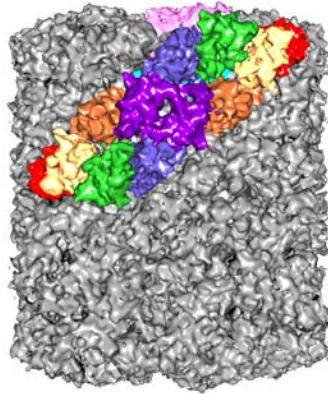


**Strukturelle, enzymkinetische und thermodynamische
Untersuchungen am KLH, dem Hämocyanin der
Schlüsselbohrschnecke *Megathura crenulata***



D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades

„D o k t o r
d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Kay Büchler
geboren in Koblenz

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2008

Für ■

***Die Weisheit eines Menschen misst man nicht nach seinen Erfahrungen,
sondern nach seiner Fähigkeit, Erfahrungen zu machen.***

George Bernhard Shaw

Veröffentlichungen

Tagungsabstracts

Boisguérin, V., Dürr, R., **Büchler, K.**, Lieb, B., Markl, J.
Recombinant expression of molluscan hemocyanin (KLH) substructures in prokaryotic and eukaryotic systems (2005). 98. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Bayreuth*. Abstract map p. 98.

Büchler, K., Hellmann, N., Markl, J., Decker, H., Jaenicke, E.
Attempts to crystallize the collar functional unit h of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) for X-ray studies, and thermodynamic investigation of molecular substructures (2006). 99. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Münster*. Abstract map p.152.

Büchler, K., Gebauer, W., Hellmann, N., Markl, J., Decker, H., Jaenicke, E.
Attempts to crystallize the collar functional unit h of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) for X-ray studies, and thermodynamic investigation of molecular substructures (2006). *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biophysik (DGfB), Mainz*. Abstract map p. 52.

Barends, T., Büchler, K., Gatsogiannis C., Schlichting I., Decker, H., Markl, J., Jaenicke, E.
Hybrid methods in the structure determination of extremely large proteins (2007). *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kristallwachstum (DGK) und der deutschen Gesellschaft für Kristallwachstum und Kristallzüchtung (DGKK), Bremen*.

Inhaltsverzeichnis

A	<i>Einleitung</i>	1
1	Hämocyanin als respiratorisches Blutprotein vieler Invertebraten _____	1
2	Das Hämocyanin der Mollusken – eine allgemeine Einführung _____	3
3	Das Hämocyanin der Gastropoden und Cephalopoden unterscheidet sich hinsichtlich seiner Quartärstruktur _____	5
4	Die Kristallstruktur der FU-g von <i>Octopus dofleini</i> und der FU-e von <i>Rapana thomasi</i> hilft die Beziehung zwischen Struktur und Funktion zu verstehen _____	7
5	Hämocyanine besitzen ähnliche aktive Zentren wie Tyrosinasen und Catecholoxidasen _____	9
6	Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen _____	10
7	Die Melanogenese _____	14
8	Hämocyanine können nach Aktivierung Catecholoxidase- und sogar Tyrosinase-Aktivität zeigen _____	16
9	Hämocyanine zeigen eine mit dem Oligomerisierungszustand zunehmende thermische Stabilität _____	21
10	Das Hämocyanin der großen Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i> _____	23
11	Medizinische Einsatzgebiete des KLH _____	25
12	Ziele der Arbeit _____	27
B	<i>Material und Methoden</i>	29
1	Tiere und Tierhaltung _____	29
2	Verwendete Chemikalien und Geräte _____	30
3	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen _____	30
4	Allgemeine proteinbiochemische Methoden _____	31
4.1	Aufbereitung des Hämolymphe-Serums _____	31
4.2	Isolierung der Isoformen KLH1 und KLH2 _____	32
4.3	Isolierung von KLH1-Dekameren _____	33
4.4	Dissoziation des KLH in seine Untereinheiten _____	33
4.5	Konzentrierung von Proteinproben _____	34
4.5.1	Amicon Ultra-15-Filtrationssystem _____	34
4.5.2	Vivaspin-500-Ultrafiltration _____	35
4.6	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) _____	35

4.6.1	SDS-PAGE	35
4.6.2	Native PAGE	36
4.6.3	Aktivitätsfärbung	39
4.7	Limitierte proteolytische Spaltungen	39
4.8	Zweidimensionale Immunelektrophorese	40
4.8.1	Crossed Immunelektrophorese	41
4.8.2	Crossed-line Immunelektrophorese	42
4.8.3	Aktivitätsfärbung	43
4.9	Anionenaustausch-Chromatographie (AEC)	44
4.10	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	45
4.11	Langzeitlagerung der zur Kristallisation bestimmten Proteinproben	46
4.12	Proteasenaktivitäts-Nachweis mittels Azocasein	47
4.13	Enzymaktivitätstests	48
4.13.1	MBTH-Enzymassay	49
4.13.2	Kinetiken	50
5	Allgemeine biophysikalische Methoden	52
5.1	Röntgenstrukturanalyse	52
5.1.1	Kristallisation	52
5.1.2	Charakterisierung der Kristalle	55
5.1.3	Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten	55
5.1.4	Bestimmung der Phasen	58
5.1.5	Modellbau und Strukturverfeinerung	59
5.2	Differenz Scanning-Kalorimetrie (DSC)	59
5.3	Spektroskopie	63
5.3.1	Absorptionsspektroskopie	63
5.3.2	Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	65
5.3.3	Fluoreszenzspektroskopie	67
5.4	Dynamische Lichtstreuung	70
5.5	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	71
C	Ergebnisse	74
1	Ablauf und Strategie der Projekte	74
2	Isolierung von KLH1- und KLH2-Didekameran und deren Untereinheiten	75
3	Isolierung von KLH1-Dekameran	78
4	Isolierung von Mono- und Mehrdomänen-Fragmenten des KLH2	80
4.1	Spaltung der KLH2-Untereinheiten mit Trypsin	80
4.2	Spaltung der KLH2-Untereinheiten mit V8-Protease	82

4.3	Sekundärsplaltung der V8-Splaltprodukte der KLH2-UE mit Trypsin _____	85
5	Übersicht der KLH2-Splaltungen und der Aufreinigungen der Splaltprodukte _____	89
6	Isolierung von Mono- und Mehrdomänen-Fragmenten des KLH1 _____	91
6.1	Splaltung der KLH1-Untereinheiten mit Trypsin _____	91
6.2	Splaltung der KLH1-Untereinheiten mit V8-Protease _____	93
7	Übersicht der KLH1-Splaltungen und der Aufreinigungen der Splaltprodukte _____	98
8	Strategien zur Isolierung großer und reiner Mengen der FU KLH1-h _____	99
9	Kristallisation der FU KLH1-h _____	102
10	Aufnahme und Auswertung von Röntgenbeugungsdaten der Drehanode und des Synchrotrons _____	104
11	Strategien zur Erzielung einer höheren Auflösung der Röntgenstruktur _____	111
11.1	Inhibition der V8-Proteasenaktivität _____	113
11.2	Entfernung der V8-Protease aus den Fraktionen der FU KLH1-h _____	114
11.2.1	Charakteristische Absorptionsspektren und Farbgebung der FU KLH1-h _____	123
12	Kristallisation der proteasenfrenen FU KLH1-h _____	124
13	Enzymkinetische Charakterisierungen des KLH _____	127
13.1	Qualitative Untersuchungen zur Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der <i>nativen PAGE</i> _____	128
13.2	Qualitative Untersuchungen zur Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed Immunelektrophorese</i> _____	132
13.2.1	Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Catechol _____	133
13.2.2	Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Dopamin _____	135
13.2.3	Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols L-DOPA _____	137
13.2.4	Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols Tyramin _____	139
13.2.5	Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols 4-Methylphenol _____	141
13.3	Qualitative Untersuchungen zur intrinsischen Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH in der <i>Crossed Immunelektrophorese</i> _____	143
13.4	Quantitative Untersuchungen zur SDS-induzierten Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH mittels Kinetikmessungen im <i>Spektralphotometer</i> _____	145
13.4.1	Vorversuche zur Stabilität der KLH-Didekamere nach SDS-Applikation _____	147
13.4.2	Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Catechol _____	149
13.4.3	Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Dopamin _____	152
13.4.4	Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols L-DOPA _____	154
13.4.5	Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols Tyramin _____	156
13.4.6	Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols 4-Methylphenol _____	159

13.5	Quantitative Untersuchungen zur intrinsischen Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH mittels <i>Kinetikmessungen</i> im Spektralphotometer _____	161
13.6	Einfluss von Effektoren auf die relativen Substrat-Umsätze des KLH nach SDS-Aktivierung _____	165
13.6.1	Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf die relativen Umsatzraten des KLH _____	165
13.6.2	Einfluss zweiwertiger Kationen auf die relativen Umsatzraten des KLH _____	167
14	Thermodynamische Charakterisierungen des KLH _____	170
14.1	Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener Oligomerisierungszustände des KLH mittels Differenz Scanning-Kalorimetrie (DSC) _____	170
14.2	Nachweis der Irreversibilität der thermischen Entfaltung des KLH _____	174
14.3	Einfluss von SDS auf die thermische Stabilität des KLH _____	176
14.4	Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Quartärstruktur der KLH1-Didekamere im TEM _____	177
14.5	Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH mittels CD-Spektroskopie _____	180
14.6	Untersuchungen zur Sauerstoffbeladung des KLH mit zunehmender Temperatur mittels Absorptionsspektroskopie _____	181
14.7	Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Tertiärstrukturen des KLH mittels Fluoreszenzspektroskopie _____	183
D	<i>Diskussion</i>	187
1	Röntgenstrukturanalyse der FU KLH1-h _____	187
1.1	Isolierung der FU KLH1-h _____	187
1.2	Kristallisation der FU KLH1-h _____	189
1.3	Problematik der proteolytischen Aktivität der V8-Protease bei der Röntgenstrukturanalyse der FU KLH1-h _____	190
1.3.1	Spezifität der V8-Protease _____	191
1.3.2	Inhibition der V8-Protease _____	195
1.4	Röntgenstruktur der FU KLH1-h und deren C-terminaler Zusatzdomäne _____	197
1.5	Charakteristische Farbgebung und Absorptionsspektrum der FU KLH1-h _____	201
1.6	Biologische Bedeutung der FU KLH1-h und deren C-terminaler Cupredoxin-Domäne _____	203
2	Enzymkinetische Charakterisierungen des KLH _____	208
2.1	Aktivierung des KLH zur Tyrosinase/Catecholoxidase _____	208
2.2	Molekulare Ursachen der intrinsischen und SDS-induzierten Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität einiger FUs des KLH _____	210
2.3	Einfluss von Effektoren auf die Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH _____	215
2.3.1	Regulation der Aktivität durch den Puffer _____	215

2.3.2	Regulation der Aktivität durch zweiwertige Kationen	217
2.3.2.1	Diphenoloxidase-Aktivität	217
2.3.2.2	Monophenolhydroxylase-Aktivität	219
2.4	Biologische Bedeutung der Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH	220
3	Thermodynamische Charakterisierungen des KLH	225
3.1	Irreversibilität der thermischen Denaturierung des KLH	225
3.2	Untersuchungen zur thermischen Stabilität des KLH in der DSC	226
3.2.1	Einfluss des Oligomerisierungszustands	228
3.2.2	Einfluss von Glykosilierungen	228
3.2.3	Einfluss des Kupferzentrums	229
3.2.4	Einfluss von Disulfidbrücken	229
3.2.5	Einfluss bivalenter Kationen	230
3.3	Untersuchungen zur thermischen Stabilität des KLH mittels spektroskopischer Methoden	231
3.3.1	Thermische Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH	231
3.3.2	Thermische Stabilität der Tertiärstrukturelemente des KLH	232
3.3.3	Oxygenierungszustand des aktiven Zentrums des KLH bei hohen Temperaturen	234
3.4	Medizinische und biologische Bedeutung der (thermischen) Stabilität des KLH	236
E	Zusammenfassung	238
F	Summary	239
G	Anhang	240
1	Verzeichnisse	240
1.1	Abkürzungsverzeichnis	240
1.2	Abkürzungen der Hämocyanine	242
1.3	Abkürzungscode und Molekulargewichte* der Aminosäuren	242
1.4	Abbildungsverzeichnis	243
1.5	Tabellenverzeichnis	247
2	Verwendete Software	249
3	Internetadressen	249
H	Literatur	250
I	Danksagung	275
	Eidesstattliche Erklärung	276
	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

A Einleitung

1 *Hämocyanin als respiratorisches Blutprotein vieler Invertebraten*

Die frühe Phase der Erdgeschichte zeichnete sich durch eine anaerobe Atmosphäre aus, die sich mit dem Aufkommen photosynthetisch aktiver Organismen zunehmend mit Sauerstoff anreicherte. Dies führte zu einem hohen Evolutionsdruck der Lebewesen, Strategien zum Schutz vor dem freiwerdenden Sauerstoff und dessen reaktiven Derivaten zu entwickeln. Die zu diesem Zweck entwickelten sauerstoffbindenden Proteine sind anzestrale Moleküle, die im Präkambrium vor 600 bis 800 Millionen Jahren ihren Ursprung haben (Van Holde & Miller, 1995; Van Holde *et al.*, 2001). Organismen, die über den katabolen Reaktionsweg der Zellatmung Energie gewinnen und den Sauerstoff somit als Elektronen-Endakzeptor in der Atmungskette nutzen, sind auf eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff angewiesen. Um dies zu gewährleisten, reicht bei kleineren Tieren ein Gasaustausch durch Diffusion aus, da die Strecken zu den einzelnen Zellen kurz genug sind, um eine schnelle und ausreichende Sauerstoffversorgung zu ermöglichen. Bei größeren Tieren hingegen ist die Hauptmasse des Körpers vom Atemmedium isoliert und die Sauerstoffversorgung aufgrund des verringerten Oberflächen-/Volumen-Verhältnisses unzureichend. Somit sind Tracheen- oder vaskuläre und coelomatische Kreislaufsysteme zur Verteilung des Sauerstoffs im Körper essenziell. Allerdings ist die Menge an Sauerstoff, welche in physikalisch gelöster Form im Blut transportiert werden kann, mit maximal 4 mg/ml zu gering, um eine ausreichende O₂-Lieferung für die Zellatmung zu gewährleisten. Zur Steigerung der Transporteffizienz entwickelten einige Tierstämme spezielle respiratorische Proteine für die reversible Bindung und den Transport des Sauerstoffs. Um den osmotischen Druck und die Viskosität möglichst gering zu halten, liegen diese entweder dicht gepackt in Transportzellen (intrazellulär) vor oder bilden große, extrazelluläre Molekülaggregate, die frei im Blut bzw. in der Hämolymphe flottieren. Im Laufe der Evolution sind bei den unterschiedlichen Tiergruppen verschiedene Atmungspigmente unabhängig voneinander entstanden. Sie lassen sich aufgrund ihres aktiven Zentrums, an welchem die reversible Sauerstoffbindung erfolgt, in drei große Gruppen einteilen: **Hämoglobin** und **Hämerythrin**, mit Eisen als Sauerstoffbindungspartner sowie **Hämocyanin**, mit Kupfer im aktiven Zentrum. Die Art des Metallions im aktiven Zentrum ist auch für die Farbgebung des Atmungspigments verantwortlich. Eisen sorgt für die rot-violette Färbung der Hämoglobine im oxygenierten Zustand, während Kupfer den Hämocyaninen im beladenen Zustand eine blaue Farbe verleiht und deoxygeniert farblos erscheint. Die Koordination des Eisens beim Hämoglobin erfolgt über ein Porphyrin-Ringsystem (Häm-Gruppe), während es beim Hämerythrin (z.B. bei Anneliden) direkt kovalent mit dem Protein verknüpft ist. Im Gegensatz zu den extrazellulären Hämocyaninen kommt Hämoglobin intra- und extrazellulär vor. Hämocyanin übernimmt bei den großen Tierstämmen **Mollusca** (Tintenfische, Käferschnecken, Schnecken, Fiederkiemern, einige Muschelarten) und **Arthropoda** (Pfeilschwänze, höhere Krebse, Spinnentiere, einige Tausendfüßer) den

Sauerstofftransport. Es gehört zu den Typ III-Kupferproteinen mit binukleären Kupferzentren, wobei jedes Kupfer durch drei hoch konservierte Histidine gebunden ist (Decker, 2005; Lerch, 1983). Die mit CuA und CuB bezeichneten Kupferatome liegen im deoxygenierten Zustand in der reduzierten Cu(I)-Form vor und werden bei Sauerstoffbindung in Form eines Peroxidions (O_2^{2-}) zu Cu(II) oxygeniert (Solomon *et al.*, 1992). Die Oxygenierung kommt hierbei durch die Ausbildung eines Kupfer-Sauerstoff-Komplexes zustande, wobei zwei Kupferatome ein Sauerstoffmolekül reversibel binden (Magnus *et al.*, 1994; Cuff *et al.*, 1998; Matoba *et al.*, 2006). Man geht davon aus, dass sich die Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen, einfach gebauten, Typ III-Kupferprotein entwickelt haben (Markl & Decker, 1992; Van Holde & Miller, 1995; Decker & Terwilliger, 2000; Burmester, 2002; Lieb *et al.*, 2001; Van Holde *et al.*, 2001). Bei diesem Vorläuferprotein könnte es sich womöglich um die universell in Organismen vorkommende Tyrosinase handeln, einem Schlüsselenzym der Melaninsynthese (Kap. A7). Auf dieser gemeinsamen Wurzel basiert die Ähnlichkeit aller Hämocyanine im Bereich des aktiven Zentrums. Da sich die Hämocyanin-Familien vermutlich bereits sehr früh in ihrer evolutiven Entwicklung vor möglicherweise 800 Millionen Jahren voneinander getrennt haben, verwundern die zahlreichen strukturellen Unterschiede in Primär-, Tertiär-, und Quartärstruktur nicht. Trotz der komplexen und unterschiedlichen Struktur der Hämocyanine ist die Sauerstoffbindung in Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen sehr ähnlich. Sie sorgt für eine kooperative Sauerstoffbindung, die sich in sigmoidalen Sauerstoffbindungskurven widerspiegelt. Mit Hill-Koeffizienten bis über 7 sind Hämocyanine die Biomoleküle mit der höchsten Kooperativität in der Natur (Loewe, 1978; Decker *et al.*, 1979; Decker & Sterner 1990; Erker *et al.*, 2005; Menze *et al.*, 2005; Olianias *et al.*, 2006). Hämocyanin gehört mit einem Molekulargewicht von bis zu über 8 Millionen zudem zu den größten bekannten Proteinen. Zusätzlich zu der Hauptaufgabe des Sauerstofftransports können den Hämocyaninen noch weitere Aufgaben zugeschrieben werden, wie z.B. die Beteiligung an der Energiespeicherung (Uglow, 1969a, b), an der Osmoregulation (Mangum, 1983), an Metallakkumulation und -transport (Zatta, 1984; Brouwer *et al.*, 1986, 2001; Chan & Weeks, 1992) sowie als Träger von Häutungshormonen bei Arthropoden (Jaenicke *et al.*, 1999). Eine schwache Tyrosinase- und Catecholoxidase-Aktivität konnte ebenfalls nach vorheriger Aktivierung bei einigen Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen nachgewiesen werden (Salvato *et al.*, 1983; Nakahara *et al.*, 1983; Zlateva *et al.*, 1996; Salvato *et al.*, 1998; Decker & Rimke, 1998; Decker & Tucek, 2000; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006; Decker *et al.*, 2007a, b; Hristova *et al.*, 2007).

