, Söderhäll K
The Prophenoloxidase Activating System in Crayfish
1984 J Comp Physiol (77 B) pp 21-26
202. Smith V, Söderhäll K
A Comparison of Phenoloxidase Activity in the Blood of Marine Invertebrates
1991 Dev Comp Immunol (15) pp 251-261
203. Lopez-Serrano D, Sanchez-Amat A, Solano F
Cloning and Molecular Characterization of a SDS-Activated Tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*
2002 Pigment Cell Res (15) pp 104-111
204. Swain T, Mapson L, Robb D
Activation of *Vicia faba* (L.) Tyrosinase as effected by Denaturing Agents
1966 Phytochemistry (5) pp 469-482
205. Kenten R
Latent Phenolase in Extracts of Broad Bean (*Vicia faba* L.) Leaves. 2. Activation by Anionic Wetting
1958 Biochem J (68) pp 244-251
206. Flurkey WH
Polyphenol Oxidase in Higher Plants. Immunological Detection and Analysis of in vitro Translation Products
1986 Plant Physiol (81) pp 614-618

207. Kanade S, Paul B, Rao A, Gowda L
The Conformational State of Polyphenol Oxidase from Field Bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and Acid-pH Activation
2006 Biochem J (395) pp 551-562
208. Tian S, Wan Y, Qin G, Xu Y
Induction of Defense Responses Against *Alternaria* Rot by Different Elicitors in Harvested Pear Fruit
2006 Appl Microbiol Biotechnol (70) pp 729-734
209. Golbeck J, Cammarata K
Spinach Thylakoid Polyphenol Oxidase. Isolation, Activation, and Properties of the Native Chloroplast Enzyme
1981 Plant Physiol. (67) pp 977-984
210. Kenten R
Latent Phenolase in Extracts of Broad Bean (*Vicia faba* L.) Leaves. 1. Activation of Acid and Alkali
1957 Biochem J (67) pp 300-307
211. Robb D, Mapson L, Swain T
Activation of the Latent Tyrosinase of Broad Bean
1964 Nature (201) pp
212. King R, Flurkey W
Effects of Limited Proteolysis on Broad Bean Polyphenol Oxidase
1987 J Sci Food Agric (41) pp 231-240
213. Hutcheson S, Buchanan B, Montalbini P
Polyphenol Oxidation by *Vicia faba* Chloroplast Membranes. Studies on the latent Membrane-bound Polyphenol Oxidase and on the Mechanism of Photochemical Polyphenol Oxidase
1980 Plant Physiol. (66) pp 1150-1154
214. Asada N, Fukumitsu T, Fujimoto K, Masuda K
Activation of Prophenoloxidase with 2-Propanol and Other Organic Compounds in *Drosophila melanogaster*
1993 Insect Biochem Mol Biol (23) pp 515-520
215. Sugumaran M, Nellaiappan K
On the Latency and Nature of Phenoloxidase present in the left Colleterial Gland of the Cockroach *Periplaneta americana*
1990 Arch Insect Biochem Physiol (15) pp 165-181
216. Büchler K
Kristallisation der Funktionellen Untereinheit h des Keyhole Limpit Hämocyanins zur Röntgenstrukturbestimmung
2007 Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität; Mainz
217. Jaenicke E, Decker H
Conversion of Crustacean Hemocyanin to Catecholoxidase
2004 Micron (35) pp 89-90
218. Pless D, Aguilar M, Falcón A, Álvarez E, Heimer de la Cotera E
Latent Phenoloxidase Activity and N-Terminal Amino Acid Sequence of Hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a Primitive Crustacean
2003 Arch Biochem Biophys (409) pp 402-410

-
219. Bhagvat K, Richter D
Animal Phenolase and Adrenaline
1938 Biochem J (32) pp 1397-1406
220. Adachi K, Hirata T, Nagai K, Sakaguchi M
Hemocyanin a Most Likely Inductor of Black Spots in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*
During Storage
2001 Journal of Food Science (66) pp 1130-1136
221. Adachi K, Hirata M, Fujio A, Nishioka T, Sakaguchi M
A 160-kDa Protein is essential for Hemocyanin-derived Melanosis of Prawn
2003 Journal of Food Science (68) pp 765-769
222. Moore B, Flurkey W
Sodium Dodecyl Sulfate Activation of a Plant Polyphenoloxidase. Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on Enzymatic and Physical Characteristics of Purified Broad Bean Polyphenoloxidase
1990 J Biol Chem (265) pp 4982-4988
223. Wittenberg C, Triplett E
A Detergent-Activated Tyrosinase from *Xenopus laevis*. II. Detergent Activation and Binding
1985 J Biol Chem (260) pp 12542-12546
224. Salvato B, Jori G, Piazzese A, Ghiretti F, Beltramini M, Lerch K
Enzymatic Activities of Type 3 Copper Pair in *Octopus vulgaris* Haemocyanin
1983 Life Chem Rep (Suppl 1) pp 313-317
225. Nakahara A, Suzuki S, Kino J
Tyrosinase Activity of Squid Hemocyanin
1983 Life Sci Rep (Suppl 1) pp 319-322
226. Rimke T, Decker H
The Respiratory Protein Hemocyanin of Tarantula shows Phenoloxidase / Tyrosinase Activity
1997 Verh Dtsch Zool Ges (90) pp 66
227. Decker H, Jaenicke E
Recent Findings on Phenoloxidase Activity and Antimicrobial Activity of Hemocyanins
2004 Dev Comp Immunol (28) pp 673-687
228. Sterner R, Bardehle K, Paul R, Decker H
Tris: An Allosteric Effector of Tarantula Haemocyanin
1994 FEBS Lett (339) pp 37-39
229. Arisaka F, van Holde K
Allosteric Properties and the Association Equilibria of Hemocyanin from *Callinassa californiensis*
1979 J Mol Biol (134) pp 41-73
230. Rodriguez-Lopez J, Fenoll L, Garcia-Ruiz P, Varon R, Tudela J, Thorneley R, Garcia-Canovas F
Stopped-flow and Steady-state Study of the Diphenolase Activity of Mushroom Tyrosinase
2000 Biochemistry (39) pp 10497-10506
231. Salzbrunn U, persönliche Mitteilung; 2006