Der Aufbau und die Struktur der Arthropoden-Hämocyanine sind bereits in vielen Details aufgeklärt. Die grundlegende Quartärstruktur ist ein würfelförmiges Hexamer, welches aus sechs nierenförmigen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von je 75 kDa aufgebaut ist. Je nach Arthropodengruppe tritt das Hämocyanin in der Hämolymphe entweder als einfaches Hexamer auf, (1 x 6) oder aber mehrere Hexamere sind zu einer 2 x 6, 4 x 6, 6 x 6 oder 8 x 6 Quartärstruktur vereinigt (Decker, 1981; Markl & Decker, 1992). Beim

Hämocyanin des 8 x 6-meren Hämocyanins von *Limulus polyphemus* wurden kürzlich die molekularen Kontakte zwischen den verschiedenen Untereinheiten und Hexameren, welche für die hohe Kooperativität der Moleküle verantwortlich sind, durch eine Kombination aus Röntgenkristallographie und 3D-Elektronenmikroskopie entschlüsselt (Martin *et al.*, 2006). Die Quartärstruktur des Hämocyanins der Mollusken zeichnet sich durch Hohlzylinder aus, dessen Aufbau im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.

2 *Das Hämocyanin der Mollusken – eine allgemeine Einführung*

Bei dem Hämocyanin der Mollusken handelt es sich bei einer Molekülmasse von 4 Millionen Dalton und einem Durchmesser von 35 nm um eines der größten in der Natur vorkommenden Proteine. Die im Elektronenmikroskop sichtbare Grundform bezeichnet man als **Dekamer**, da sie sich aus 10 Untereinheiten (Polypeptiden) von jeweils etwa 350 - 450 kDa zusammensetzt (Abb. A1). Jedes Dekamer ist wiederum aus fünf Untereinheiten-Dimeren aufgebaut, die einen dipentameren, ringförmigen Hohlzylinder bilden (Siezen & Van Bruggen, 1974; Wichertjes *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1990; Lamy *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1994; Orlova *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 2002; Meissner *et al.*, 2000, 2007, Gatsogiannis *et al.*, 2007). Die Assoziation von Monomer zu Dimer und von Dimer zu Dekamer erfordert hierbei das Vorhandensein von Magnesium-Ionen (Miller *et al.*, 1998). Innerhalb jedes Homodimers sind die Untereinheiten in einer antiparallelen Weise zueinander ausgerichtet, so dass eine helikale Schrägtextur entsteht. Jede Untereinheit eines Dekamers lässt sich strukturell weiter in sieben bis acht sogenannte funktionelle Einheiten (engl. *functional unit*, **FU**) untergliedern. Sie werden vom N- zum C-Terminus mit den Buchstaben „a“ bis „g“ bzw. „h“ gekennzeichnet und sind jeweils durch ein kurzes Linkerpeptid von 10 bis 15 Aminosäuren mit überwiegend kleinen und ungeladenen Seitengruppen verknüpft (Lang 1988; Lang & Van Holde, 1991). Sequenzdaten, Röntgenstrukturen und auf Cryo-TEM-Daten basierende 3D-Rekonstruktionen konnten einen detaillierten Einblick in die Struktur, Funktion und Topologie der FUs, der UE sowie des Gesamtmoleküls geben (Orlova *et al.*, 1997; Cuff *et al.*, 1998; Gebauer *et al.*, 2002; Perbandt *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2000, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Jede FU trägt ein aktives Zentrum mit zwei Kupfer-Ionen (**CuA** und **CuB**), die an drei hochkonservierte Histidinreste gebunden sind (Van Holde *et al.*, 1992; Cuff *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998;). Mittels dieses binukleären Typ III-Kupferzentrums erfolgt die reversible Bindung eines Sauerstoffmoleküls (Van Holde & Miller, 1995).

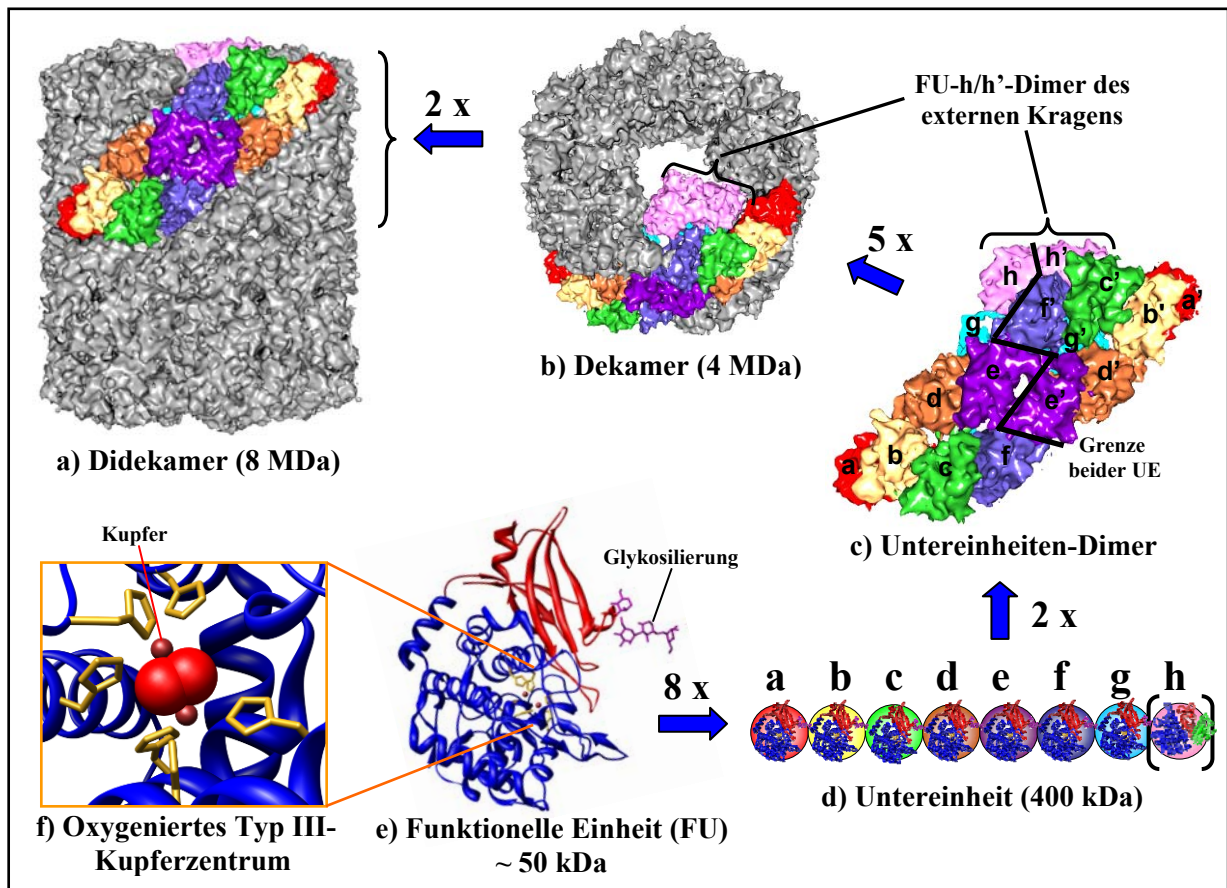


Abb. A1: Schematische Darstellung der verschiedenen Strukturebenen des Mollusken-Hämocyanins am Beispiel des KLH.

Didekamere bilden als Hohlzylinder die Grundstruktur des Hämocyanins von Gastropoden und Bivalviern (a). Sie formen sich durch Assoziation zweier Dekamere (b) an ihren offenen Seiten. Jedes einzelne Dekamere setzt sich aus fünf Dimeren zusammen, die wiederum jeweils aus zwei Untereinheiten/Polypeptidketten (UE) bestehen (c). Bei Chitonen und Cephalopoden kommen ausschließlich Dekamere in der Hämolymphe vor. Die Orientierung eines UE-Dimers innerhalb des Dekamers ist in a) und b) farblich dargestellt. Jede UE eines UE-Dimers besteht aus sieben (Cephalopoden) bzw. acht globulären funktionellen Einheiten (FUs), wobei die FUs a – f die Wand des Dekamers und die FUs-g und -h den Kragen des Moleküls formen (d). Bei Gastropoden wird der asymmetrische, externe Kragen eines Dekamers durch fünf FU-h/h'-Dimere zweier UE gebildet (b). Die Anordnung der einzelnen FUs innerhalb eines UE-Dimers ist farblich und in c) zusätzlich mit den Buchstaben a/a' – h/h' gekennzeichnet. Jede einzelne FU (e) trägt ein Typ III-Kupferzentrum mit zwei Kupferionen (braun), die jeweils an drei hochkonservierte Histidinreste (gelb) gebunden sind. Anhand dieses aktiven Zentrums (f) erfolgt die reversible Bindung von Sauerstoff (rot). 3D-Rekonstruktionen des KLH aus a) und b) von [Name], AG [Name]; c) nach Gatsogiannis *et al.*, 2007; Röntgenkristallstruktur der FU-g aus e) von *Octopus dofleini* nach Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1JS8.

Die einzelnen FUs verschiedener Molluskenklassen und -gattungen sind untereinander näher miteinander verwandt als verschiedene funktionelle Einheiten innerhalb der gleichen Tierspezies, sodass sie von einem polyklonalen Antikörpergemisch als immunologisch nicht verwandte Proteine erkannt werden. Man geht davon aus, dass das heutige Mollusken-Hämocyanin aus einer einzelnen FU durch wiederholte Genduplikation und erneute Fusionierung vor der Aufspaltung in Cephalopoden und Gastropoden entstanden ist (Lieb *et al.*, 2001; Altenhein *et al.*, 2002). Auch Glykosilierungsstellen innerhalb einzelner FUs sind keine Seltenheit und sind z.B. beim Hämocyanin von *Megathura crenulata* entscheidend für seine immunstimulatorischen Eigenschaften und seine bedeutende Rolle in der Immuntherapie (Harris & Markl, 1999, Kap. A12). Der Anteil an Polysacchariden kann bis zu 9 % betragen (Van Holde *et al.*, 1992; Stoeva *et al.*, 1999), wobei N-glykosidische

Zuckerreste mit den Motiven NXS, NXC und NXT (Foster & Davie, 1984) neben O-glykosidischen Resten den größten Teil ausmachen (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 1999, 2000). Die bisher untersuchten Kohlenhydratseitenketten sind je nach Organismus von unterschiedlicher Zusammensetzung. Bei dem Hämocyanin von *Megathura crenulata* wurde Mannose, Galactose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Fucose nachgewiesen (Stoeva *et al.*, 1999) und diverse Glykane in ihrer Struktur aufgeklärt (Kurokawa *et al.*, 2002). 3-O-Methylhexose und Xylose treten zudem bei den Hämocyaninen von *Helix pomatia* (Van Kuik *et al.*, 1985; Lommerse *et al.*, 1997; Gielens *et al.*, 2004) und *Lymnaea stagnalis* (Van Kuik *et al.*, 1986) auf. Bei Gastropoden (und einigen Bivalvia) kommt es zu einer Zusammenlagerung der asymmetrischen Dekamere zu sogenannten **Didekameren** (Abb. A1), während bei den Cephalopoden nur solitäre Dekamere existieren (Kap. A4). Allerdings lassen sich durch basische pH-Werte und bestimmte Konzentrationen an zweiwertigen Kationen auch die Didekamere der Gastropoden in ihre Dekamere zerlegen (Harris *et al.*, 1999). Durch den Entzug dieser Kationen und bei basischen pH-Werten kommt es als Folge der Instabilität schließlich zu einer Dissoziation in die Untereinheiten. Durch erneute Erniedrigung des pH-Werts und Zugabe der entsprechenden Kationen lässt sich dies jedoch problemlos umkehren, und es kommt zu einer Reassoziaton (Harris *et al.*, 1997a, b). Trotz ihres grundlegend gleichen Aufbaus des Mollusken-Hämocyanins, sollen einige Unterschiede bezüglich ihrer Quartärstruktur zwischen den verschiedenen Klassen, Ordnungen und sogar verschiedene Oligomerisierungsformen innerhalb der gleichen Art, Thema des nächsten Kapitels sein.

3 Das Hämocyanin der Gastropoden und Cephalopoden unterscheidet sich hinsichtlich seiner Quartärstruktur

Die Hämocyanine der Phyla Gastropoda und Cephalopoda zeigen einige Unterschiede bezüglich ihres molekularen Aufbaus sowie ihrer Quartärstruktur. Gemeinsam ist ihnen die Bildung des **Dekamers** als Grundeinheit aus insgesamt 10 Polypeptiden, die sich zu fünf Untereinheiten-Dimeren innerhalb des Dekamers zusammenlagern. Allerdings beschränkt sich das Hämocyanin der Kopffüßer auf das ausschließliche Vorkommen dieser Grundeinheit (Cuff *et al.*, 1998), während das der Gastropoden und einiger Bivalvia aus **Didekameren** mit einer Molekülmasse von 8 MDa besteht. Hierbei kommt es zu einer Zusammenlagerung der offenen Seiten der asymmetrischen Dekamere (Terwilliger *et al.*, 1988; Van Holde *et al.*, 1992; Herskovits & Hamilton, 1991; Lambert *et al.*, 1995b). Anhand der bisherigen Untersuchungen an Cephalopoden-Hämocyaninen können zwei verschiedene Typen unterschieden werden. So finden sich in den Ordnungen Vampyromorpha und Octopoda sowie bei der Unterklasse Nautiloidea Dekamere, deren Kragenregion nur von einer FU gebildet wird. Sequenzdaten des Hämocyanins von *Octopus dofleini* (OdH) konnten zeigen, dass die Untereinheiten dieses Hämocyanintyps, nicht wie bei den Gastropoden aus acht (Abb. A2 a), sondern nur aus sieben funktionellen Einheiten bestehen (Miller *et al.*, 1998; Lieb *et al.*, 2001). Bei beiden Klassen bilden die FUs a-f mit Molekülmassen um die 50 kDa die Wand des ringförmigen Moleküls. Allerdings fehlt bei den Kopffüßern die kragenbildende

FU-h der Gastropoden (Abb. A2 b, c), welche im Vergleich zu den anderen FUs eine C-terminale Verlängerung von zusätzlichen 100 Aminosäuren besitzt und somit eine Molekülmasse von etwa 60 kDa aufweist (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 1999).

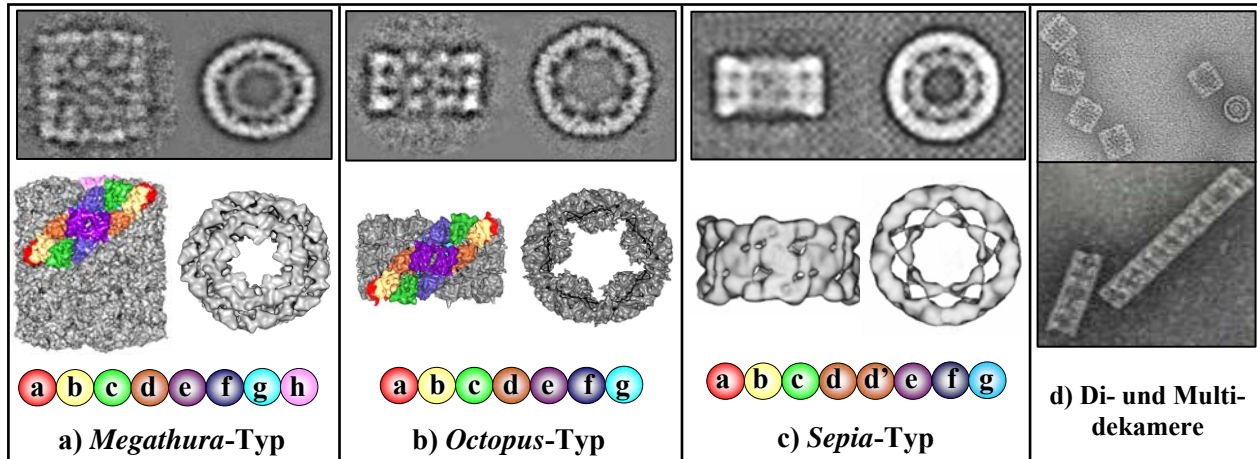


Abb. A2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen des Hämocyanins verschiedener Mollusken-Hämocyanine sowie deren Organisation der Untereinheiten.

Die Quartärstruktur des Gastropoden-Hämocyanins vom *Megathura*-Typ ist ein Didekamer (a). Jede UE besteht aus jeweils acht FUs, wobei die FUs a – f die Wand des Dekamers formen und die FUs-g und -h den Kragen jedes asymmetrischen Dekamers bilden. Das Hämocyanin der Cephalopoden kommt ausschließlich in Form von symmetrischen Dekameren vor (b, c). Beim *Octopus*-Typ mit nur sieben FUs je Untereinheit, existiert aufgrund der fehlenden FU-h nur ein zentraler Kragen, der von den FUs-g gebildet wird (b). Auch beim *Sepia*-Typ fehlt die FU-h, allerdings resultierte eine Verdopplung der FU-d in einer Untereinheit mit ebenfalls acht FUs (c). Der Kragen unterscheidet sich deutlich von dem dargestellten *Octopus*-Typ. Bei einigen Gastropoden existieren neben Didekameren zusätzlich tubuläre Multidekamere (d). Die Farbgebung der einzelnen FUs in der schematischen Darstellung der UE in a) und b) entspricht der jeweiligen Anordnung der FUs innerhalb der UE-Dimere der 3D-Modelle. 3D-Rekonstruktionen: a) von [REDACTED], AG [REDACTED]; b) und c) verändert nach Gatsogiannis *et al.*, 2007; Mouche *et al.*, 1999; Boisset & Mouche, 2000).

Der Verlust der FU-h bei den Cephalopoden geht mit großer Wahrscheinlichkeit aus einem sekundären Verlust hervor. Dieser Typ des Cephalopoden-Hämocyanins zeichnet sich zudem durch sein Unvermögen aus, stabile Untereinheiten-Dimere zu bilden (Bonaventura *et al.*, 1981; Van Holde & Miller, 1985). Die FUs a-f der Gastropoden weisen innerhalb der Untereinheiten-Dimere aufgrund der sterischen Anordnung der Wanddomänen eine scheinbare zweifache Symmetrie auf. Da dies bei den kragenbildenden Domänen g und h nicht der Fall ist, erscheint deren Dekamer als asymmetrisches Molekül mit einem geschlossenen pentameren Ring als Kragen und einer offenen Seite gegenüber (Harris *et al.*, 1992; Orlova *et al.*, 1997; Meissner *et al.*, 2000, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Beim Hämocyanin vom *Octopus*-Typ ohne die FU-h, wird der Kragenkomplex nur von der FU-g geformt (Abb. A2 b). Da diese zentral im Dekamer sitzt, zeigt das Molekül eine symmetrische Quartärstruktur mit äußerer Zylinderwand und zentralem Kragen (Lamy *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1994, 1995a; Mouche *et al.*, 1999). Bei beiden Tierklassen kommt es zu einer Dimerbildung der FUs g bzw. h innerhalb eines Untereinheitendimers, wobei fünf dieser Dimere an der Ausbildung des gesamten Kragenkomplexes beteiligt sind. Die Ordnungen der Cephalopoden-Unterklasse Coleoidea zeigen wiederum ein anders Konzept der Dekamerbildung. Hier fehlt ebenfalls die FU-h, allerdings besteht jede Untereinheit dennoch aus acht

FUs, wobei der zentrale Kragen von zwei FUs geformt wird (Abb. A2 c). Immunochemische Untersuchungen am Hämocyanin von *Sepia officinalis* (SoH) konnten eine immunologische Verwandtschaft der zusätzlichen FU mit der benachbarten Domäne SoH-d aufzeigen (Loncke *et al.*, 1990). Somit ist die zusätzliche Domäne von *Sepia* klar von den acht Domänen der Gastropoden zu unterscheiden. Sie ist vermutlich nach dem Verlust der FU-h innerhalb der Cephalopoden durch interne Verdopplung von SoH-d entstanden. Innerhalb der Gastropoden kann es bei Prosobranchia und Ophistobranchia aufgrund polarer und ionischer Bindungen zusätzlich zur Ausbildung sogenannter tubulärer **Multidekamere** kommen (Abb. A2 d). Hierbei besteht der Kern immer aus einem zentralen Didekamer, an das sich entweder an einer, oder auch an beiden Seiten zusätzliche Dekamere mit ihrem offenen Ende anlagern (Fernandez-Moran *et al.*, 1966; Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1979; Markl *et al.*, 1991a; Herskovits *et al.*, 1992; Lieb *et al.*, 2004).

4 Die Kristallstruktur der FU-g von *Octopus dofleini* und der FU-e von *Rapana thomasiana* hilft die Beziehung zwischen Struktur und Funktion zu verstehen

Die bisher verfügbaren Röntgenstrukturen der C-terminalen Kragendomäne FU-g von *Octopus dofleini* (Cuff *et al.*, 1998) sowie der Wanddomäne FU-e der Schnecke *Rapana thomasiana* (Perbandt *et al.*, 2003), liefern eine detaillierte Vorstellung über die räumliche Anordnung der Polypeptidkette und können zum Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und Funktion herangezogen werden. So können die Strukturen z.B. zur Aufklärung potenzieller Mechanismen der kooperativen Sauerstoffbindung beitragen. Aufgrund von Sequenzhomologien können die Modelle auch für alle anderen Domänen herangezogen werden, da nach Sander & Schneider (1991) strukturelle Homologie zwischen zwei Proteinen vorliegt, wenn die Ähnlichkeit der Sequenzen gleich oder höher der Homologieschwelle einer bestimmten Sequenzlänge ist. Dieses Kriterium trifft für die FU-g von *Octopus dofleini*, die im Vergleich mit den FUs anderer Mollusken-Hämocyanine eine Sequenzidentität von 42 % aufweist, auf jeden Fall zu (Lang & Van Holde, 1991).

Generell lassen sich die FUs der Mollusken-Hämocyanine in zwei strukturelle Domänen unterteilen: die N-terminale und hoch konservierte **α -helikale Kupferbindungsdomäne** des aktiven Zentrums, sowie eine C-terminale **fünfsträngige β -Sandwich-Domäne** (Abb. A3). Innerhalb des aktiven Zentrums findet die reversible Oxygenierung an den Kupferatomen (**CuA** und **CuB**) statt, welche durch jeweils 3 Histidine koordiniert werden. Der Sauerstoff bindet hierbei als Peroxid-Ion und Cu (I) wird zu Cu (II) oxidiert. Des Weiteren stabilisiert eine ungewöhnliche Cystein-Histidin-Bindung das zweite, mit dem CuA koordinierte Histidin, welches im Gegensatz zu den übrigen Histidinen des aktiven Zentrums nicht an einer starren α -Helix, sondern in einer flexiblen Schleife sitzt (Drexel *et al.*, 1987; Klabunde *et al.*, 1998; Halaouli *et al.*, 2006; Marusek *et al.*, 2006). Diese in der Natur seltene **Thioetherbrücke** existiert auch in den verwandten Catecholoxidasen, sowie den Tyrosinasen der Pilze, fehlt jedoch bei den Tyrosinase von Mensch, Maus, bei *Streptomyces castaneoglobisporus* sowie dem Arthropoden-Hämocyanin (Magnus *et al.*, 1994; Klabunde *et al.*, 1998; Garcia-

Borron & Solano, 2002; Matoba *et al.*, 2006; Schweikardt *et al.*, 2007). Die kovalente Bindung könnte an einer kooperativen Modulierung der Sauerstoffaffinität beteiligt sein und zur Stabilisierung der Konformation des binukleären Kupferzentrums beitragen (Gielens *et al.*, 1997, 2007; Schweikardt *et al.*, 2007). Die N-terminale Domäne enthält zudem zwei der insgesamt drei **Disulfidbrücken**, die in unmittelbarer Nähe zu den Histidinen liegen. Die erste Disulfidbrücke stabilisiert eine β - β -Haarnadelstruktur nahe der Kupferbindungsregion CuA. Die zweite heftet eine Schleifenregion an eine α -Helix an, die zwei der drei Histidine von CuB bereitstellt. Die dritte Disulfidbrücke ist im Bereich der C-terminalen β -Faltblatt-Domäne sichtbar (Abb. A3). Da letztere allerdings nicht in jeder FU vorhanden ist, scheint sie offenbar keine essenzielle Rolle bei der Sauerstoffbindung zu spielen (Topham *et al.*, 1999).

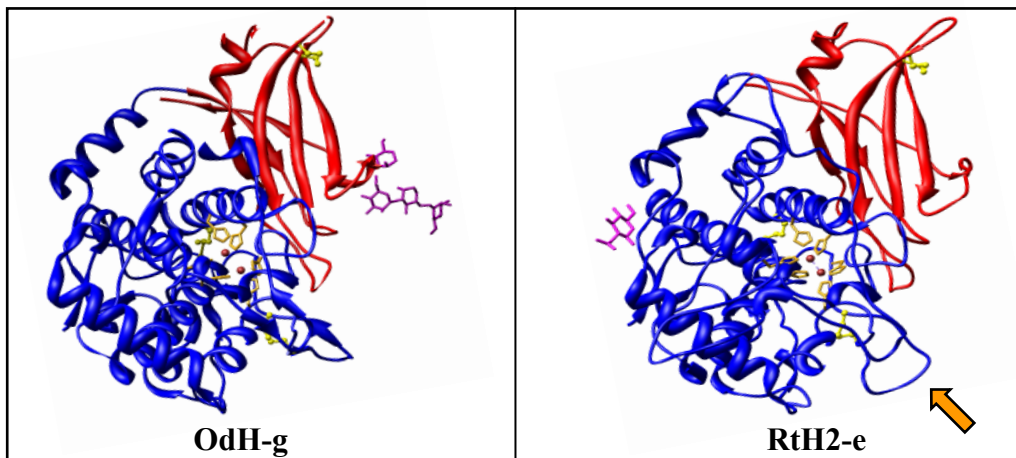


Abb. A3: Kristallstruktur von RtH2-e (*Rapana thomasi*) und OdH-g (*Octopus dofleini*).

Die N-terminale α -helikale Kupferbindungsdomäne ist blau dargestellt, die fünfsträngige β -Faltblattdomäne ist rot gekennzeichnet. Jedes Kupferatom (braun) wird im aktiven Zentrum durch drei Histidinreste (goldfarben) koordiniert. Die Cysteine der je drei Disulfidbrücken sind gelb markiert. OdH-g besitzt im Vergleich zu RtH2-e nur eine Asparagin-verknüpfte Glykosylierung (lila), die sich zudem an anderer Stelle befindet. Für RtH2-e ist nur einer der zwei Zuckerreste dargestellt. Ein weiterer Unterschied bei RtH2-e ist ein Loop in der Nähe des aktiven Zentrums (orangefarbener Pfeil). Dieser könnte eine Rolle bei der kooperativen Sauerstoffbindung spielen. (Nach Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1js8 und Perbandt *et al.*, 2003, PDB-ID-Code: 1lnl).

Der gesamte Zweidomänen-Komplex einer FU wird durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen sowie einer Salzbrücke aufrechterhalten und stabilisiert. Trotz großer Sequenzhomologien zwischen den FUs von OdH-g und RtH2-e, gibt es dennoch einige markante Unterschiede zwischen beiden Kristallstrukturen. Die auffälligste Besonderheit ist wohl die Art der Kristallisation: OdH-g formt Dimere innerhalb einer asymmetrischen Einheit, während es bei RtH2-e sogar zu einer Zusammenlagerung zu Trimeren kommt. Dies könnte einen Hinweis auf die strukturelle Organisation der FUs innerhalb des nativen Hämocyaninmoleküls liefern, wo z.B. die Kragendomänen OdH-g von fünf ebensolcher Dimere gebildet wird. Auffällig in diesem Zusammenhang ist bei RtH2-e das Vorkommen einer Metallionenbindungsstelle, welche die einzelnen Protomere innerhalb des Trimers verbindet. Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass RtH2-e in der *Deoxy*-Form kristallisiert wurde, während die Röntgenstruktur von OdH-g oxygeniert vorliegt. So konnte bei der deoxygenierten FU von *Rapana* ein Tunnel detektiert werden, der direkt von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum führt und somit auf eine mögliche Funktion bei der

Sauerstoffbindung schließen lässt (Perbandt *et al.*, 2003). So könnte die Sauerstoffbindung eine Konformationsänderung induzieren, wodurch die Zugänglichkeit zum katalytischen Zentrum, z.B. durch Schließung des Kanals, erschwert wird. Für Arthropoden-Hämocyanine konnte eine solche Konformationsänderung nach Sauerstoffbindung bereits spektroskopisch nachgewiesen werden (Makino, 1987; Leidescher & Decker, 1990). Bezüglich der Konformation eines Loops (Aminosäuren 47 - 62) unterscheiden sich die OdH-g bzw. RtH2-e ebenfalls (Abb. A3). So befindet sich dieser bei RtH2-e in der Nähe des aktiven Zentrums und wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, die wiederum in der Nachbarschaft der Thioetherbrücke orientiert ist. Dieser Loop könnte somit eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums, gesteuert durch die Disulfidbrücke sowie die Thioetherbrücke, induzieren (Perbandt *et al.*, 2003). Der letzte Unterschied betrifft die Anzahl und Stellen der Glykosilierungen. RtH2-e besitzt mit einem zweiten N-glykosidisch gebundenen Zucker einen höheren Kohlenhydratanteil (1,1 %) als OdH-g mit nur einem Zucker (Stoeva *et al.*, 2002).

5 Hämocyanine besitzen ähnliche aktive Zentren wie Tyrosinasen und Catecholoxidasen

Trotz der unterschiedlichen physiologischen Funktion von Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Hämocyaninen, besitzen sie alle ein ähnliches aktives Zentrum (Himmelwright *et al.*, 1980; Hazes *et al.*, 1993; Magnus *et al.*, 1994; Van Gelder *et al.*, 1997; Klabunde *et al.*, 1998; Cuff *et al.*, 1998; Decker & Tuczec, 2000; Decker *et al.*, 2001; Van Holde *et al.*, 2001; Perbandt *et al.*, 2003; Decker & Jaenicke, 2004; Chen & Solomon, 2004; Decker 2005; Matoba *et al.*, 2006; Claus & Decker, 2006). Während Hämocyanine jedoch als Sauerstofftransportproteine dienen, katalysieren die Tyrosinasen und Catecholoxidasen die Hydroxylierung von Monophenolen bzw. die Oxidation von *ortho(o)*-Diphenolen zu *o*-Chinonen, oder beides (Abb. A5). Tyrosinasen sind in allen Organismenreichen von Bakterien bis hin zum Menschen vorzufinden und katalysieren dort die Melaninsynthese (Riley 1997, 1999, 2003; Land & Riley, 2000; Land *et al.*, 2003; Sugumaran, 2002; Claus & Decker, 2006). Letzteres ist für die bräunliche Färbung sowohl der menschlichen Haut, der Haare als auch der Früchte verantwortlich. Aufgrund der fungistatischen, bakteriostatischen und antiviralen Eigenschaften, kann Melanin und dessen Zwischenprodukten, speziell bei Arthropoden, eine Beteiligung an der primären Immunabwehr und der Wundheilung zugeschrieben werden (Montefiori & Zhou, 1991; Ashida & Brey, 1995; Marmaras *et al.*, 1996; Sidibe *et al.*, 1996; Sugumaran, 1996; Johansson & Söderhäll, 1996; Söderhäll & Cerenius, 1998; Nagai & Kawabata, 2000; Sugumaran, 2002; Adachi *et al.*, 2005; Nillius, 2007). Zudem dienen die von der Tyrosinase produzierten und hoch reaktiven Chinone, der Sklerotisierung der Proteinmatrix von Arthropoden nach der Häutung (Andersen *et al.*, 1996; Sugumaran *et al.*, 1987; Sugumaran, 1998, 2002). Sowohl bei den Enzymen, als auch bei den Hämocyaninen handelt es sich um Typ III-Kupferproteine mit zwei Kupferatomen im aktiven Zentrum (Matoba *et al.*, 2006). Vergleiche auf Sequenzebene konnten zeigen, dass man die höchste

Konservierung innerhalb der Kupferbindungsdomäne findet (Van Gelder *et al.*, 1997), allerdings zeigen auch die Röntgenstrukturen viele deckungsgleiche Regionen (Abb. A4 a). Einen weiteren Hinweis auf die enge Verwandtschaft findet man in der schwachen Catecholoxidase-Aktivität des Hämocyanins einiger Mollusken und Arthropoden (Kap. A8).

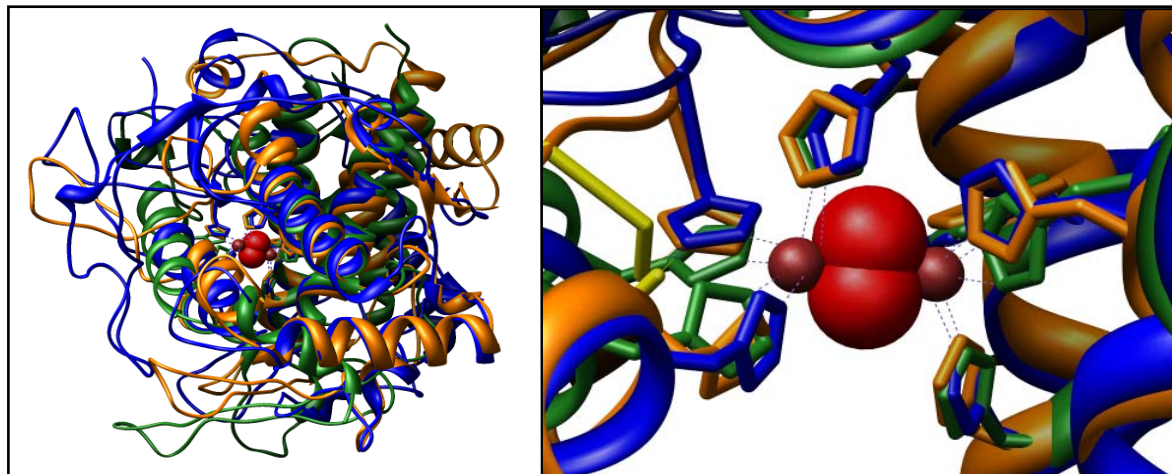


Abb. A4: Vergleich der Röntgenstrukturen dreier Typ III-Kupferproteine.

Links sind die Röntgenstrukturen der Catecholoxidase von *Ipomoea batatas* (blau) sowie des Hämocyanins des Arthropoden *Limulus polyphemus* (grün) und des Mollusken *Octopus vulgaris* (orange) dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber sind bei den Hämocyaninen nur die α -helikalen Kupferbindungsdomänen dargestellt. Die Abbildung rechts zeigt die hoch konservierten aktiven Zentren der drei Typ III-Kupferproteine. Die Kupferatome sind braun, der gebundene Sauerstoff rot und die Cysteine der Thioetherbrücken von *Octopus vulgaris* und *Ipomoea batatas* gelb dargestellt. (Nach Hazes *et al.*, 1993, PDB-ID-Code: 1nol; Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1js8; Klabunde *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1bt3).