232. Pomerantz S, Warner M
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin as the Tyrosinase Cofactor
1967 J Biol Chem (242) pp 5308-5314
233. Terwilliger N, Ryan M
Functional and Phylogenetic Analyses of Phenoloxidasen from Brachyuran (*Cancer magister*)
and Branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) Crustaceans
2006 Biol Bull (210) pp 38-50
234. Naraoka T, Uchisawa H, Mori H, Matsue H, Chiba S, Kimura A
Purification, Characterization and Molecular Cloning of Tyrosinase from the Cephalopod
Mollusk, *Illex argentinus*
2003 Eur J Biochem (270) pp 4026-4038
235. Götz P
Immunreaktionen bei Wirbellosen, insbesondere Insekten
1988 Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (81) pp 113-129
236. Hoffmann J, Reichhart J
Drosophila Immunity
1997 Trends Cell Biol (7) pp 309-316
237. Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O
The Coagulation of Insect Hemolymph
2002 Cell Mol Life Sci (59) pp 363-372
238. Bulet P, Stocklin R, Menin L
Anti-Microbial Peptides: From Invertebrates to Vertebrates
2004 Immunol Rev (198) pp 169-184
239. Pye A
Microbial Activation of Prophenoloxidase from Immune Insect Larvae
1974 Nature (251) pp 610-613
240. Brehélin M
Immunity in Invertebrates
1986 Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
241. Kuhn K, Haug T
Ultrastructural, Cytochemical, and Immunocytochemical Characterization of Haemocytes of
the Hard Tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata)
1994 Cell Tissue Res (277) pp 493-504
242. Zanger K
Immunocytochemical Localisation of Lysozyme in the Nephrocytes of the Harvestman,
Leiobunum rotundum
1995 Tissue and Cell (27) pp 299-308
243. van der Geest L, Elliot S, Breeuwer J, Beerling E
Diseases of Mites
2000 Experimental and Applied Acarology (24) pp 497-560
244. Schwägerl S
Cytochemische und elektrophoretische Charakterisierung von Hämocyten und Hämolymp-
Proteinen der Schildzecke *Ixodes ricinus* L.
1991 Diplomarbeit; Universität Regensburg

-
245. Fleming A
On a Remarkable Bacteriolytic Element found in Tissues and Secretions
1922 Proc Roy Soc Ser B 306-317
246. Mohrig W, Messner B
Immunreaktion bei Insekten I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten
1968 Biol Zentralbl (87) pp 439-470
247. Jollès P
Neuere Untersuchungen an Lysozymen
1964 Angew Chem (76) pp 20-28
248. Pooart J, Torikata T, Araki T
The Primary Structure of a Novel *goose*-type Lysozyme from *Rhea* Egg White
2004 Biosci Biotechnol Biochem (68) pp 159-169
249. Thammasirirak S, Torikata T, Takami K, Murata K, Araki T
The Primary Structure of Cassowary (*Casuarius casuarius*) *goose* Type Lysozyme
2002 Biosci Biotechnol Biochem (66) pp 147-156
250. Weaver L, Grütter M, Remington S, Gray T, Isaacs N, Matthews B
Comparison of *goose*-Type, *chicken*-Type, and *phage*-Type Lysozymes illustrates the Changes that occur in both Amino Acid Sequences and Three-Dimensional Structure during Evolution
1985 J Mol Evol (21) pp 97-111
251. Jollès P, Jollès J
What's new in Lysozyme Research? Always a Model System, Today as Yesterday
1984 Mol Cell Biochem (63) pp 165-189
252. Boman H, Hultmark D
Cell-Free Immunity in Insects
1987 Annu Rev Microbiol (41) pp 103-126
253. Lee W, Brey P
Isolation and Characterization of the Lysozyme-encoding Gene from the Silkworm *Bombyx mori*
1995 Gene (161) pp 199-203
254. Grunclova L, Fouquier H, Hypsa V, Kopacek P
Lysozyme from the Gut of the Soft Tick *Ornithodoros moubata*: the Sequence, Phylogeny and post-Feeding Regulation
2003 Dev Comp Immunol (27) pp 651-660
255. Jollès J, Jollès P
The Lysozyme from *Asterias rubens*
1975 Eur J Biochem (54) pp 19-23
256. Jaenicke R, Rudolph R
Folding Proteins
in Creighton T
Protein Structure - A Practical Approach
1995 Oxford University Press New York