6 Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen

Tyrosinasen katalysieren zwei enzymatische Reaktionsschritte, die an der Melaninbildung, der sogenannten **Melanogenese** (Kap. A7), beteiligt sind. Der erste Reaktionsschritt besteht aus der *ortho*-(*o*)-Hydroxylierung monophenolischer Substrate, wie des namensgebenden Tyrosins, zu den entsprechenden *o*-Diphenolen (Abb. A5). Bei dieser Reaktion wird molekularer Sauerstoff verbraucht. Aufgrund des ersten Reaktionsschrittes werden Tyrosinasen auch als **Monooxygenasen** (EC 1.14.18.1), **Cresolasen** oder allgemeiner als **Monophenolasen** bzw. **Monophenolhydroxylasen** klassifiziert. Zum nachfolgenden zweiten Reaktionsschritt sind auch Catecholoxidasen befähigt. Hierbei werden die *o*-Diphenole, ebenfalls unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff, zu *o*-Dichinonen oxidiert (Abb. A5). Diese Umsetzung wird entsprechend als **Diphenoloxidase**-, **Diphenolase**- (EC 1.10.3.1) oder auch **Catechol(oxid)ase**-Aktivität bezeichnet.

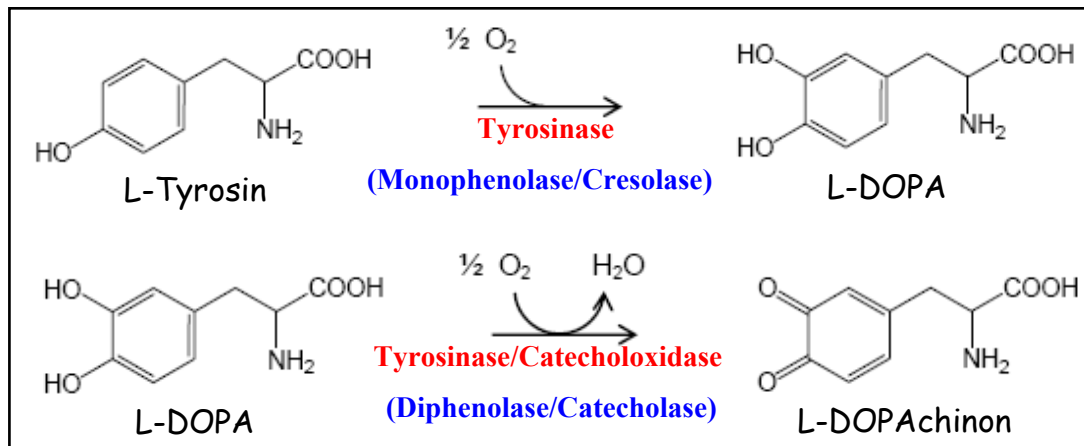


Abb. A5: Reaktionen der Tyrosinasen und Catecholoxidasen.

Monophenolische Substrate wie L-Tyrosin werden von Tyrosinasen durch eine *o*-Hydroxylierung zum entsprechenden *o*-Diphenol (hier zum L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umgewandelt (Monophenolase-/Cresolase-Aktivität). Anschließend erfolgt im zweiten Katalyseschritt (Diphenolase-/Catecholase-Aktivität) die weitere Oxidation zum L-DOPAchinon (4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon). In beiden Reaktionen wird molekularer Sauerstoff verbraucht. Catecholoxidasen können lediglich die Oxidation der *o*-Diphenole zu *o*-Dichinonen katalysieren.

Dass Tyrosinasen im Gegensatz zu Catecholoxidasen auch zur Hydroxylierung von Monophenolen befähigt sind, ist in evolutionären Adaptionen und kleineren strukturellen Änderungen des aktiven Zentrums der Tyrosinasen begründet (Klabunde *et al.*, 1998). So konnte die kürzlich veröffentlichte Röntgenstruktur der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* eine größere Lücke direkt über dem aktiven Zentrum der Tyrosinase aufzeigen, wobei der Zugang bzw. die Umsetzung des monophenolischen Substrats durch eine in das aktive Zentrum ragende Tyrosinseitenkette (Tyr98) des sogenannten „*caddie*-Proteins“ **ORF378** (Abb. A8 c) reguliert wird (Matoba *et al.*, 2006). Dieser Tyrosinrest entgeht wiederum einer Hydroxylierungsreaktion, da alle seine Atome mehr als 3,4 Å vom Cu_2O_2 -Zentrum entfernt sind und eine weitere Annäherung zum aktiven Zentrum durch die Bindung des *caddie*-Proteins unterbunden wird. Dieses Hilfsprotein besitzt ein sechssträngiges β -Faltblatt sowie eine α -Helix und verfügt über strukturelle Ähnlichkeit mit SH2-Domänen. ORF378 unterstützt als Chaperon die Faltung und dient wahrscheinlich dem Transport von Cu(II)-Ionen in das katalytische Zentrum der kupferlosen Apotyrosinase (Chen *et al.*, 1992, 1993, Matoba *et al.*, 2006). Auch eine außerordentliche Flexibilität einer der sechs Histidinliganten im aktiven Zentrum, sowie deren mögliche Beteiligung an der Katalyse wurde von Matoba *et al.* (2006) diskutiert, scheint aber nicht zwingend zu sein (Claus & Decker, 2006; Schweikardt *et al.*, 2007). Bei der Catecholoxidase sowie den Mollusken-Hämocyaninen wird die Freigängigkeit eines vergleichbaren Histidins hingegen durch die zusätzliche Thioetherbrücke unterbunden. Bezüglich der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Tyrosinase-Aktivierung sowie deren katalysierter Reaktion wurden in der Vergangenheit bereits einige Modelle postuliert (Mason, 1956; Vanneste & Zuberbühler, 1974; Wilcox *et al.*, 1985; Cabanes *et al.*, 1987; Naish-Byfield & Riley, 1992; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Decker & Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2000, 2006, 2007a). Ein experimenteller Nachweis fehlte jedoch bis zuletzt. Eine erste Annäherung ergibt sich durch die nun

verfügbare Röntgenstruktur der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*. Auf der Basis der verschiedenen Kristallstrukturen (apo, oxy, deoxy, met I, met II) konnte eine gute molekulare Erklärung der Aktivierung und Katalyse der Tyrosinase gefunden werden (Decker *et al.*, 2006, 2007a). Im Gegensatz zu den früheren Modellen erfolgt die katalytische Umsetzung von Monophenolen zu o-Chinonen hierbei in einem Schritt, ohne dass ein Zwischenprodukt entsteht. Ein Problem besteht darin, neben den beiden Enzymreaktionen (Mono- und Diphenolase-Aktivität), auch die beim Monophenolumsatz auftretende *Lagphase* zu erklären. Solomon *et al.* (1996) sowie Tepper *et al.* (2005) schlugen diesbezüglich ein neues Modell vor, welches in Abb. A6 dargestellt ist.

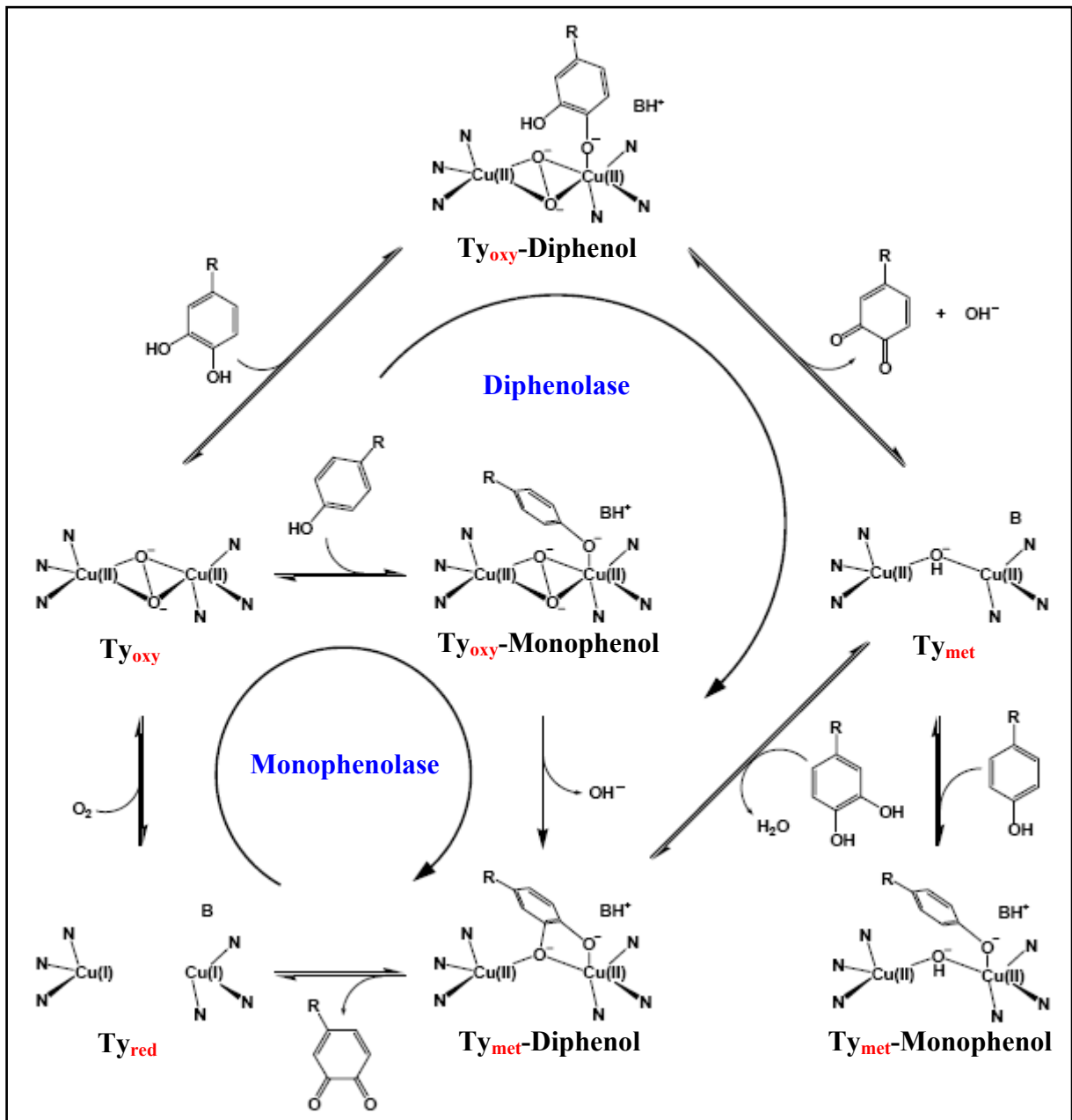


Abb. A6: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Tyrosinase.

Die Substratbindung kann sowohl am CuB (rechts), als auch am CuA erfolgen. Erläuterungen im Text. (verändert nach dem Modell von Tepper *et al.*, 2005).

Ausgangspunkt des **Monophenolase-Zyklus** ist die Bindung von molekularem Sauerstoff an das reduzierte Kupferzentrum der Tyrosinase (Ty_{red}), das als Folge oxyniert wird (Ty_{oxy}). Nun kann monophenolisches Substrat mit der Hydroxylgruppe an eines der Kupferatome (in Abb. A6 CuB) binden (Ty_{oxy} -Monophenol). Die Ausrichtung des aromatischen Rings des Substrates erfolgt dabei so, dass durch die Abgabe eines Protons der Hydroxylgruppe an eine Base (B), ein Sauerstoffatom des Peroxids auf das Substrat übertragen werden kann. Das gebildete Diphenol kann nun entweder abdissoziieren oder weiter zum Dichinon oxidiert werden. Bei letzterem liegt das aktive Zentrum wieder im reduzierten Zustand vor. Der intermediär entstandene *met*-Diphenol-Komplex zeichnet sich durch eine Verbrückung der beiden Kupferatome mittels des *o*-Sauerstoffs des Phenols aus. Dessen Existenz konnte bereits mehrfach experimentell belegt werden (Van Gastel *et al.*, 2000; Tepper *et al.*, 2002; Bubacco *et al.*, 2003) und steht im Widerspruch zu der von Wilcox *et al.* (1985), Sánchez-Ferrer *et al.* (1995) und Solomon *et al.* (1996) beschriebenen Annahme, dass die Verbrückung der beiden Kupferatome über ein für die *met*-Form typisches Hydroxid-Ion erfolgt. Auch wenn nach Decker *et al.* (2000, 2006) eine Interaktion des monophenolischen Substrats mit der CuA-Site postuliert wurde und dessen Koordination anhand von synthetischen Kupfer-Komplexen belegt werden konnte (Battaini *et al.*, 2003), ist dies dennoch mit dem Modell von Tepper *et al.* (2005) vereinbar, da die grundsätzliche Forderung der unmittelbaren Umsetzung von Monophenolen zu Dichinonen über ein *oxy*-Monophenol-Intermediat (Ty_{oxy} -Monophenol) gewährleistet ist. Somit kann auf die Unterteilung der Tyrosinase-Reaktion in zwei aufeinander folgende Schritte aus Monophenolhydroxylierung und Diphenoloxidation verzichtet werden, da die Umsetzung vielmehr in einem Schritt verläuft, ohne ein Intermediat zu entlassen. Die nur bei der Umsetzung von Monophenolen kinetisch feststellbare *Lagphase* (Lerner *et al.*, 1949; Cabanes *et al.*, 1987; Cooksey *et al.*, 1997) lässt sich durch die Bildung eines sogenannten "dead end"-Komplexes erklären. Dieser resultiert aus der Bindung von Monophenolen an die *met*-Form der Tyrosinase (Ty_{met} -Monophenol), wo keine Hydroxylierungsreaktion stattfinden kann (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Da die Tyrosinase unter Standardbedingungen zu 85 – 90 % in der *met*-Form vorliegt (Jolley *et al.*, 1974; Tepper, 2005), kann das Enzym nur die Umsetzung geringer Mengen an Monophenol katalysieren. Der *steady state* tritt hierdurch erst mit der Verzögerung von mehreren Minuten ein und wird erst durch die entstehenden Diphenole eingeleitet, da diese die *met*-Form in die reduzierte Form überführen können und somit eine erneute Sauerstoffbindung sowie den Monophenolumsatz ermöglichen. Die Dauer der *Lagphase* ist abhängig von der Enzym- und Monophenolkonzentration (Duckworth *et al.*, 1970; García-Cánovas *et al.*, 1981) und kann durch die Anwesenheit katalytischer Mengen an *o*-Diphenol oder Metall-Ionen wie Fe^{2+} verkürzt oder sogar vollständig aufgehoben werden (Palumbo *et al.*, 1985; Ros *et al.*, 1993). Der **Diphenolase-Zyklus** startet ebenfalls mit der Bindung von Sauerstoff, gefolgt von der Wechselwirkung des Diphenols mit dem Kupferzentrum der Tyrosinase (Ty_{oxy} -Diphenol). Das Diphenol wird hierbei durch eine Zweielektronenübertragung oxidiert und das gebildete Dichinon dissoziiert ab. Das Kupferzentrum verbleibt mit einem verbrückenden Hydroxid-Ion

in der *met*-Form (Ty_{met}) und kann erneut ein zweites Diphenol binden (Ty_{met}-Diphenol), welches ebenfalls unter Wasserabspaltung zum Dichinon oxidiert wird. Somit schließt sich der Kreis mit der Reduktion des Kupferzentrums (Ty_{red}) und ein neuer Zyklus kann mit der Bindung molekularen Sauerstoffs beginnen. In der Gesamtbilanz werden zwei *o*-Diphenole zu zwei *o*-Dichinonen oxidiert, wobei ein Molekül Sauerstoff über den Transfer von vier Elektronen zu zwei Molekülen Wasser reduziert wird (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Für den Diphenol-Umsatz der Catecholoxidase lässt sich das hier dargestellte Modell prinzipiell auch anwenden, wobei sich die fehlende Monophenolase-Aktivität durch ein dem Substrat analoges **Phe261** erklären lässt, welches den Zugang monophenolischer Substrate zum CuA im aktiven Zentrum blockiert (Klabunde *et al.*, 1998, Decker & Tuczec, 2000; Decker *et al.*, 2006). Dieser Sachverhalt stützt zwar die These, dass die Hydroxylierung der Monophenole durch eine Bindung am CuA erfolgt, allerdings lassen die Kristallstrukturen der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* auch die Möglichkeit offen, dass Monophenole zur Hydroxylierung an CuB binden. Ein Vergleich mit der Röntgenstruktur der Catecholoxidase, sowie der hypothetischen Struktur von aktiviertem Hämocyanin lassen jedoch nur den Schluss zu, dass die Hydroxylgruppe der Monophenole am CuA binden muss (Klabunde *et al.*, 1998; Gerdemann *et al.*, 2002b; Decker *et al.*, 2006). Da somit selbst die Kristallstrukturen der aktiven Zentren bisher keinen eindeutigen Hinweis auf den Katalysemechanismus der Tyrosinase liefern, bleibt die Klärung dieses Sachverhaltes noch aus und ist weiterhin Gegenstand aktueller Studien (Decker *et al.*, 2006; Hernández-Romero *et al.*, 2006).

7 Die Melanogenese

Melanin kommt als weit verbreitetes Pigment in vielen Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor. Das Molekül ist ein strukturell inhomogenes, polyphenolisches Biopolymer und besitzt neben der Farbgebung zahlreiche physiologische Funktionen, wie dem Schutz vor UV-Strahlung und toxischen freien Radikalen. Der Ablauf der Melaninbiosynthese ist in Abb. A7 in Anlehnung an Jiménez-Cervantes *et al.* (1994), Kobayashi *et al.* (1995) und Sánchez-Ferrer *et al.* (1995) zusammenfassend schematisch dargestellt. Den limitierenden Schritt der **Melanogenese** stellt die von der Tyrosinase katalysierte Bildung von DOPACHINON aus DOPA bzw. Tyrosin dar (Abb. A5). Die nachfolgenden chemischen und enzymatischen Reaktionen wurden erstmals bereits von Raper (1928), Lerner *et al.* (1949) und Mason (1965) beschrieben und lassen sich in eine proximale und eine distale Phase unterteilen.

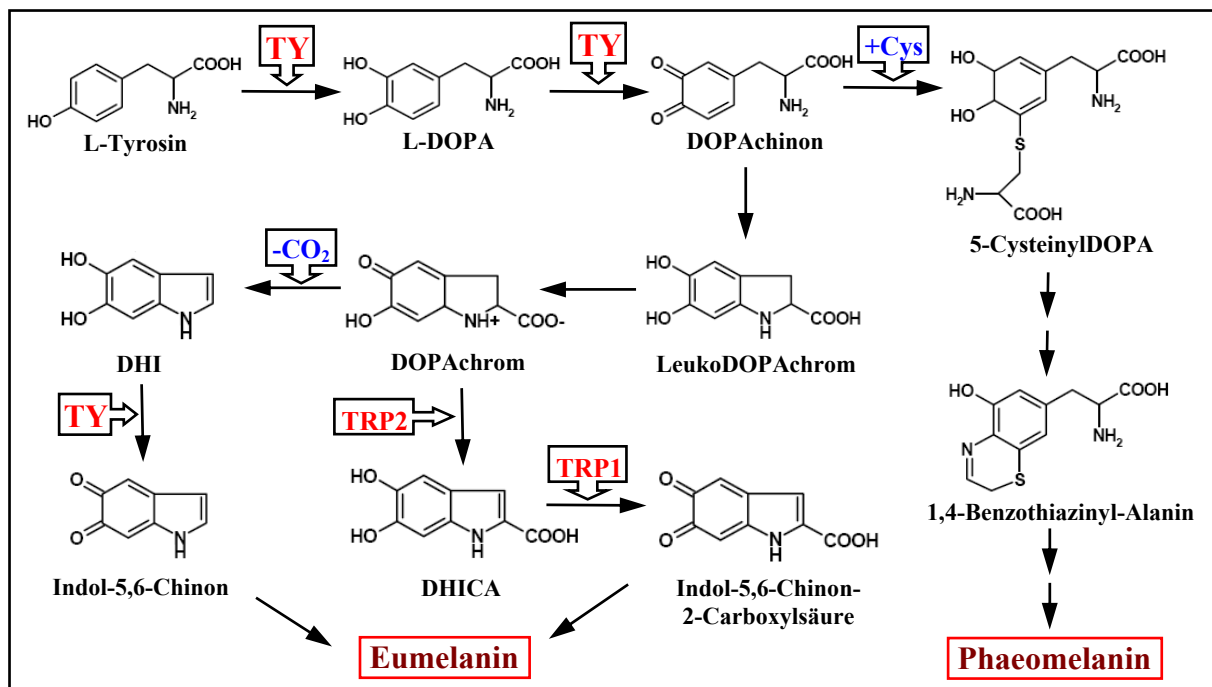


Abb. A7: Schematische Darstellung der Melaninbiosynthese am Beispiel des Substrats L-Tyrosin.

Cys: Cystein; DHI: 5,6-Dihydroxyindol; *DHICA*: 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure; *DOPA*: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin; *DOPAchion*: 4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon; *DOPAchrom*: 2-Carboxy-2,3-Dihydroxyindolen-5,6-Chinon; *LeukoDOPAchrom*: 2,3-Dihydro-5,6-Dihydroxyindolen-2-Carboxylat; *TRP-1*: Tyrosinase related protein 1, *DHICA*-Oxidase; *TRP-2*: Tyrosinase related protein 2, *DOPAchrom*-Tautomerase; *TY*: Tyrosinase. Erläuterungen im Text. Verändert nach Kobayashi *et al.*, 1995.

Die **proximale Phase** zeichnet sich durch eine spontane Zyklisierung des von der Tyrosinase gebildeten *o*-DOPAchions zum instabilen LeukoDOPAchrom aus. Letzteres wird hierbei schnell autokatalytisch zum Endprodukt dieser Phase, dem DOPAchrom oxidiert (Graham und Jeffs, 1977; Land *et al.*, 2003). Dieser Reaktionsweg wird durch ein alkalisches bis neutrales Milieu begünstigt, während ein saurer pH-Wert die Protonierung der Aminogruppe des DOPAchions fördert und dadurch den notwendigen Ringschluss zur Bildung des LeukoDOPAchroms erschwert. Auch die Bildung von DOPAchrom aus LeukoDOPAchrom wird beeinträchtigt, da die hierfür notwendige Deprotonierung der Hydroxylgruppe im sauren Milieu größtenteils verhindert wird (García-Cánovas *et al.*, 1982). Vielmehr verläuft die Bildung des DOPAchroms auf einem Umweg über 2,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA) (Graham und Jeffs, 1977; Rodríguez-López *et al.*, 1992a, b; Land & Riley, 2000; Sugumaran, 2002; Garcia-Borrón & Solano, 2002; Land *et al.*, 2003).

Die auf die DOPAchrom-Bildung folgenden Reaktionsschritte der **distalen Phase** beginnen mit einer langsamen Decarboxylierung von DOPAchrom zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) sowie der nachfolgenden, erneut von der Tyrosinase katalysierten Oxidation zu Indol-5,6-Chinon. Ein alternativer Reaktionsweg besteht in der Umwandlung von DOPAchrom in Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure (DHICA) (Aroca *et al.*, 1990; Pawelek, 1991; Jackson *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1992). Dieser Schritt wird von einer DOPAchrom-Tautomerase katalysiert, die aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit mit der Sequenz und Tertiärstruktur der Tyrosinase auch als *Tyrosinase related protein 2* (TRP2) bezeichnet wird. DHICA wird von TRP1, einer DHICA-Oxidase, nachfolgend zu Indol-5,6-Chinon-2-Carboxylsäure oxidiert (Jiménez-Cervantes *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994) und diese polymerisiert zusammen mit Indol-

5,6-Chinon spontan zu den hochmolekularen braun-schwarzen **Eumelaninen**. Sugumaran (1991) konnte zeigen, dass bei Invertebraten wie Insekten neben der Tyrosinase auch eine DOPAchrom-Isomerase an der Melaninbildung beteiligt ist. Sie katalysiert die Bildung von DHI aus DOPAchrom über ein Chinonmethid-Intermediat (Sugumaran, 1991; Sugumaran & Semensi, 1991). Durch eine nichtenzymatische Addition von Cystein oder Glutathion an DOPAchinon kommt es als weiterem Reaktionsschritt zur Bildung der gelb bis rot-braunen **Phaeomelanine**. Zunächst bildet sich bevorzugt 5-CysteinylDOPA (Jara *et al.*, 1988), das durch die Tyrosinase zu CysteinylDOPAchinon oxidiert wird. Eine Zyklisierung zu Benzothiazinyl-Alanin, gefolgt von weiteren Umformungsschritten, resultiert nach Polymerisation schließlich in den Phaeomelaninen (Ozeki *et al.*, 1997, Land & Riley, 2000). Zur Klärung der Entstehung der Diversität von Haut- und Haarfarben existieren bei den Autoren bis heute verschiedene Theorien. So könnte dies in einer Mischung der braun-schwarzen Melanine und der gelben bis rötlich-braunen Phaeomelanine begründet liegen (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Ito, 2003) oder auch aus einer unterschiedlichen strukturellen Integrität nur eines Melanintyps resultieren (Prota, 2000). Je nach Ausgangssubstrat der Melanogenese unterscheiden einige Autoren die Eumelanine von den ebenfalls meist schwarzen **Allomelaninen**. Die Biosynthese der letzteren geht hierbei von unterschiedlichen Monophenolen, wie z.B. Catechol, aus (Rescigno *et al.* 2002).

8 **Hämocyanine können nach Aktivierung Catecholoxidase- und sogar Tyrosinase-Aktivität zeigen**

Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken besitzen zwar die gleiche Funktion als Sauerstoff-Transportproteine, zeigen allerdings aufgrund ihrer unterschiedlichen evolutionären Abstammung und den daraus resultierenden verschiedenen Quartärstrukturen, Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Catecholoxidase- bzw. Tyrosinase-Aktivität aktiviert zu werden. Daher soll im Folgenden etwas detaillierter auf deren strukturellen Aufbau eingegangen werden. Jede der sechs sauerstoffbindenden Arthropoden-Untereinheiten je Hexamer (je ca. 72 kDa) besteht aus drei Domänen, mit einer zusätzlichen Domäne I mit 7 - 8 Helices (Gaykema *et al.*, 1984; Volbeda & Hol, 1989; Hazes *et al.*, 1993; Magnus *et al.*, 1994). Jede der 7 - 8 FUs einer Mollusken-Untereinheit (~ 50 kDa., Abb. A1) ist hingegen nur aus zwei Domänen aufgebaut (Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2003), die der Domäne II bzw. III des Arthropoden-Hämocyanins ähnlich sind (Abb. A8 a, b). Auch die Anordnung der Domänen zueinander ist unterschiedlich. Während der Zugang zum aktiven Zentrums des Arthropoden-Hämocyanins für Substrate der Catecholoxidase bzw. Tyrosinase von der N-terminalen Domäne I abgeschirmt wird, übernimmt diese Funktion beim Mollusken-Hämocyanin die C-terminale Domäne III (Jaenicke & Decker, 2004a). Die Hämocyanine beider Phyla sind jedoch Kupferproteine mit dem gleichen aktiven Zentrum in der Domäne II, zur reversiblen Bindung des Sauerstoffs in einer „Side-on“-Koordination ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$). Seit einiger Zeit sind auch die Röntgenstrukturen der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *Ipomoea batatas* (Klabunde *et al.*, 1998) sowie der Tyrosinase aus dem Bakterium

Streptomyces castaneoglobisporus (Matoba *et al.*, 2006) bekannt (Abb. A8 c, d). Bezüglich Sequenz (25 % Sequenzidentität) und Struktur des aktiven Zentrums zeigt die Catecholoxidase eine größere Ähnlichkeit mit dem Hämocyanin der Mollusken (Eicken *et al.*, 1999; Gerdemann *et al.*, 2002a, b; Jaenicke & Decker, 2004a; Decker *et al.*, 2007a, b). Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Catecholoxidasen und dem Mollusken-Hämocyanin ist die an einem der CuA koordinierten Histidine kovalent gebundene Thioetherbrücke (Claus & Decker, 2006). Im Gegensatz zu den Tyrosinasen ist die Catecholoxidase allerdings nur zu Oxidation von Diphenolen befähigt, wobei das Substrat beim aktivierten Enzym weitestgehend freien Zugang zum aktiven Zentrum der Domäne II, insbesondere zum CuB-Zentrum, hat (Abb. A8 d). Bezüglich der Aktivierung des Enzyms geht man von einer Regulation des Substratzugangs durch den aromatischen Ring des **Phe261** am CuA aus, wobei Substratannäherung oder pH-Wert-Änderungen eine Aktivierung induzieren können (Klabunde *et al.*, 1998; Decker *et al.*, 2000). Auch die Aktivierung durch Abspaltung eines C-terminalen Peptids der Catecholoxidase wurde diskutiert, die in der Entfernung eines **Leu439** aus dem aktiven Zentrum resultiert und so den Substratzugang ermöglicht (Gerdemann *et al.*, 2002b). Bei der Tyrosinase geht man von einer Regulation der enzymatischen Aktivität durch das sogenannte „caddie-Protein“ **ORF378** (Abb. A8 c) aus (Matoba *et al.*, 2006).

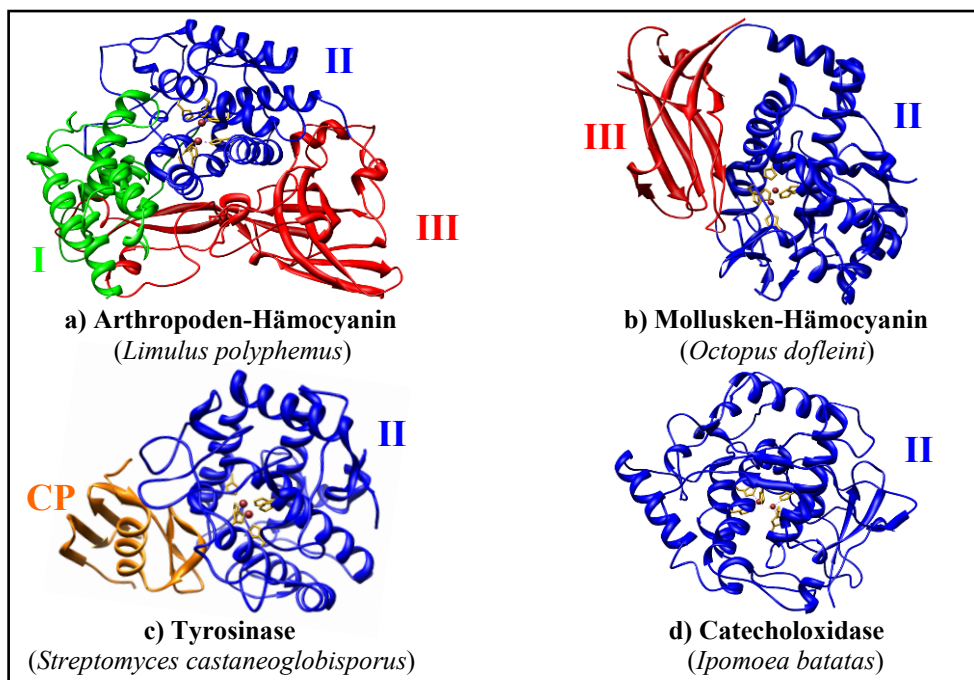


Abb. A8: Vergleich der Tertiärstrukturen von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin sowie Tyrosinase und Catecholoxidase.

Die Tertiärstrukturen der Hämocyanine von *Limulus polyphemus* (a), *Octopus dofleini* (b), der Tyrosinase von *Streptomyces castaneoglobisporus* (c) sowie der Catecholoxidase von *Ipomoea batatas* (d), sind hinsichtlich ihrer α -helikalen Kupferbindungsdomäne mit den zwei Kupferatomen (braun) im aktiven Zentrum orientiert. Die drei Domänen sind grün (Domäne I), blau (katalytische Domäne II) und rot (Domäne III) dargestellt. Die C-terminale Domäne III des Mollusken-Hämocyanins (b) nimmt die Position der N-terminalen Domäne I des Arthropoden-Hämocyanins (a) ein und blockiert auf ähnliche Weise den Substratzugang zum aktiven Zentrum. Bei der Tyrosinase (c) wird der Substratzugang vermutlich durch das sogenannte „caddie-Protein“ ORF378 (CP, orange) reguliert. Nach Aktivierung der Catecholoxidase (d) hat das Substrat freien Zugang zum aktiven Zentrum der Domäne II. (Nach Hazes *et al.*, 1993, PDB-ID-Code: 1nol; Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1js8; Matoba *et al.*, 2006, PDB-ID-Code: 1wx2; Klabunde *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1bt3).

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit des aktiven Zentrums innerhalb der Typ III-Kupferproteine (Abb. A4), sollten diese auch zur gleichen chemischen Reaktion befähigt sein: der reversible Bindung von Sauerstoff sowie der Umsetzung mono- und diphenolischer Substrate. Tyrosinasen und Catecholoxidasen (in Arthropoden gemeinsam als Phenoloxidasen bezeichnet) sind in den meisten Arthropoden vorzufinden. Mindestens zwei Typen von Phenoloxidasen können unterschieden werden (Van Holde & Miller, 1995; Durstewitz & Terwilliger, 1997; Van Gelder *et al.*, 1997; Jaenicke & Decker, 2004a). Der erste Typ (m-PO) ist bezüglich der generellen Struktur sowie des aktiven Zentrums näher mit dem Mollusken-Hämocyanin verwandt, während der zweite Typ (a-PO) dem Arthropoden-Hämocyanin sehr ähnlich ist und in Crustacean und andere Arthropoden zusammen mit dem Hämocyanin in der Hämolymphe vorkommt (Aspán *et al.*, 1995; Sritunyalucksana & Söderhäll, 2000; Burmester, 2002; Jaenicke & Decker, 2003; Terwilliger & Ryan, 2006). Bei Cheliceraten konnten diese Enzyme bisher jedoch noch nicht in der Hämolymphe nachgewiesen werden, weshalb man hier von einer etwaigen Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins nach einer *in vivo*-Aktivierung ausgeht. Diese könnte als Folge einer primären Immunabwehr erfolgen (Nagai & Kawabata, 2000; Adachi *et al.*, 2005; Nillius, 2007)). Auch eine Aktivierung des Arthropoden-Hämocyanins durch Gerinnungsfaktoren im Rahmen der Wundheilung konnte gezeigt werden (Nagai & Kawabata, 2000). Die Aktivierung der inaktiven Vorstufen der Phenoloxidasen in Arthropoden, den Prophenoloxidasen, kann durch zahlreiche *in vitro* Effektoren wie Detergenzien, Salze und Alkohole erfolgen (Ashida, 1990; Sugumaran & Kanost, 1993; Asada *et al.*, 1998). Auch für die *in vitro*-Aktivierung der Hämocyanine sind, je nach Tierstamm, bereits verschiedene Arten der Aktivierung etabliert (Abb. A9). So konnten eine Diphenolase- und teilweise auch eine Monophenolase-Aktivität bei zahlreichen Mollusken-, Arthropoden- und auch Crustaceen-Hämocyaninen induziert werden (Zlateva *et al.*, 1996; Salvato *et al.*, 1998; Decker & Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2001, 2003; Jaenicke & Decker 2004b; Pless *et al.*, 2003; Morioka *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006; Hristova *et al.*, 2007). Allerdings sind die Mono- bzw. Diphenolase-Aktivitäten hierbei bis zu 150-fach geringer als bei einer vergleichbaren *Mushroom*-Tyrosinase. Das Detergenz Dodecylsulfat (SDS) stellte sich in submizellaren Konzentrationen ebenfalls als sehr effektiver Aktivator heraus (Baird *et al.*, 2007). Man geht davon aus, dass eine SDS-Zugabe in einer leichten Entfaltung des Proteins resultiert und diese Konformationsänderung dem Substrat somit einen Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht, ohne letzteres zu zerstören (Dissertation Jaenicke, 2002; Abb. A9). Beim nativen Protein wird der Substratzugang hingegen durch bestimmte Aminosäuren der Domäne I bei Arthropoden bzw. der Domäne III bei Mollusken verhindert (Abb. A10). Änderungen des pH-Wertes könnten ebenfalls eine solche Konformationsänderung bewirken, wobei durch solche bereits eine *o*-Diphenol-oxidase- allerdings keine Tyrosinase-Aktivität gezeigt werden konnte (Salvato *et al.*, 1998). Auch eine Inkubation mit verschiedenen Proteasen, um die blockierenden Aminosäuren bzw. die Domänen abzuspalten, war erfolgreich bei der Induktion einer Tyrosinase- und Catecholoxidase-Aktivität (Rimke & Decker, 1997; Siddiqui

et al., 2004, 2006; Abb. A9 a). Morioka *et al.* (2006) konnte zudem für das Mollusken-Hämocyanin von *Octopus vulgaris* eine Tyrosinase-Aktivität nach Behandlung mit 10% Methanol in Gegenwart von 8 M Harnstoff zeigen, ohne hierbei eine unter diesen Bedingungen zu erwartende Denaturierung der Kupferbindungsdomäne oder eine Deoxygenierung herbeizuführen. Diese Ergebnisse konnten in der Dissertation von Nillius (2007) verifiziert werden.