257. Richmond M
Formation of a Lytic Enzyme by a Strain of *Bacillus subtilis*
1959 Biochim Biophys Acta (33) pp 78-92
258. Kamei K, Hara S, Ikenaka T, Murao S
Amino Acid Sequence of a Lysozyme (B-enzyme) from *Bacillus subtilis* YT-25
1988 J Biochem (Tokyo) (104) pp 832-836
259. Smith E, Kimmel J, Brown D, Thompson E
Isolation and Properties of a Crystalline Mercury Derivative of a Lysozyme from *Papaya* Latex
1955 J Biol Chem (215) pp 67-89
260. Meyer K, Hahnel E, Steinberg A
Lysozyme of Plant Origin
1946 J Biol Chem (163) pp 733-740
261. Bachali S, Bailly X, Jollès J, Jollès P, Deutsch J
The Lysozyme of the Starfish *Asterias rubens*. A Paradigmatic Type *i* Lysozyme
2004 Eur J Biochem (271) pp 237-242
262. Takeshita K, Hashimoto Y, Thujihata Y, So T, Ueda T, Iomoto T
Determination of the Complete cDNA Sequence, Construction of Expression Systems, and Elucidation of fibrinolytic Activity for *Tapes japonica* Lysozyme
2004 Protein Expr Purif (36) pp 254-262
263. Xue Q, Schey K, Volety A, Chu F, La Peyre J
Purification and Characterization of Lysozyme from Plasma of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*)
2004 Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol (139) pp 11-25
264. Xylander W, Nevermann L
Antibacterial Activity in the Hemolymph of Myriapods (Arthropoda)
1990 J Invertebr Pathol (56) pp 206-214
265. Nevermann L
Untersuchungen an Haemocyten von *Scolopendra cingulata* und *Lithobius forficatus* unter dem Aspekt zellulärer Abwehrreaktionen
1996 Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen
266. Hernandez V, Higgins L, Fallon A
Characterization and cDNA Cloning of an Immune-Induced Lysozyme from Cultured *Aedes albopictus* Mosquito Cells
2003 Dev Comp Immunol (27) pp 11-20
267. Jollès J, Schoentgen F, Croizier G, Croizier L, Jollès P
Insect Lysozymes from three Species of Lepidoptera: Their Structural Relatedness to the C (*chicken*) Type Lysozyme
1979 J Mol Evol (14) pp 267-271
268. Mulnix A, Dunn P
Structure and Induction of a Lysozyme Gene from the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*
1994 Insect Biochem Mol Biol (24) pp 271-281
269. Zachary D, Hoffmann D
Lysozyme is Stored in the Granules of Certain Haemocyte Types in *Locusta*
1984 J Insect Physiol (30) pp 405-411

-
270. Fenouil E, Roch P
Evidence and Characterization of Lysozyme in six Species of Freshwater Crayfishes from Astacidae and Cambaridae Families
1991 Comp Biochem Physiol B (99) pp 43-49
271. Simser J, Macaluso K, Mulenga A, Azad A
Immune-Responsive Lysozymes from Hemocytes of the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* and an Embryonic Cell Line of the Rocky Mountain Wood Tick, *D. andersoni*
2004 Insect Biochem Mol Biol (34) pp 1235-1246
272. Falbe J, Regitz M
Römpf Chemie Lexikon (Band 1)
1989 Georg Thieme Verlag Stuttgart
273. Suhr-Jessen P, Baek L, Jakobsen P
Microscopical, Biochemical, and Immunological Studies of the Immune Defence System of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*
1989 Biol Bull (176) pp 290-300
274. Starnes R, Liu C, Marrone P
History, Use, and Future of Microbial Insecticides
1993 Amer Entomol (39) pp 83-91
275. St. Leger R, Cooper R, Charnley A
Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes
1986 J Gen Microb (132) pp 1509-1517
276. Griesch J, Vilcinskas A
Proteases Released by Entomopathogenic Fungi Impair Phagocytic Activity, Attachment and Spreading of Plasmocytes Isolated from Haemolymph of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella*
1998 Biocontrol Science and Technology (8) pp 517-531
277. Vilcinskas A, Matha V
Antimycotic Activity of Lysozyme and its Contribution to Antifungal Humoral Defence Reactions in *Galleria mellonella*
1997 Anim Biol (6) pp 19-29
278. St Leger R, Bidochka M, Roberts D
Isoforms of the Cuticle-Degrading Pr1 Proteinase and Production of a Metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*
1994 Arch Biochem Biophys (313) pp 1-7
279. Musiol E
Biologische Schädlingsbekämpfung mit Pilzen
2004 www.lehre.systbot.uni-tuebingen.de/tiki-read_article.php?articleId=9&fullview=1
280. Strych W
Proteinchemischer Vergleiche der Hämocyanin-Untereinheiten aus den Spinnen *Eurypelma californicum* und *Cupiennius salei*
1981 Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität; München

281. Markl J, Schmid R, Czichos-Tiedt S, Linzen B
Haemocyanins in Spiders, III. Chemical and Physical Properties of the Proteins in *Dugesiella* and *Cupiennius* Blood
1976 Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (357) pp 1713-1725
282. Conze W
Untersuchung zur Temperaturabhängigkeit der O₂-Bindungseigenschaft von Hämocyanin aus Arthropoden verschiedener Biotope
2005 Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität; Mainz
283. Dresco-Derouet L
L'Anhydrase Carbonique chez les Arachnides I.
1961 J Insect Physiol (6) pp 209-214
284. Maaroufi H, Lamy J
The Quarternary Sturcture of *Scorpio maurus* Hemocyanin: Comparison with *Androctonus australis* Hemocyanin
1993 Comp Biochem Physiol B (104) pp 215-227
285. Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B
Hemocyanins in Spiders, IX. Homogeneity, Subunit Composition and the Basic Oligomeric Structure of *Eurypelma californicum* Hemocyanin
1980 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (361) pp 649-660
286. Decker H, Schmid R, Markl J, Linzen B
Hemocyanins in Spiders, XII. Dissociation and Reassociation of *Eurypelma* Hemocyanin
1980 Hoppe Seylers Z Physiol Chem (361) pp 1707-1717
287. Boisset N, Radermacher M, Grassucci R, Taveau J, Liu W, Lamy J, Frank J, Lamy J
Three-Dimensional Immunoelectron Microscopy of Scorpion Hemocyanin Labeled with a Monoclonal Fab Fragment
1993 J Struct Biol (111) pp 234-244
288. van Heel M, Frank J
Use of Multivariate Statistics in Analysing the Images of Biological Macromolecules
1981 Ultramicroscopy (6) pp 187-194
289. Martin A, Depoix F, Stohr M, Meissner U, Hagner-Holler S, Hammouti K, Burmester T, Heyd J, Wriggers W, Markl J
Limulus polyphemus Hemocyanin: 10 Å Cryo-EM Structure, Sequence Analysis, Molecular Modelling and Rigid-body Fitting Reveal the Interfaces Between the Eight Hexamers
2007 J Mol Biol (366) pp 1332-1350
290. Klarman A, Shaklai N, Daniel E
Tyrosyl Fluorescence in Hemocyanin from the Scorpion *Leirus quinquestriatus*
1977 Biochim Biophys Acta (490) pp 322-330
291. Lippitz M, Erker W, Decker H, van Holde K, Basché T
Two-Photon Excitation Microscopy of Tryptophan-Containing Proteins
2002 Proc Natl Acad Sci USA (99) pp 2772-2777
292. Erker W, Lippitz M, Basché T, Decker H
Toward Oxygen Binding Curves of Single Respiratory Proteins
2004 Micron (35) pp 111-113

-
293. Erker W, Beister U, Decker H
Cooperative Transition in the Conformation of 24-mer Tarantula Hemocyanin upon Oxygen Binding
2005 J Biol Chem (280) pp 12391-12396
294. Prendini L, persönliche Mitteilung; 2005
Division of Invertebrate Zoology American Museum of Natural History Central Park West, New York.
295. Shultz J
Evolutionary Morphology and Phylogeny of Arachnida
1990 Cladistics (6) pp 1-38
296. Peters W
Integument
in Dettner K, Peters W
Lehrbuch der Entomologie
2003 Spektrum Verlag Gustav Fischer München
297. Stachel S, Stockwell S, van Vranken D
The Fluorescence of Scorpions and Cataractogenesis
1999 Chem Biol (6) pp 531-539
298. Fasel A, Muller P, Suppan P, Vauthey E
Photoluminescence of the African Scorpion "*Pandinus imperator*"
1997 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (39) pp 96-98
299. Frost L, Butler D, O'Dell B, Fet V
A Coumarin as a Fluorescent Compound in Scorpion Cuticle
in Vet A, Selden P
Scorpions 2001. In Memoriam Gary A. Polis
2001 Burnham Beeches, Bucks: British Arachnological Society
300. Wankhede R
Extraction, Isolation, Identification and Distribution of Soluble Fluorescent Compounds from the Cuticle of Scorpion (*Hadurus arizonensis*)
2004 Marshall University; Huntington, West Virginia, USA
301. O'Kennedy R, Thornes R
Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action
1997 John Wiley & Sons Chichester, UK
302. Kloock C
Aerial Insects Avoid Fluorescing Scorpions
2005 Euscorpius (21) pp 1-7
303. Heimerl R, Decker H
Monoclonal Antibodies Against the Hemocyanin of the Scorpion *Pandinus imperator*
in Preaux G, Lontie R
Invertebrate Dioxygen Carriers
1990 Leuven University Press Leuven, Belgium
304. Bayne C, Moore M, Carefoot T, Thompson R
Hemolymph Functions in *Mytilus californianus*: The Cytochemistry of Hemocytes and their Responses to Foreign Implants and Hemolymph Factors in Phagocytosis
1979 Journal of Invertebrate Pathology (34) pp 1-20

305. Hübler R. Charakterisierung und Stabilität von Arthropoden-Hämocyanin
2001 Dissertation; Johannes Gutenberg-Universität; Mainz
306. Buzy A, Gagnon J, Lamy J, Thibault P, Forest E, Hudry-Clergeon G
Complete Amino Acid Sequence of the Aa6 Subunit of the Scorpion *Androctonus australis*
Hemocyanin determined by Edman Degradation and Mass Spectrometry
1995 Eur J Biochem (233) pp 93-101
307. Lamy J, Lamy J, Sizaret P, Billiald P, Jollès P, Jollès J, Feldmann R, Bonaventura J
Quaternary Structure of *Limulus polyphemus* Hemocyanin
1983 Biochemistry (22) pp 5573-5583
308. Bonaventura J, Bonaventura C
Hemocyanins: Relationships in Their Structure, Function and Assembly
1980 Amer Zool (20) pp 7-17
309. Bijlholt M, van Bruggen E, Bonaventura J
Dissociation and Reassembly of *Limulus polyphemus* Hemocyanin
1979 Eur J Biochem (95) pp 399-405
310. Schutter W, van Bruggen E, Bonaventura J, Bonaventura C, Sullivan B
Structure, Dissociation and Reassembly of *Limulus polyphemus* Hemocyanin
in Bannister J
Structure and Function Hemocyanin
1977 Springer Berlin Heidelberg New York
311. van Heel M, Dube P
Quaternary Structure of Multihexameric Arthropod Hemocyanins
1994 Micron (25) pp 387-418
312. Klarman A, Gottlieb J, Daniel E
Quaternary Structure and Arrangement of Subunits in Hemocyanin from the Scorpion *Leirus quinquestriatus*
1979 Biochemistry (18) pp 2239-2244
313. Ballweber P, Markl J, Burmester T
Complete Hemocyanin Subunit Sequences of the Hunting Spider *Cupiennius salei*: Recent
Hemocyanin Remodeling in Entelegyne Spiders
2002 J Biol Chem (277) pp 14451-14457
314. Markl J, Kempter B
Subunit Heterogeneity in Crustacean Hemocyanins as Deduced by Two-Dimensional
Immunelectrophoresis
1981 J Comp Physiol (141) pp 495-502
315. Murray A, Jeffrey P
Hemocyanin from the Australian Freshwater Crayfish *Cherax destructor*. Subunit Heterogeneity
1974 Biochemistry (13) pp 3667-3671
316. van den Berg A, Gaastra W, Kuiper H
Heterogeneity of *Panulirus interruptus* Hemocyanin
in Bannister J
Structure and Function Hemocyanin
1977 Springer Berlin Heidelberg New York