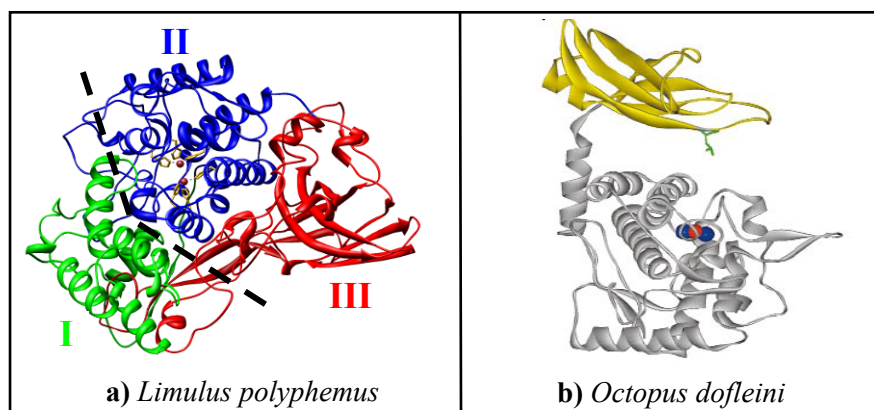


Abb. A9: Hypothetischer Mechanismus der Aktivierung von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin.
 a) Arthropoden-Hämocyanin (*Limulus polyphemus*) mit seinen drei Domänen (I, grün; II, blau; III, rot) wird durch limitierte proteolytische Spaltung mit Trypsin oder Chymotrypsin aktiviert. Hierbei wird Phe49 durch Abspaltung der N-terminalen Domäne I (grün) entlang der gestrichelten Linie aus dem aktiven Zentrum entfernt, um einen Substratzugang zu gewährleisten. b) Leu 2830 (grün) der C-terminalen, β -Sandwich-Domäne (gelb) der FU des Hämocyanins von *Octopus dofleini* wird durch Detergenzien wie SDS aus dem aktiven Zentrum herausgehoben, wodurch ein freier Zugang zur α -helikalen, N-terminalen Domäne (grau) geschaffen wird. Die Rotation der C-terminalen Domäne ist zur Verdeutlichung übertrieben dargestellt. (Röntgenstruktur *Limulus polyphemus* nach Hazes *et al.*, 1993, PDB-ID-Code: 1nol; verändert nach Decker & Tuczek, 2000).

Bei den molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung beteiligt sind, muss man zwischen dem Hämocyanin von Mollusken und Arthropoden unterscheiden. Bei *Limulus polyphemus* kommt es nach der Behandlung mit der Serinprotease Trypsin oder durch SDS-induzierte Konformationsänderungen, zur Entfernung eines Phenylalanins der N-terminalen Domäne I aus der Substrattasche im aktiven Zentrum. Dieses ist innerhalb der Hämocyanine und Phenoloxidasen hoch konserviert und dient bei letzteren als Platzhalter, wenn kein Substrat umgesetzt werden soll und erlaubt somit eine Regulation der enzymatischen Aktivität. Im Falle von *Limulus polyphemus* ist dies **Phe49** (Decker & Tuczek, 2000), was auch durch inhibitorische Studien belegt werden konnte (Daquinag *et al.*, 1999). Die Beweglichkeit des Phe49 ist hierbei durch hydrophobe Wechselwirkungen der Phenylgruppe mit dem axialen His328 am CuB sowie einem Thr351 am CuA begrenzt (Abb. A10 a).

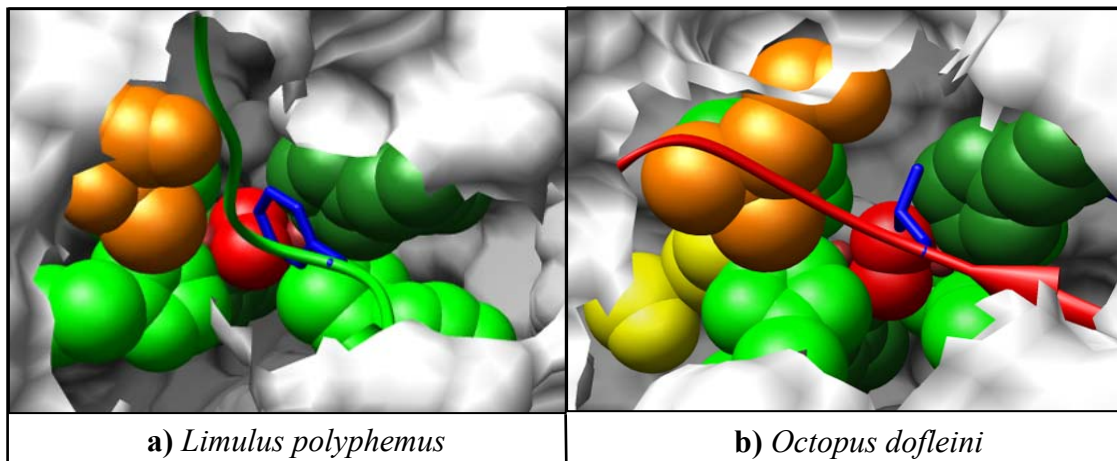


Abb. A10: Blockierung des Zugangs phenolischer Substrate zum katalytischen Zentrum von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen.

a) Blick in die Substratbindungstasche des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*. Der Eintritt phenolischer Substrate wird durch Phe49 (blau) der N-terminalen Domäne verhindert. Dessen Beweglichkeit wird u.a. durch hydrophobe Wechselwirkungen der Phenylgruppe mit einem Thr351 (orange) am CuA (links) unterbunden. b) Beim Hämocyanin von *Octopus vulgaris* existiert ein vergleichbarer Mechanismus, wobei hier Leu2830 (blau) der C-terminalen Domäne den Umsatz phenolischer Substrate blockiert. Die Arretierung des Leu2830 am CuA (links) erfolgt hier durch Leu2689 (orange). Axiale Histidine sind dunkelgrün, horizontale Histidine hellgrün dargestellt. Das Cystein der Thioetherbrücke von *Octopus vulgaris* ist gelb, die Kupferatome braun und der gebundene Sauerstoff rot gekennzeichnet. Bei den blockierenden Aminosäuren wurde ebenso wie bei den Proteingerüsten, an die diese Reste gebunden sind (grün bzw. rot), auf eine sphärische Darstellung verzichtet, um einen Blick in das aktive Zentrum zu gewährleisten. (Nach Hazes *et al.*, 1993, PDB-ID-Code: 1nol; Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1js8).

Ein vergleichbarer Mechanismus existiert für das Mollusken-Hämocyanin, was bei der ähnlichen Struktur der aktiven Zentren von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin sowie der Catecholoxidase nicht weiter überrascht (Decker *et al.*, 2000; Abb. A4). Die Röntgenstruktur der OdH-g gab einen Einblick in die hier beteiligten Mechanismen der Blockierung des aktiven Zentrums. So verwehrt **Leu2830** der C-terminalen Domäne III den Zugang des Substrats zum katalytischen Zentrum und bindet über Van der Waals-Bindung an His2562. Letzteres fixiert zudem Leu2830 durch hydrophobe Wechselwirkungen am CuB sowie Leu2689 am CuA (Abb. A10 b). Die C- sowie N-terminale Domäne II und III sind nur über einen C_{α} -Loop miteinander verbunden und werden durch hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen nichtkovalent stabilisiert. Detergenzien wie SDS können diese Interaktion leicht durch eine Aufwärts-Drehung der β -Sandwich-Domäne unterbrechen und so den Substratzugang zum aktiven Zentrum ermöglichen (Decker, 2005; Decker *et al.*, 2007a, b). Eine Konformationsänderung des Mollusken-Hämocyanins durch Änderungen des pH-Wertes könnte ebenfalls in der Induktion einer o-Diphenoloxidase-Aktivität resultieren. Von diesem Aktivierungsmechanismus geht man auch bei pflanzlichen Catecholoxidasen aus (Mayer & Harel, 1979; Van Gelder *et al.*, 1997; Salvato *et al.*, 1998). Beim Hämocyanin der Crustacean kann eine Phenoloxidase-Aktivität durch tryptische Spaltungen oder SDS induziert werden, was den Substratzugang zum katalytischen Zentrum durch Abspaltung oder Entfernung eines Phenylalanins ermöglicht (Decker & Tuzcek, 2000; Lee *et al.*, 2004; Olianias *et al.*, 2005).

9 *Hämocyanine zeigen eine mit dem Oligomerisierungszustand zunehmende thermische Stabilität*

Aufgrund der biologischen Bedeutung des Hämocyanins als Sauerstofftransporter und dessen Anwendung in der Medizin (Kap. A12), kommt der Molekülstabilität in Lösung sowie unter thermodynamischen, als auch chemischen Gesichtspunkten eine besondere Bedeutung zu. Bei den Mollusken-Hämocyaninen sind bezüglich Untereinheitenstruktur sowie der Anzahl und Anordnung der FUs bereits viele Details aufgeklärt und auch das Dissoziations- bzw. Reassoziationsverhalten ist bekannt (Markl *et al.*, 1991a; Van Holde & Miller, 1995; Harris *et al.*, 1995, 1998, 2000; Swerdlow *et al.*, 1996; Dolashka-Angelova *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2000, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften wie der Erhaltung des nativen Konformationszustand unter Hitzeeinwirkung, sind derzeit jedoch nur wenige Informationen verfügbar. Bisher konnte für alle Hämocyanine nachgewiesen werden, dass es sich bei den thermalen Denaturierungen stets um irreversible Kinetiken handelt und die Schmelzpunkte (T_m) sowie die Enthalpien für die Monomere niedriger ausfallen, als für die oligomeren Strukturen wie Hexamere oder Didekamere (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995; Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Idakieva *et al.*, 2005, 2006). Gründe für die kalorimetrisch irreversible Denaturierung sind vermutlich in dem Auftreten von Aggregationsformen, bedingt durch die extreme Molekülgröße der Hämocyanine, sowie einer irreversiblen Kupferdissoziation zu suchen (Klibanov & Ahern, 1987). Eine Abhängigkeit der Stabilität von der Präsenz des kupferhaltigen Sauerstoffbindungs-zentrums sowie vom Oxygenierungszustand und dem Vorkommen zweiwertiger Kationen wurde ebenfalls nachgewiesen (Sterner *et al.*, 1995; Parvanova *et al.*, 2000, 2003; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 1998, 2004; Idakieva *et al.* 2005). Während die Deoxygenierung sowie Entfernung des binukleären Kupferzentrums zu strukturellen Umordnungen innerhalb des Moleküls führen, die eine Stabilitätsabnahme bedingen, konnte Mg^{2+} und Ca^{2+} ein stabilitätsfördernder Effekt zugeschrieben werden. Die höhere Anzahl an Disulfidbrücken und eventuell vorhandene Glykosilierungen im oligomeren Hämocyanin, sind bezüglich einer erhöhten Thermostabilität ebenfalls nicht zu vernachlässigen (Albergoni *et al.*, 1972; Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Hristova *et al.*, 1997; Topham *et al.*, 1998, 1999; Georgieva *et al.*, 2004; Dolashki *et al.*, 2005). Für das hexamere (1 x 6-mer) Crustaceen-Hämocyanin von *Palinurus vulgaris* wurde die Denaturierung mittels Differenz Scanning-Kalorimetrie mit dem Modell einer zwei-Stufen-Kinetik beschrieben (Lumry *et al.*, 1954; Sánchez-Ruiz *et al.*, 1988), während man bei der Vogelspinne *Eurypelma californicum* aufgrund der sehr komplexen Struktur dieses 4 x 6-meren Arthropoden-Hämocyanins von einer komplexeren Entfaltung ausgeht (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995). Beide Proteine sind bezüglich ihrer thermischen Stabilität als Folge der Irreversibilität stark von der Scanrate abhängig. Eine außerordentliche Thermostabilität des 24-meren Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* zeigte sich

anhand eines sehr hohen Schmelzpunkts von 90 °C (Sterner *et al.* 1995). Erst oberhalb dieser Temperatur kam es zu einer Aggregation und irreversiblen Denaturierung des Proteins, so dass das 24-mere Hämocyanin unempfindlicher gegenüber Hitze war, als beispielsweise die 1 x 6-mere von *Palinurus vulgaris* mit einem T_m von 63 °C. Durch Dissoziation des Tarantel-Hämocyanins in seine Untereinheiten ergaben sich in Glycin-Puffer pH 9,6 ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} deutlich niedrigere Schmelzpunkte von 68,4 °C, der jedoch noch deutlich über dem T_m der Untereinheiten von *Palinurus vulgaris* mit nur 49,1 °C lag (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995). Die hohe thermische Stabilität des *Eurypelma*-Hämocyanins lässt sich somit als Ergebnis der erhöhten Stabilität der Untereinheiten in Verbindung mit dem hohen Oligomerisierungsgrad als 24-meres Protein verstehen. Letzteres kann vermutlich als Anpassung der homoiothermen Tiere an die extremen Umweltbedingungen in der Wüste angesehen werden, um somit selbst bei hohen Temperaturen noch eine Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Andererseits konnte eine vergleichbar hohe thermische Stabilität auch für Hämocyanin von *Homarus americanus* bestimmt werden (Hristova *et al.*, 1997), obwohl diese Tiere nicht solch hohen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind. Die im Vergleich zu *Palinurus vulgaris* höhere Stabilität lässt sich hier jedoch mit dem ebenfalls höheren Oligomerisierungsgrad des Hämocyanins in Form von 2 x 6-meren erklären. Die Wahl des Puffersystems hatte beim Hämocyanin von *Eurypelma californicum* ebenfalls einen Einfluss bezüglich der beobachteten thermischen Stabilität. So wurde gezeigt, dass Tris als allosterischer Effektor wirkt und einen stabilitätsfördernden Einfluss hat (Sterner *et al.*, 1994). Auch die Konformationsstabilität des Gastropoden-Hämocyanins von *Rapana thomasi*, *Helix pomatia* und *Megathura crenulata* wurde während der Erhitzung mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie genauer untersucht (Dolashka *et al.*, 1996; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Dolashki *et al.*, 2005; Idakieva *et al.* 2006). Hierbei konnte für die Apo-Form des Oligomers bzw. der Untereinheiten beider Isoformen eine mit der Temperatur zunehmende Exposition von Tryptophanen aus dem Proteininneren, ebenso wie eine markante Reduktion an Sekundärstrukturelementen detektiert werden. Durch Vergleiche der unterschiedlichen Oligomerisierungszustände konnten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Untereinheit-Untereinheit-Interaktion für die Gesamtstabilität des nativen aggregierten Proteins gegenüber thermischer sowie chemischer Denaturierung (Ricchelli *et al.*, 1981) gezogen werden. Auch bezüglich der irreversiblen und Scanraten-abhängigen Denaturierungskinetik von *Rapana thomasi* geht man von einem komplizierteren Mechanismus aus, der nur bedingt durch das Ein- oder Zwei-Stufen-Modell beschrieben werden kann (Sánchez-Ruiz *et al.*, 1988; Lepock *et al.*, 1992; Kurganov *et al.*, 1997; Lyubarev & Kurganov, 2000; Idakieva *et al.*, 2005). Zudem konnte bei dieser Schnecke eine sehr hohe Thermostabilität für das oligomere Didekamer nachgewiesen werden ($T_m = 83^\circ\text{C}$), die jedoch etwas unter der des 24-meren *Eurypelma*-Hämocyanins ($T_m = 90^\circ\text{C}$) lag. Auffällig war des Weiteren eine, im Vergleich zu den wandbildenden FUs wie Rth1-a, hohe Stabilität der kragenbildenden FU Rth1-h. Diese besaß ähnlich hohe Schmelzpunkte wie die oligomeren Didekamere des Hämocyanins.