-
317. Sugita H, Sekiguchi K
Heterogeneity of the Minimum Functional Unit of Hemocyanins from the Spider (*Argiope bruennichii*), the Scorpion (*Heterometrus sp.*), and the Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*)
1975 J Biochem (Tokyo) (78) pp 713-718
318. Averdam A, Markl J, Burmester T
Subunit Sequences of the 4 x 6-mer Hemocyanin from the Golden Orb-Web Spider, *Nephila inaurata*
2003 Eur J Biochem (270) pp 3432-3439
319. Lamy J, Lamy J, Weill J
Arthropod Hemocyanin Structure: Isolation of Eight Subunits in the Scorpion
1979 Arch Biochem Biophys (193) pp 140-149
320. Terwilliger N, Ryan M, Towle D
Evolution of Novel Functions: Cryptocyanin helps build new Exoskeleton in *Cancer magister*
2005 J Exp Biol (208) pp 2467-2474
321. Volbeda A, Hol W
Pseudo 2-fold Symmetry in the Copper-Binding Domain of Arthropodan Haemocyanins. Possible Implications for the Evolution of Oxygen Transport Proteins
1989 J Mol Biol (206) pp 531-546
322. Arellano S, Terwilliger N
Hemocyanin, Cryptocyanin and Phenoloxidase in Deep Sea (*Bathynomus giganteus*) and Intertidal (*Cirolana harfordi*) Isopods
2004 Integr Comp Biol (43) pp 961
323. Stoll V, Blanchard J
Buffers: Principles and Practice
1990 Methods Enzymol (182) pp 24-38
324. Halaban R, Cheng E, Svedine S, Aron R, Hebert D
Proper Folding and Endoplasmic Reticulum to Golgi Transport of Tyrosinase are induced by its Substrates, DOPA and Tyrosine
2001 J Biol Chem (276) pp 11933-11938
325. Sigma-Aldrich, Generelle Produktbeschreibung. 2005
326. Good N, Winget G, Winter W, Connolly T, Izawa S, Singh R
Hydrogen Ion Buffers for Biological Research
1966 Biochemistry (5) pp 467-477
327. Tanford C
Protein Denaturation
1968 Adv Protein Chem (23) pp 121-275
328. Privalov P
Stability of Proteins: Small Globular Proteins
1979 Adv Protein Chem (33) pp 167-241
329. Steif C, Weber P, Hinz H, Flossdorf J, Cesareni G, Kokkinidis M
Subunit Interactions Provide a Significant Contribution to the Stability of the Dimeric four-alpha-helical-bundle Protein ROP
1993 Biochemistry (32) pp 3867-3876

330. Guzman-Casado M, Parody-Morreale A, Mateo P, Sanchez-Ruiz J
Differential Scanning Calorimetry of Lobster Haemocyanin
1990 Eur J Biochem (188) pp 181-185
331. Sterner R, Decker H
Inversion of the Bohr Effect upon Oxygen Binding to 24-meric Tarantula Hemocyanin
1994 Proc Natl Acad Sci USA (91) pp 4835-4839
332. Espin JC, Wichers HJ
Activation of a Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase Isoform by Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Kinetic Properties of the SDS-Activated Isoform
1999 J Agric Food Chem (47) pp 3518-3525
333. Mainzel J
Acrylamide Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids
in Habel K, Salzman N
Fundamental Techniques of Virology
1969 Academic Press New York
334. Eicken C, Krebs B, Sacchettini J
Catecholoxidase-Structure and Activity
1999 Curr Opin Struct Biol (6) pp 677-683
335. Decker H, Schweikardt T, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tuczec F
Similar Activation Process and Catalysis in Hemocyanins and Tyrosinases
2007 GENE - Functional Genomics (submitted)
336. Solomon E, Tuczec F, Root D, Brown C
Spectroscopy of Binuclear Dioxygen Complexes
1994 Chem Rev (94) pp 827-856
337. Blanchard J
Buffers for Enzymes
1984 Methods Enzymol (104) pp 404-414
338. Halaban R, Böhm M, Dotto P, Moellmann G, Cheng E, Zhang Y
Growth Regulatory Proteins that repress Differentiation Markers in Melanocytes also downregulate the Transcription Factor Microphthalmia
1996 J Invest Dermatol (106) pp 1266-1272
339. Hoffmann J, Kafatos F, Janeway C, Ezekowitz R
Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity
1999 Science (284) pp 1313-1318
340. Sugita H, Sekiguchi K
Protein Components in the Perivitelline Fluid of the Embryo of the Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*
1979 Dev Biol (73) pp 183-192
341. Vilcinskas A, Wedde M
Insect Inhibitors of Metalloproteinases
2002 IUBMB Life (54) pp 339-343
342. Dimopoulos G
Insect Immunity and its Implication in Mosquito-Malaria Interactions
2003 Cell Microbiol (5) pp 3-14