10 Das Hämocyanin der großen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*

Da in dieser Arbeit mit dem Hämocyanin der marinen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (KLH = engl. für Keyhole Limpet Hämocyanin) gearbeitet wurde, soll in den nächsten zwei Kapiteln kurz auf die biochemischen, strukturellen und immunologischen Eigenschaften dieses ganz speziellen Proteins, auch in Bezug auf die medizinische Anwendung in der Klinik, eingegangen werden. Beim KLH handelt es sich um ein Hämocyanin des Gastropodentyps (Kap. A3, Abb. A2 a). Durch zahlreiche Studien konnte gezeigt werden, dass zwei immunologisch verschiedene Isoformen in der Hämolymphe von *Megathura* vorkommen (Senozan *et al.*, 1981; Savel-Niemann *et al.*, 1990; Markl *et al.*, 1991a; Gebauer *et al.*, 1994), welche eine Protein-Sequenzidentität von etwa 65% aufweisen (Lieb *et al.*, 2000; Altenhein *et al.*, 2002). Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der jeweiligen Untereinheiten in der nativen PAGE wurden diese als KLH1 und KLH2 bezeichnet (Gebauer *et al.*, 1994). Als Molekularmassen konnten ca. 390 kDa für die Untereinheit von KLH1 und 360 kDa für die KLH2-Untereinheit bestimmt werden (Söhngen *et al.*, 1997). Im Durchschnitt liegt das Verhältnis von KLH1 zu KLH2 nach Pelletierung bei 1:2 (Harris *et al.*, 1997a), allerdings metabolisieren die Tiere nach Monaten in Gefangenschaft fast ihr gesamtes KLH1, vermutlich um auf diese Weise Mangelerscheinungen auszugleichen, die durch eine unzureichende Ernährung hervorgerufen werden (Review Harris & Markl, 1999). Diese Tatsache ermöglicht jedoch vergleichende Studien an mit KLH2 angereichertem Blut. Versuche zur Trennung der Isoformen mittels Größenausschluss-Chromatographie waren nur teilweise erfolgreich (Harris *et al.*, 1992; Markl *et al.*, 1991a; Savel-Niemann *et al.*, 1990). Als Ursache ließ sich durch Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) zeigen, dass drei Aggregationsformen des KLH vorliegen: Didekamere, Kluster von Didekameren und Multidekamere (Kap. A3, Abb. A2 d). Bei den Didekameren handelt es sich um Homo-Oligomere, obwohl die Didekamer-Fraktionen von *Megathura* stets aus einem Gemisch von KLH1 und KLH2 bestehen (Harris *et al.*, 1992; Gebauer *et al.*, 1994). Multidekamere bilden sich nur beim KLH2 aus, während Kluster von Didekameren nur beim KLH1 vorzufinden sind (Markl *et al.*, 1991a). Bei der Herstellung von KLH-Proben für die TEM konnte eine Instabilität des nativen KLH in Anwesenheit von Ammoniummolybdat nachgewiesen werden (Harris *et al.*, 1995). Es stellte sich heraus, dass Multi- und Didekamere des KLH2 unter diesen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7,0 zunächst in einzelne Dekamere und ab pH 5,7 sogar in Untereinheiten dissoziieren, während KLH1-Didekamere sowie deren Kluster intakt bleiben (Harris *et al.*, 1992; Markl *et al.*, 1991a). Somit ergibt sich eine effiziente Möglichkeit, eine Trennung der beiden Isoformen auch durch Gelfiltrations-Chromatographie oder Zentrifugation zu erreichen (Harris *et al.*, 1995). Auch Versuche mit Ionenaustausch-Chromatographie brachten Erfolge bei der Aufreinigung des KLH (Söhngen *et al.*, 1997). Durch den Entzug zweiwertiger Kationen und bei alkalischen pH-Werten von 9,6 können beide Isoformen in ihre Untereinheiten dissoziiert werden. Aufschluss über die Anzahl der FUs je Untereinheit sowie deren immunologische Verwandtschaft untereinander, konnten

durch Inkubation der nativen Untereinheiten mit verschiedenen Proteasen gewonnen werden (Gebauer *et al.*, 1994, 1999; Gebauer & Harris 1999; Söhngen *et al.*, 1997). Nach Spaltung zwischen den Linker-regionen jeder FU mit dem Enzym Elastase, lassen sich 16 individuelle und immunologisch verschiedene FUs nachweisen. Auch die Topologie der FUs innerhalb jedes Untereinheitendimers konnte kürzlich aufgeklärt werden (Meissner *et al.*, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Für die weiterführende Aufklärung biochemischer und struktureller Daten des KLH (Glykosilierungen, Röntgenstrukturen von FUs usw.) ist es von Vorteil, FUs in großer Reinheit zu isolieren. Diesbezüglich konnten mit Hilfe von Spaltungen der Untereinheiten mit verschiedenen Proteasen und Aufreinigung der Fragmente mittels Anionenaustausch- sowie Größenausschluss-Chromatographie, bereits Erfolge erzielt werden (Gebauer *et al.*, 1994, 1999; Gebauer & Harris, 1999; Söhngen *et al.*, 1997). Sowohl KLH1 als auch KLH2 konnten durch den Einsatz der *Staphylococcus* V8-Protease in die Domänen-Fragmente -abc, -defg und -defgh gespalten werden. Sekundärspaltungen mit dem Enzym Trypsin resultierten in den Fragmenten -ab, -c, -de und -fg. Spaltungen des KLH2 nur mit Trypsin brachten die Domänen -ab, -b, -c, -de und -fg. Weitere wichtige strukturelle Daten folgten durch eine SANS- sowie SAXS-gestützte Molekülrekonstruktion des KLH1. Die aufgrund der Funktion des KLH als kooperativem Sauerstofftransporter zu erwartenden Konformationsübergänge vom oxygenierten zum deoxygenierten Zustand konnten anhand dieser Daten eindeutig für das KLH1 nachgewiesen werden (Swerdlow *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 2001, 2004a, b). So zeigte sich, dass die Oxygenierung in einer Konformationsänderung resultiert, die den Hohlzylinder im Vergleich zur deoxygenierten Form kompakter und dünner, aber auch um etwa 5 Å länger werden lässt. Zudem kommt es zu einer Änderung der, in Bezug auf die Achse des Zylinders, parallelen Anordnung der Untereinheiten zu einem helikalen Oberflächenmuster des KLH. Auch die Kenntnisse bezüglich der Oligosaccharide des KLH sind derzeit noch sehr begrenzt. Der Kohlenhydratanteil beläuft sich auf ungefähr 4 % der molekularen Masse (Van Kuik *et al.*, 1990; Kamerling & Vliegthart, 1997). Bis heute wurden bereits einige Struktur motive der Glykosylierung beschrieben (Stoeva *et al.*, 1999; Kantelhardt *et al.*, 2002; Kurokawa *et al.*, 2002; Wuhrer *et al.*, 2004). Mit Hilfe pflanzlicher Lektine konnten N-glykosidische Zucker an den aufgereinigten Fragmenten KLH1-ab, KLH1-de, KLH1-fg und KLH1-h, jedoch nicht an KLH1-c nachgewiesen werden. Beim KLH2 zeigte jede einzelne FU eine positive Reaktion, mit Ausnahme der FU KLH2-c. Für letztere konnte jedoch die Bindung eines O-glykosidischen Zuckers gezeigt werden (Stoeva *et al.*, 1999). Weitere Studien führten zur Entdeckung zusätzlicher Kohlenhydrate, von denen einige immunogene Eigenschaften besitzen (Kap. A11) (Wuhrer *et al.*, 1999; Kantelhardt *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnten aus Gesamt-KLH 15 N-Glykane isoliert und ihre molekulare Zusammensetzung aufgeklärt werden (Kurokawa *et al.*, 2002). Das zentrale Pentasaccharid ist stets gleich (drei Mannose und zwei N-Acetylglucosamin) und lediglich die Enden unterscheiden sich. Eine genauere Strukturanalyse ergab, dass sie hoch mannosyliert oder wenig verzweigt sind. Auch aus den Mannose tragenden Zuckerketten abgeleitete und verzweigte Strukturen mit (α 1-6)-Fucoseresten im Inneren des GlcNAc

wurden gefunden. Als ein weiteres charakteristisches Merkmal zeigte sich eine bisher noch nicht in N-glykosylierten Proteinen nachgewiesene Gal(β 1-6)Man-Struktureinheit. Schließlich wurden neue N-Glykane charakterisiert, die mit einem 4-substituierten Fucoserest eine ungewöhnliche Modifikation der Grundeinheit zeigen (Wuhrer *et al.*, 2003).

11 Medizinische Einsatzgebiete des KLH

Bereits in den 60er-Jahren lag ein medizinisches Interesse am Hämocyanin von *Megathura crenulata* vor, als man bei Experimenten an Säugetieren immunstimulatorische Eigenschaften des KLH nachweisen konnte (Weigle, 1964; Curtis *et al.*, 1970; Herscovitz *et al.*, 1972). Beim Menschen wurde es erstmals 1967 für Immunkompetenztests eingesetzt (Swanson & Schwarz, 1967). Das Haupteinsatzgebiet des nativen KLH in der Medizin liegt in der Behandlung von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen (Olsson *et al.*, 1974; Jurincic *et al.*, 1988; Flamm *et al.*, 1990; Sargent & Williams 1992). Hierfür ist es heute als *Immucothel*[®] in der klinischen Anwendung im Einsatz (Biosyn Arzneimittel GmbH, Fellbach, Abb. A11 a).

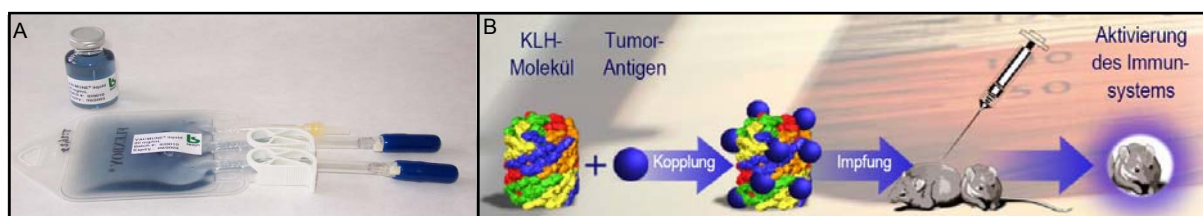


Abb. A11: Klinische Einsatzgebiete des KLH.

a) KLH-Präparate *Immucothel*[®], zur Behandlung von oberflächlichem Harnblasen-Karzinom und *Vacmune*[®], als Tumorstoffträger. b) Schema zur Kopplung von Tumorantigenen an KLH (aus Harris & Markl, 1999).

Studien zum Verständnis der immuntherapeutischen Wirkung des KLH konnten zeigen, dass dieses Molekül Oligosaccharide mit einem terminalen Galactose(β 1-3)-N-Acetyl-galactosamin-Epitop trägt, welches eine Kreuzreaktion mit dem sogenannten Thomson-Friedreich(T)-Antigen (äquivalentes Epitop auf der Oberfläche des Harnblasentumors) eingeht (Wirguin *et al.*, 1995). Auch wenn der genaue Mechanismus der Immunstimulation nicht bekannt ist, werden durch KLH unspezifische und spezifische Immunantworten auf humoraler sowie zellulärer Ebene ausgelöst. Klippel (1991) konnte zudem zeigen, dass die Größe des Moleküls nicht der ausschlaggebende Faktor für dessen Immunogenität ist, da Untereinheiten des KLH eine stärkere Immunantwort auslösen als intakte Dodekamere. Die Applikation von KLH führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen sowie einer Sekretion von Komplementfaktoren. Ursache hierfür sind vermutlich die vielen xenogenen Epitope der immunologisch unterschiedlichen funktionellen Einheiten inklusive der Glykosilierungen. Die spezifische Immunantwort zeichnet sich durch eine Stimulation von B-Zellen sowie einem Anstieg von KLH-spezifischen Ig-G und Ig-M-Antikörpern aus. Parallel kommt es zu einer T-Zell-Antwort mit zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen. Bezüglich der B-Zell-Antwort vermutet man zudem kreuzreagierende Gedächtniszellen, während bei der T-Zell-Antwort *cross priming* oder bislang unbekannte Mechanismen in Erwägung gebracht werden. Durch den Einsatz des KLH zur Vermeidung

des Wiederauftretens von Harnblasenkarzinomen konnte eine überlegene Wirksamkeit gegenüber der Mitomycin C-Chemotherapie festgestellt werden. Zusätzlich konnten die lokalen und systemischen Nebenwirkungen derselbigen durch die KLH-Therapie drastisch reduziert werden (Jurincic *et al.*, 1990; Jurincic-Winkler *et al.*, 1996, 2000). Um diese effektive und schonende Therapieform auf die Bekämpfung anderer Krebsarten auszudehnen, wurde sie bei Nierenzellkarzinompatienten in einer Phase II-Studie angewandt. Auch hier konnte über die Erfolge einer partiellen Remission sowie einem reduzierten Tumorwachstum berichtet werden (Klippel *et al.*, 1991). *In vitro*-Studien an verschiedenen Zelllinien von Brustkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Prostatakrebs konnte ebenfalls eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums zeigen (Riggs *et al.*, 2002). Aktuelle Forschungsschwerpunkte haben Apoptose und Zytokin-Signalwege nach der KLH-Behandlung von Brust- und Prostatakrebs zum Ziel (Riggs *et al.*, 2005). Es zeigte sich eine signifikante Inhibition aller Zelllinien sowie eine deutliche Änderung im Expressionsmuster der Zytokine. Somit existiert mit der Applikation des KLH, neben der Behandlung von Harnblasenkarzinomen, auch eine vielversprechende zukünftige Therapieform für andere Krebsarten. Zudem wird KLH auch in Laboren und Kliniken als Hapten-Carrier für niedermolekulare Moleküle oder Tumorantigene eingesetzt (Abb. A11 b), mit dem Ziel, durch deren Antigenpräsentation eine antigenspezifische Antikörperproduktion und T-Zell-Antwort zu induzieren (Musselli *et al.*, 2001; Ragupathi *et al.*, 2002, 2003; Gilewski *et al.*, 2007). Für diesen Zweck ist eine gereinigte Mischung des KLH1 und KLH2 kommerziell erhältlich (*Vacmune*[®], Biosyn Arzneimittel GmbH, Fellbach, Abb. A11 a). Es wurden bereits zahlreiche Studien mit Hormonen, Virusbestandteilen, Peptiden, Polysacchariden, Lipiden, Oligonukleotiden oder auch synthetischen Stoffen, wie z.B. Drogen, mit einigem Erfolg durchgeführt, um eine spezifische Immunantwort gegen diese Haptene zu erreichen (Kahn *et al.*, 1992; Okuda *et al.*, 1993; Livingston *et al.*, 2006; Castigliero *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2007). Die Erkenntnis, dass es zu einer Kreuzreaktion zwischen einem Kohlenhydrat-Epitop auf der Oberfläche der Larven von *Schistosoma mansoni* und einem Epitop des KLH kommt (Dissous *et al.*, 1986; Grzych *et al.*, 1987; Ko & Harn, 1987), resultierte in einem weiteren medizinischen Interesse an dem Hämocyanin der großen Schlüssellochschnecke. *Schistosoma mansoni* ist ein humanpathogener Trematode, der neben *S. japonicum* und *S. haematobium* die Infektionskrankheit Bilharziose auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem gemeinsamen Epitop um einen terminalen Fucoserest handelt, welcher in der ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-Position an GalNAc gebunden vorliegt (Wuhrer *et al.*, 1999; Kantelhardt *et al.*, 2002). Somit kommt es nach Injektion des KLH im Falle einer Bilharziose-Infektion durch *S. mansoni* zu einer Kreuzreaktion, da die Anti-KLH-Antikörper zugleich gegen die Schistosoma-Glykolipide gerichtet sind. Anti-KLH-Antikörper bzw. KLH direkt lassen sich daher in der Diagnostik von Bilharziose, z.B. mittels ELISA-Tests, heranziehen (Markl *et al.*, 1991b; Wuhrer *et al.*, 1999, 2000, 2004; Kantelhardt *et al.*, 2002; Geyer *et al.*, 2005).

12 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei große Themenkomplexe. Das Hauptprojekt bestand in der Aufklärung der **Röntgenstruktur der FU-h** des Kragens des **KLH1**. Da bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass sich die FU-h des KLH1 leichter isolieren lässt, als die des KLH2 (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1999; Gebauer & Harris, 1999), mussten zunächst Strategien entwickelt werden, die FU KLH1-h in großer Menge und sehr reiner Form für die nachfolgenden Kristallisationsexperimente zu isolieren. Bisher sind bereits die Kristallstrukturen der FU-g des Kragens aus *Octopus dofleini* sowie der FU-e aus der Wandregion des Hämocyanins von *Rapana thomasi* aufgeklärt (Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2003). Diese Strukturen konnten bereits zu einer detaillierten Vorstellung über die räumliche Anordnung der Polypeptidkette sowie dem Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und Funktion innerhalb der Mollusken-Hämocyanine beitragen. Auch lieferten sie wichtige Hinweise auf die potenziellen Mechanismen der kooperativen Sauerstoffbindung. Allerdings existiert bis heute noch keine Röntgenstruktur der zusätzlichen FU-h der Gastropoden, die dort an der Ausbildung des asymmetrischen Kragens beteiligt ist. Besonderes Interesse gilt hierbei der Funktion und Struktur der zusätzlichen ~ 100 Aminosäuren, die speziell diese FU auszeichnen. Zudem könnte die Röntgenstruktur Aufschluss darüber geben, warum die Hämocyanine der Cephalopoden diese achte FU im Laufe der Evolution verloren haben und in der ausschließlichen Ausbildung von Dekameren mit symmetrischem Kragen resultierte.

Das zweite Projekt bestand in der Untersuchung der **Tyrosinase-** bzw. **Catecholoxidase-Aktivität** des **KLH**. Bisher konnte eine solche Aktivität, nach der entsprechenden Aktivierung, bereits bei zahlreichen Arthropoden-, Crustacean- aber auch Mollusken-Hämocyaninen nachgewiesen werden, auch wenn die Induktion zur Tyrosinase nur teilweise möglich war (Zlateva *et al.*, 1996; Rimke & Decker, 1997; Salvato *et al.*, 1998; Decker *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2001, 2003; Jaenicke & Decker, 2004b; Pless *et al.*, 2003; Morioka *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006). In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Strategien zur Aktivierung des KLH zur Tyrosinase bzw. Catecholoxidase anhand verschiedener mono- und diphenolischer Substrate getestet werden. Spezielles Interesse galt hierbei den katalytisch aktivierbaren FUs sowie deren intrinsischer Aktivität ohne Aktivierung. Die einzelnen FUs bzw. auch Mehrdomänenfragmente mussten hierfür zuvor mittels etablierter (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1994, 1999; Gebauer & Harris, 1999; Diplomarbeit Büchler, 2004), aber auch neuer Strategien in möglichst reiner Form und großer Menge isoliert werden. Ein eventuell steigernder oder inhibitorischer Einfluss verschiedener Puffer und Effektoren auf die Mono- oder Diphenolase-Aktivität des KLH sollte ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein.

Ein weiterer Themenbereich war die Untersuchung der **Thermostabilität** verschiedener Oligomerisierungsformen des **KLH**. Diese Fragestellung ist vor allem im Hinblick auf die biologische Bedeutung des Hämocyanins als Sauerstofftransporter sowie dessen Anwendung

in der Medizin interessant. Hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften wie der Erhaltung des nativen Konformationszustands unter Hitzeeinwirkung, wurden bereits einige Untersuchungen an verschiedenen Hämocyaninen durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass sie eine mit dem Oligomerisierungszustand zunehmende Thermostabilität zeigten (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995; Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Idakieva *et al.*, 2005, 2006). Ob dies auch für das Hämocyanin von *Megathura crenulata* zutrifft und wie sich der Einfluss verschiedener Puffer und Effektoren auf die Thermostabilität auswirkt, war ein weiterer Aspekt, der in diese Arbeit mit einfließen sollte. Auch für diese Studien mussten zuvor einzelne (Di)dekamere, UE und verschiedene FUs isoliert werden. (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1994; 1999; Gebauer & Harris, 1999; Diplomarbeit Büchler, 2004).

B Material und Methoden

1 Tiere und Tierhaltung

Die große Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* lässt sich phylogenetisch dem Stamm der Mollusken (Weichtiere), der Klasse der Gastropoden (Schnecken) sowie der Unterklasse der Prosobranchier (Vorderkiemer) zuordnen. Innerhalb der Ordnung der Archaeogastropoda ist die schlüssellochähnliche Öffnung in der Schale namensgebend für ihre Stellung innerhalb der Familie der Fissurellidea (Schlüssellochschnecken).

Diese zu den größten Schlüssellochschnecken gehörende Art lebt im pazifischen Ozean, vorwiegend an der kalifornischen Küste von der Monterey Bucht bis zur Insel Asuncion und bewohnt hier die untere Gezeitenzone sowie das obere Sublitoral.