-
343. Hoffmann J, Reichhart J, Hetru C
Innate Immunity in Higher Insects
1996 Curr Opin Immunol (8) pp 8-13
344. Ratner S, Vinson S
Phagocytosis and Encapsulation: Cellular Immune Responses in Arthropoda
1983 Amer Zool (23) pp 185-194
345. Nappi A, Vass E
Melanogenesis and the Generation of Cytotoxic Molecules during Insect Cellular Immune Reactions
1993 Pigment Cell Res (6) pp 117-126
346. Phipps D, Chadwick J, Aston W
Gallysin-1, an Antibacterial Protein Isolated from Hemolymph of *Galleria mellonella*
1994 Dev Comp Immunol (18) pp 13-23
347. Söderhäll K, Thörnqvist P
Crustacean Immunity - A Short Review
1997 Dev Biol Stand (90) pp 45-51
348. Smith V, Söderhäll K
Induction of Degranulation and Lysis of Haemocytes in the Freshwater Crayfish, *Astacus astacus* by Components of the Prophenoloxidase Activating System *in vitro*
1983 Cell Tissue Res (233) pp 295-303
349. Iwanaga S, Lee B
Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals
2005 J Biochem Mol Biol (38) pp 128-150
350. Bang F
A Bacterial Disease of *Limulus polyphemus*
1956 Bull Johns Hopkins Hosp (98) pp 325-351
351. Muta T, Oda T, Iwanaga S
Horseshoe Crab Coagulation Factor B. A Unique Serine Protease Zymogen Activated by cleavage of an Ile-Ile Bond
1993 J Biol Chem (268) pp 21384-21388
352. Shigenaga T, Takayenoki Y, Kawasaki S, Seki N, Muta T, Toh Y, Ito A, Iwanaga S
Separation of Large and Small Granules from Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*) Hemocytes and Characterization of their Components
1993 J Biochem (Tokyo) (114) pp 307-316
353. Ahtiainen J, Alatalo R, Kortet R, Rantala M
Sexual Advertisement and Immune Function in an Arachnid Species (Lycosidae)
2004 Behav Ecol (15) pp 602-606
354. Lambert J, Keppe E, Dimarcq J, Wicker C, Reichhart J, Dunbar B, Lepage P, van Dorsselaer A, Hoffmann J, Fothergill J, Hoffmann D
Insect Immunity: Isolation from Immune Blood of the Dipteran *Phormia terranova* of two Insect Antibacterial Peptides with Sequence Homology to Rabbit Lung Macrophage Bactericidal Peptides
1989 Proc Natl Acad Sci USA (86) pp 262-266

355. Janeway C, Travers P
Immunologie
1997 Spektrum Verlag Heidelberg
356. Hung S, Boucias D
Phenoloxidase Activity in Hemolymph of Naive and *Beauveria bassiana*-Infected *Spodoptera exigua* Larvae
1996 J Invertebr Pathol (67) pp 35-40
357. Robey F, Liu T
Limulin: A C-Reactive Protein from *Limulus polyphemus*
1981 J Biol Chem (256) pp 969-975
358. Nguyen N, Suzuki A, Cheng S, Zon G, Liu T
Isolation and Characterization of *Limulus* C-Reactive Protein Genes
1986 J Biol Chem (261) pp 10450-10455
359. Nguyen N, Suzuki A, Boykins R, Liu T
The Amino Acid Sequence of *Limulus* C-Reactive Protein. Evidence of Polymorphism
1986 J Biol Chem (261) pp 10456-10465
360. Bettler E, Imberty A, Loris R
Centre National de la Recherche Scientifique - Lectines
(Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales)
2006 <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>
361. Sharon N, Lis H
History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules
2004 Glycobiology (14) pp 53-62
362. Noguchi H
On the Multiplicity of the Serum Haemagglutinins of Cold-Blooded Animals
1903 Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, I. Abt. Orig. (34) pp 286-288
363. Nowak T, Barondes S
Agglutinin from *Limulus polyphemus*. Purification with Formalinized Horse Erythrocytes as the Affinity Adsorbent
1975 Biochim Biophys Acta (393) pp 115-123
364. Tsuboi I, Matsukawa M, Sato N, Kimura S
Isolation and Characterization of a Sialic Acid-Specific binding Lectin from the Hemolymph of Asian Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*
1993 Biochim Biophys Acta (1156) pp 255-262
365. Brandin E, Pistole T
Polyphemins: A Teichoic Acid-Binding Lectin from the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*
1983 Biochem Biophys Res Commun (113) pp 611-617
366. Shimizu S, Ito M, Niwa M
Lectins in the Hemolymph of Japanese Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*
1977 Biochim Biophys Acta (500) pp 71-79

-
367. Bishayee S, Dorai D
Isolation and Characterisation of a Sialic Acid-Binding Lectin (Carcinoscorpin) from Indian Horseshoe Crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*
1980 Biochim Biophys Acta (623) pp 89-97
368. Dorai D, Bachhawat B, Bishayee S, Kannan K, Rao D
Further Characterization of the Sialic Acid-Binding lectin from the Horseshoe Crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*
1981 Arch Biochem Biophys (209) pp 325-333
369. Okino N, Kawabata S, Saito T, Hirata M, Takagi T, Iwanaga S
Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a 27-kDa Lectin (L10) from Horseshoe Crab Hemocytes
1995 J Biol Chem (270) pp 31008-31015
370. Saito T, Kawabata S, Hirata M, Iwanaga S
A Novel Type of Limulus Lectin-L6. Purification, Primary Structure, and Antibacterial Activity
1995 J Biol Chem (270) pp 14493-14499
371. Liu T, Lin Y, Cislo T, Minetti C, Baba J, Liu T
Limunectin. A Phosphocholine-Binding Protein from *Limulus* Amebocytes with Adhesion-Promoting Properties
1991 J Biol Chem (266) pp 14813-14821
372. Gilbride K, Pistole T
The Presence of Copper in a Purified Lectin from *Limulus polyphemus*: Possible New Role for Hemocyanin
1981 Dev Comp Immunol (5) pp 347-352
373. Horn E, Kerr M
The Hemolymph Proteins of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. I. Hemocyanins and Certain other Major Protein Constituents
1969 Comp Biochem Physiol (29) pp 493-508
374. van Holde K, van Bruggen E
The Hemocyanins
in Timashell S, Fasman G
Subunits in Biological Systems. Part A
1971 Marcel Dekker New York
375. Lorenzini D, da Silva P, Jr, Fogaca A, Bulet P, Daffre S
Acanthoscurrin: A novel Glycine-Rich Antimicrobial Peptide constitutively expressed in the Hemocytes of the Spider *Acanthoscurria gomesiana*
2003 Dev Comp Immunol (27) pp 781-791
376. Boman H
Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity
1995 Annu Rev Immunol (13) pp 61-92
377. Wang R, Lee SY, Cerenius L, Söderhäll K
Properties of the Prophenoloxidase Activating Enzyme of the Freshwater Crayfish, *Pacifastacus leniusculus*
2001 Eur J Biochem (268) pp 895-902

378. Lee SY, Lee BL, Söderhäll K
Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*
2003 J Biol Chem (278) pp 7927-7933
379. Osaki T, Omotezako M, Nagayama R, Hirata M, Iwanaga S, Kasahara J, Hattori J, Ito I, Sugiyama H, Kawabata S
Horseshoe Crab Hemocyte-derived Antimicrobial Polypeptides, Tachystatins, with Sequence Similarity to Spider Neurotoxins
1999 J Biol Chem (274) pp 26172-26178
380. Shigenaga T, Muta T, Toh Y, Tokunaga F, Iwanaga S
Antimicrobial Tachyplesin Peptide Precursor. cDNA Cloning and Cellular Localization in the Horseshoe Crab (*Tachyplesus tridentatus*)
1990 J Biol Chem (265) pp 21350-21354
381. Zasloff M
Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms
2002 Nature (415) pp 389-395
382. Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachère E
Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda)
1997 J Biol Chem (272) pp 28398-28406
383. Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T
IsCT, a Novel Cytotoxic Linear Peptide from Scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*
2001 Biochem Biophys Res Commun (286) pp 820-825
384. Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann J, Bulet P
Insect Immunity. Isolation from the Lepidopteran *Heliothis virescens* of a Novel Insect Defensin with Potent Antifungal Activity
1999 J Biol Chem (274) pp 9320-9326
385. Gao L, Zhang J, Feng W, Bao N, Song D, Zhu B
Pharmacological Characterisation of Spider Antimicrobial Peptides
2005 Protein Pept Lett (12) pp 507-511
386. Silva P, Jr, Daffre S, Bulet P
Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-Rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family
2000 J Biol Chem (275) pp 33464-33470
387. Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, Fehlbaum P, Hoffmann J, van Dorsselaer A, Bulet P
Characterization of Novel Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood
1996 J Biol Chem (271) pp 29537-29544

LITERATURNACHWEISE FÜR ABBILDUNG 120

Strukturelle Einteilung der antimikrobiellen Peptide aus Cheliceraten

1. Bachère E, Destoumieux D, Bulet P: 2000 *Aquaculture* (191) pp 71-88
2. Trenczek T: 1992 *Biologie in unsrer Zeit* (4) pp 212-217
3. Lorenzini D, da Silva P, Jr, Fogaca A, Bulet P, Daffre S: 2003 *Dev Comp Immunol* (27) pp 781-791
4. Schneider M, Dorn A: 2001 *J Invertebr Pathol* (78) pp 135-140
5. Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen G, Woese C: 1985 *Proc Natl Acad Sci USA* (82) pp 4443-4447
6. Montville T, Chen Y: 1998 *Appl Microbiol Biotechnol* (50) pp 511-519
7. Frank R, Gennaro R, Schneider K, Przybylski M, Romeo D: 1990 *J Biol Chem* (265) pp 18871-18874
8. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K: 1990 *J Biol Chem* (265) pp 11333-11337
9. Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Muller HM, Dimopoulos G: 2001 *Proc Natl Acad Sci USA* (98) pp 12630-12635
10. Aumelas A, Mangoni M, Roumestand C, Chiche L, Despaux E, Grassy G, Calas B, Chavanieu A: 1996 *Eur J Biochem* (237) pp 575-583
11. Iijima R, Kurata S, Natori S: 1993 *J Biol Chem* (268) pp 12055-12061
12. Cociancich S, Dupont A, Hegy G, Lanot R, Holder F, Hetru C, Hoffmann J, Bulet P: 1994 *Biochem J* (300) pp 567-575
13. Giangaspero A, Sandri L, Tossi A: 2001 *Eur J Biochem* (268) pp 5589-5600
14. Matsuzaki K: 1998 *Biochim Biophys Acta* (1376) pp 391-400
15. Iwanaga S, Kawabata S, Muta T: 1998 *J Biochem (Tokyo)* (123) pp 1-15
16. Kawabata S, Nagayama R, Hirata M, Shigenaga T, Agarwala KL, Saito T, Cho J, Nakajima H, Takagi T, Iwanaga S: 1996 *J Biochem (Tokyo)* (120) pp 1253-1260
17. Lee S, Lee B, Söderhäll K: 2003 *J Biol Chem* (278) pp 7927-7933
18. Bulet P, Hetru C, Dimarcq J, Hoffmann D: 1999 *Dev Comp Immunol* (23) pp 329-344
19. Osaki T, Omotezako M, Nagayama R, Hirata M, Iwanaga S, Kasahara J, Hattori J, Ito I, Sugiyama H, Kawabata S: 1999 *J Biol Chem* (274) pp 26172-26178
20. Xylander W: 1994 *Spiegel der Forschung* (27) pp 27-30
21. Sitaram N, Nagaraj R: 1999 *Biochim Biophys Acta* (1462) pp 29-54
22. Ganz T, Lehrer R: 1994 *Curr Opin Immunol* (6) pp 584-589
23. Lehrer R, Ganz T, Selsted M: 1991 *Cell* (64) pp 229-230
24. Dimarcq J, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J: 1998 *Biopolymers* (47) pp 465-477
25. Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, Yoshikawa K, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y: 1989 *J Biochem (Tokyo)* (106) pp 663-668

26. Gillespie J, Kanost M, Trenczek T: 1997 *Annu Rev Entomol* (42) pp 611-643
27. Götz P: 1988 *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* (81) pp 113-129
28. Boman H: 1991 *Cell* (65) pp 205-207
29. Mor A, Nguyen V, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P: 1991 *Biochemistry* (30) pp 8824-8830
30. Ghosh J, Shaol D, Guillaud P, Ciceron L, Mazier D, Kustanovich I, Shai Y, Mor A: 1997 *J Biol Chem* (272) pp 31609-31616
31. Imler J, Hoffmann J: 2000 *Curr Opin Microbiol* (3) pp 16-22
32. Hoffmann J, Reichhart J: 1997 *Trends Cell Biol* (7) pp 309-316
33. Saito T, Kawabata S, Hirata M, Iwanaga S: 1995 *J Biol Chem* (270) pp 14493-14499
34. Kawabata S, Iwanaga S: 1999 *Dev Comp Immunol* (23) pp 391-400
35. Beisel HG, Kawabata S, Iwanaga S, Huber R, Bode W: 1999 *Embo J* (18) pp 2313-2322
36. Iwanaga S: 2002 *Curr Opin Immunol* (14) pp 87-95
37. Silva P, Jr, Daffre S, Bulet P: 2000 *J Biol Chem* (275) pp 33464-33470
38. Mandard N, Bulet P, Caille A, Daffre S, Vovelle F: 2002 *Eur J Biochem* (269) pp 1190-1198
39. Lorenzini D, Fukuzawa A, da Silva P, Jr., Machado-Santelli G, Bijovsky A, Daffre S: 2003 *Insect Biochem Mol Biol* (33) pp 1011-1016
40. Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, Fehlbaum P, Hoffmann J, van Dorsselaer A, Bulet P: 1996 *J Biol Chem* (271) pp 29537-29544
41. Wang R, Lee SY, Cerenius L, Söderhäll K: 2001 *Eur J Biochem* (268) pp 895-902
42. Lee SY, Wang R, Söderhäll K: 2000 *J Biol Chem* (275) pp 1337-1343
43. Huang TS, Wang H, Lee SY, Johansson MW, Söderhäll K, Cerenius L: 2000 *J Biol Chem* (275) pp 9996-10001
44. Lee S, Söderhäll K: 2001 *J Immunol* (166) pp 7319-7326
45. Kuhn-Nentwig L, Muller J, Schaller J, Walz A, Dathe M, Nentwig W: 2002 *J Biol Chem* (277) pp 11208-11216
46. Kuhn-Nentwig L, Schaller J, Streb B, Kämpfer U: 1998 *Toxicon* (36) pp 1276-1277
47. Kuhn-Nentwig L, Dathe M, Walz A, Schaller J, Nentwig W: 2002 *FEBS Lett* (527) pp 193-198
48. Garcia-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P, Molina A, Alamillo JM, Lopez-Solanilla E, Berrocal-Lobo M, Poza-Carrion C: 2001 *FEBS Lett* (498) pp 219-222
49. Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachère E: 2001 *J Biol Chem* (276) pp 47070-47077
50. Yan L, Adams M: 1998 *J Biol Chem* (273) pp 2059-2066
51. Corzo G, Villegas E, Gomez-Lagunas F, Possani L, Belokoneva O, Nakajima T: 2002 *J Biol Chem* (277) pp 23627-23637
52. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham K, He W, Norton R, Nakajima T: 2001 *Biochem J* (359) pp 35-45
53. Muta T, Fujimoto T, Nakajima H, Iwanaga S: 1990 *J Biochem (Tokyo)* (108) pp 261-266

54. Shigenaga T, Takayenoki Y, Kawasaki S, Seki N, Muta T, Toh Y, Ito A, Iwanaga S: 1993 J Biochem (Tokyo) (114) pp 307-316
55. Kawano K, Yoneya T, Miyata T, Yoshikawa K, Tokunaga F, Terada Y, Iwanaga S: 1990 J Biol Chem (265) pp 15365-13567
56. Muta T, Iwanaga S: 1996 Prog Mol Subcell Biol (15) pp 154-189
57. Matsuzaki K, Yoneyama S, Fujii N, Miyajima K, Yamada K, Kirino Y, Anzai K: 1997 Biochemistry (36) pp 9799-9806
58. Morvan A, Iwanaga S, Comps M, Bachère E: 1997 J Invertebr Pathol (69) pp 177-182
59. Shigenaga T, Muta T, Toh Y, Tokunaga F, Iwanaga S: 1990 J Biol Chem (265) pp 21350-21354
60. Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, Sugiura