Abb. B1: Die große Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* im Aquarium (links) und in ihrem natürlichen Lebensraum (rechts).

Quelle Bild rechts: www.diver.net

Der äußere Mantel kann in der Farbgebung bei verschiedenen Individuen stark variieren (Abb. B1). Tiere mit gräulicher Färbung und dunkleren, braunen Streifen und Punkten kommen ebenso vor wie Schnecken in schwarz (Illingworth, 1902; Buchsbaum & Milne, 1960; Murdock & Vogel, 1978). Der stark ausgeprägte und muskulöse, gelbe Fuß dient als Saugnapf, mit dem sich das Tier an Felsoberflächen festhalten kann. Die Schnecken ernähren sich hauptsächlich von kleinerem Detritus oder herbivor, z.B. von Seegras, Algen, Tunicaten oder Schwämmen. Zum Abraspeln von Nahrungsstücken nutzen sie ihre starke, schleifpapierartige Zunge (Radula). Das Weichtier erreicht eine Größe von 7,5 - 13 cm, wobei die größtenteils durch den Mantel verdeckte, napfförmige Schale ca. 8 x 5 cm einnimmt. Über das vom Mantel nicht verdeckte Schlüsselloch in der Mitte der Schale (Analsinus), werden sowohl verbrauchtes Atemwasser, als auch Exkrememente in das umgebende Wasser abgegeben, wodurch eine erneute Aufnahme durch Mund und Kiemen ausgeschlossen wird. Auch die Abgabe der Eier und Spermien erfolgt über diese Öffnung (Abb. B2).

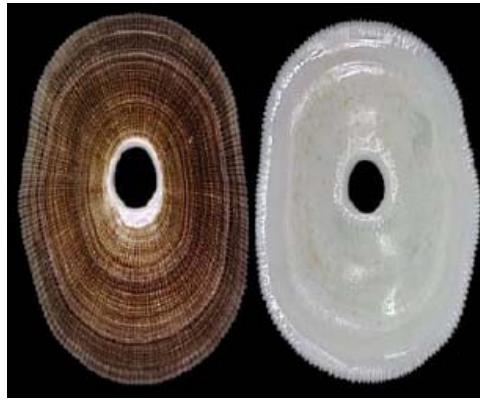


Abb. B2: Außen- und Innenansicht der Schale der großen Schlüssellochschncke *Megathura crenulata*.
Quelle: www.gastropods.com/2/Shell_4152.html

Die Hälterung der Tiere erfolgte bei einer Raumtemperatur von 18 °C, in 300 l Meerwasser-Aquarien (3,5 ‰, Fa. Tropic Marin, Wartenberg/Angersbach), mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Gefüttert wurden die Schnecken einmal wöchentlich mit Zucchini. Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden freundlicherweise von der Firma Biosyn (Carlsbad, Kalifornien) zur Verfügung gestellt.

2 *Verwendete Chemikalien und Geräte*

Die verwendeten Laborchemikalien wurden in Analysequalität erhalten und stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel (sogenannte „Falcons“), wurden von Falcon (Heidelberg) bezogen. Zur Durchführung der 2D-Immunelektrophorese dienten Agarose M (Pharmacia Freiburg), GelBond[®]-Film (Cambrex Bioscience, Rockland, USA) sowie Filtrierpapier (Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg; Schleicher & Schuell, Dassel). Standardlaborgeräte stammten von Labotec (Wiesbaden). Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen in einer Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) durchgeführt. Falcons wurden in einer kühlbaren *Megafuge 1.0 R* (Heraeus, Fulda) zentrifugiert. Zudem wurde eine *Sorvall* Kühlzentrifuge (RC5B) mit dem Rotor SS 34 benutzt. Als Photometer dienten das „*BioPhotometer*“ der Firma Eppendorf (Hamburg) sowie das *UV/Visible Spectrophotometer „Ultrospec 3100 pro“* von Amersham Biosciences (München). Darüber hinaus verwendete Chemikalien und Geräte werden an gegebener Stelle im Text erwähnt.

3 *Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen*

Für alle proteinbiochemischen Arbeiten und zum Ansetzen der Puffer/Lösungen kam entmineralisiertes Wasser zum Einsatz. Um eine Kontamination mit Proteasen zu vermeiden, wurden bei allen Arbeiten Latex-Handschuhe getragen. Zum Schutz vor Acrylamid dienten bei der Handhabung mit den entsprechenden Gelen Handschuhe aus Nitril. Beim Ansetzen von Pufferlösungen und beim Umgang mit Säuren und Laugen wurde zum Einstellen des pH-Wertes zusätzlich eine Schutzbrille getragen.

4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

4.1 Aufbereitung des Hämolymphe-Serums

Das Hämocyanin von *Megathura crenulata* (engl. **Keyhole Limpet Hemocyanin = KLH**) wurde hauptsächlich als steriles Hämolymphe-Serum von der Firma Biosyn Arzneimittel GmbH (Fellbach) bezogen (Abb. B3). Nach steriler Überführung des Hämocyanins unter einer *Labotec SG 600* Sterilbank in 50 ml Falcons, erfolgte die längerfristige Lagerung bei 4 °C. Zur Abtrennung unerwünschter Hämolymphe-Proteine (Harris & Markl, 1994) vom KLH wurde das Serum für ~ 17 Stunden, bei 30000 x g und 4° C, in einer *Beckman Optima L-70* Ultrazentrifuge zentrifugiert, das Hämocyaninpellet anschließend mit Stabilisierungspuffer überschichtet und über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler gelöst. Am nächsten Tag konnte das resuspendierte KLH für weitere Versuche verwendet werden.



Abb. B3: Hämolymphe-Serum der großen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (KLH). Bereitstellung durch die Firma Biosyn Arzneimittel GmbH (Fellbach)

Um KLH2 in seiner oligomeren Form als Didekamer isolieren zu können, fand eine Blutentnahme an mehreren Schlüssellochschnecken nach mindestens dreimonatiger Hälterung in Gefangenschaft statt. Unter diesen Bedingungen metabolisieren die Tiere fast ihr gesamtes KLH1, vermutlich um auf diese Weise Mangelerscheinungen, bedingt durch die eingeschränkte Ernährung, auszugleichen (Review Harris & Markl, 1999).

Die Blutentnahme erfolgte nach Kältenarkose durch Punktion des Blutsinus im Kriechfuß, mit Hilfe einer Acufilm-Kanüle im hinteren Drittel des Fußes. Die Hämolymphe trat selbstständig aus und wurde in einem im Eisbad gekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Abb. B4).



Abb. B4: Hämolymphe-Entnahme an der großen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*. Die Entnahme erfolgte nach Kältenarkose durch Punktion des Blutsinus im Kriechfuß mit Hilfe einer Kanüle, wonach die Hämolymphe selbstständig austrat und in einem eisgekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde.

Um einem proteolytischen Abbau vorzubeugen, wurde die Hämolymphe mit 1 mM *Pefabloc*[®] SC versetzt. Anschließend erfolgte zur Sedimentation der noch in der Hämolymphe befindlichen Zellbestandteile eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 800 x g und 4 °C in einer *Sorvall*[®]- Zentrifuge RC-5B (Du Pont Instruments, Frankfurt) im Rotor SS 34. Mit dem Überstand wurde dann, wie bereits oben beim Hämlymphe-Serum der Fa. Biosyn beschrieben, fortgefahren.

Verwendete Puffer:

Stabilisierungs-Puffer: 0,05 M Tris
0,15 M NaCl
5 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂
pH 7,4

4.2 Isolierung der Isoformen KLH1 und KLH2

Sowohl KLH1 als auch KLH2 dissoziiert in alkalischem Medium in seine Untereinheiten (Kap. B4.4), die Isoform 2 jedoch auch in 2 % Ammoniummolybdat, bei einem sauren pH-Wert von 5,7. Da KLH1 unter diesen Bedingungen intakt bleibt, kann durch selektive Dissoziation des KLH2 eine Trennung beider Isoformen erreicht werden (Harris *et al.*, 1995). Hierzu wurde das native Gesamt-KLH in einen Dialyseschlauch (Visking Typ 2032 von Roth, Karlsruhe) überführt. Dieser wurde zuvor in destilliertem Wasser ausgekocht und ausgespült, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Der mit beiden Isoformen befüllte Dialyseschlauch wurde im ersten Schritt in zwei Liter 2 % Ammoniummolybdat pH 5,7 über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde der Puffer erneuert und nochmals für etwa vier Stunden dialysiert. Das Prinzip der Dialyse beruht auf den semipermeablen Eigenschaften des Dialyseschlauches. Aufgrund der Porengröße lässt der Schlauch nur kleinere Moleküle mit einem Molekulargewicht < 14000 sowie Ionen wie Na⁺ oder OH⁻ passieren, während das Hämocyanin bzw. deren dissoziierte Untereinheiten im Schlauch verbleiben. Durch den

ungehinderten Ionendurchtritt durch die Poren und die daraus resultierende Änderung des pH-Wertes innerhalb des Schlauchs, kommt es zur Dissoziation des KLH2, ohne die Proteinlösung hierbei nennenswert zu verdünnen. Um das nun dissoziierte KLH2 von dem noch intakten KLH1 abzutrennen, wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs für drei Stunden bei 30000 x g in einer *Sorvall*[®]- Zentrifuge *RC-5B* (Du Pont Instruments, Frankfurt) im Rotor SS 34 bei 4 °C zentrifugiert. Hierbei verbleibt das in Untereinheiten zerlegte KLH2 im Überstand, während das intakte KLH1 pelletiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet, nach einem kurzen Waschschrift zur Entfernung des restlichen Ammoniummolybdats, mit 10 ml Stabilisierungs-Puffer überschichtet und bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler gelöst. Die Reinheit des gelösten Pellets an KLH1 bzw. des Überstands an KLH2 wurde mittels nativer PAGE (Kap. B4.6) überprüft.

Verwendete Puffer:

Ammoniummolybdat-Puffer: 2 % Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, pH 5,7

Stabilisierungs-Puffer: s. Kap. B4.1

4.3 Isolierung von KLH1-Dekameren

KLH1 liegt in Stabilisierungs-Puffer, bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4, überwiegend in seiner nativen Form als Didekamere und Cluster derselben vor. Söhngen *et al.* (1997) konnten zeigen, dass KLH1-Didekamere nach Dialyse gegen Stabilisierungs-Puffer, bei einem pH-Wert von 8,5, in Dekamere zerfallen und diese unter diesen Bedingungen auch einige Tage stabil bleiben. Eine zusätzliche Erhöhung der MgCl₂- und CaCl₂-Konzentration auf 100 mM resultierte jedoch in einer erneuten Assemblierung zu Didekameren und sogar in der Ausbildung von KLH1-Multidekameren. Um Dekamere des KLH1 in möglichst großer und reiner Form zu isolieren, wurden die bereits aufgereinigten KLH1-Didekamere (Kap. B4.2) über Nacht gegen Stabilisierungs-Puffer pH 8,5, mit nur je 5 mM MgCl₂ und CaCl₂ dialysiert. Zur weiteren Abtrennung der Dekameren von noch intakten Didekameren, -Clustern und kleineren Bruchstücken, wurde das Dialysat einer Größenausschluss-Chromatographie (Kap. 4.10) im Biogel[®] A-15m unterzogen.

Verwendete Puffer:

Stabilisierungs-Puffer: 0,05 M Tris
0,15 M NaCl
5 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂
pH 8,5

4.4 Dissoziation des KLH in seine Untereinheiten

KLH kann durch Überführung in alkalisches Medium und dem Entzug zweiwertiger Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺) in seine noch biologisch aktiven Untereinheiten zerlegt werden. Die Proben

wurden hierzu über Nacht bei 4 °C in einem Dialyseschlauch (Visking Typ 20/32 von Roth, Karlsruhe) gegen zwei Liter 0,13 M Glycin-Puffer pH 9,6 dialysiert. Obwohl isoliertes KLH2 bereits in Ammoniummolybdat pH 5,7 in Untereinheiten zerlegt vorlag (Kap. B4.2), erfolgte auch hier eine Dialyse gegen 0,13 M Glycin-Puffer pH 9,6, um das für die weiteren Arbeitsschritte störende Ammoniummolybdat zu entfernen und den sauren pH von 5,7 auf 9,6 einzustellen. Auch hier wurde der Puffer am nächsten Tag erneuert und für weiter 4 Stunden dialysiert.

Verwendete Puffer:

Glycin/NaOH-Puffer: 0,13 M Glycin
pH 9,6

4.5 Konzentrierung von Proteinproben

Um für bestimmte Experimente kleinere Volumina bzw. höher konzentrierte Proteinlösungen einsetzen zu können, wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, die im Folgenden kurz erläutert werden.

4.5.1 Amicon Ultra-15-Filtrationssystem

Bei diesem System wurden Zentrifugationssäulen mit einem Filtereinsatz aus Regeneratzellulose mit niedriger Absorption (Abb. B5) verwendet, der für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 10000 bzw. 30000 durchlässig ist (je nach Größe des Proteins). Aufgrund der Größe des KLH bzw. seiner Untereinheiten oder funktionellen Einheiten verbleibt das Hämocyanin im Filtereinsatz, während kleinere Moleküle und Wasser sich im Durchfluss befanden. Mittels dieser Methode konnten maximal 15 ml Probe auf ein Volumen von bis zu 200 µl eingeeengt werden. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000 x g in der *Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R* im Rotor 3360 bei 4 °C, wobei die Dauer in Abhängigkeit von dem Ausgangsvolumen variierte.

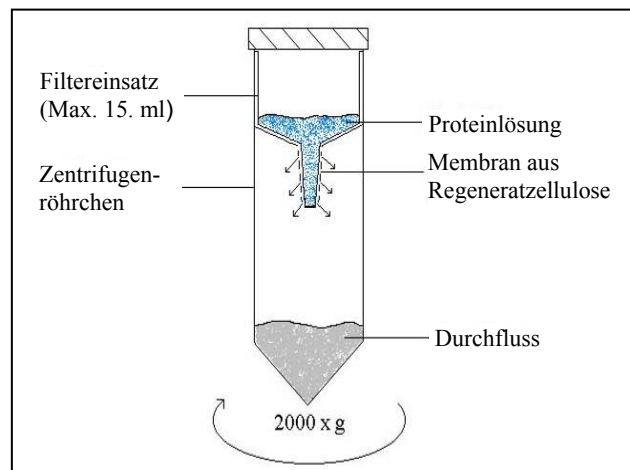


Abb. B5: Konzentrierung von Proteinlösungen mittels des Amicon[®] Ultrazentrifugationssystems. Maximal 15 ml Probe werden in den Filtereinsatz im Zentrifugenröhrchen eingefüllt und in Abhängigkeit vom Ausgangsvolumen unterschiedlich lange bei 2000 x g zentrifugiert.

4.5.2 *Vivaspin-500-Ultrafiltration*

Zur Konzentrierung kleinerer Proteinmengen bis zu 500 µl kamen Vivaspin 500 Zentrifugensäulchen (Typ VS0101; Fa. Vivascience, Hannover) zum Einsatz. Deren Membraneinsatz aus Polyethersulfonat besitzt eine Durchlässigkeit für Moleküle kleiner 10000 bzw. 30000 Dalton (je nach Größe des Proteins). Die Proteinprobe wurde dabei, wie bereits beim *Amicon Ultra-15-Filtrationssystem*, in ein Zentrifugensäulchen mit Membraneinsatz gegeben, so dass in der darauf folgenden Zentrifugation kleinere Moleküle und Wasser durch die Membran gedrückt wurden. Das Hämocyaninkonzentrat befand sich im Filtereinsatz, der Durchfluss wurde verworfen. Die Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 10000 x g in einer *Hettich Mikro 20* Tischzentrifuge.

4.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das Prinzip der PAGE beruht darauf, dass sich Proteine aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld auftrennen lassen. Als Matrix werden hierbei Gele aus Polyacrylamid verwendet, welche zur Verbesserung der Auflösung aus einem großmaschigen Sammelgel sowie einem höhervernetzten Trenngel zusammengesetzt sind. Polyacrylamid bildet sich aus einem Gemisch von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid, nach Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat (APS) und dem Katalysator Tetramethylethylen-diamin (TEMED), durch eine Verknüpfung von langen Acrylamidketten zu einer netzförmigen Struktur. Je nach Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid haben diese Netze eine bestimmte Porengröße und ermöglichen somit eine Trennung von Proteinen unterschiedlicher Größe und Ladung.

Tab. B1 zeigt die Korrelation zwischen Konzentration des Gels und dem Trennbereich der Proteine.

Konzentration in %	Trennbereich in kDa
3	100 – 1000
5	80 – 500
8	60 – 400
12	40 – 200
20	10 – 100

Tab. B1: Trenneigenschaften von Polyacrylamidgelen

Die Elektrophorese erfolgte sowohl unter denaturierenden (SDS-PAGE), als auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen (native PAGE) nach Laemmli (1970).

4.6.1 *SDS-PAGE*

Bei diesem Verfahren erfolgt eine Auftrennung monomerer Proteine bzw. Untereinheiten oligomerer Proteine, ausschließlich nach ihrer Molekülmasse. Bei letzteren ist es jedoch erforderlich, die native Quartärstruktur durch Zugabe des negativ geladenen Detergenzes

Natriumdodecylsulfat (SDS) aufzuheben. SDS bindet in einem konstanten molaren Verhältnis an die hydrophoben Regionen der Polypeptidketten und blockiert die Ionenbindungen innerhalb des Moleküls. Zudem umhüllt es die Proteinketten mit einer negativen Ladung, was deren Eigenladung somit überlagert und sie nach Anlegung eines elektrischen Feldes zur Anode wandern lassen. Die negative Ladung ist hierbei proportional zur Größe des Proteins. Des Weiteren werden durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol auch die Tertiärstrukturen der Moleküle durch Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten zerstört und somit die einzige kovalente Bindung zwischen den Aminosäureseitenketten aufgehoben. Eine abschließende Hitzedenaturierung führt dazu, dass die Polypeptidketten des Proteins in einer aufgefalteten und gestreckten Form vorliegen und die bei der Elektrophorese zurückgelegten Wegstrecken linear zum Logarithmus der Molekülgrößen sind (Weber & Osborn, 1969). Durch das gleichzeitige Auftragen von Markerproteinen auf dem Gel lassen sich die molekularen Massen der zu charakterisierenden Proteine abschätzen. Als Molekulargewichtsmarker wurde das Proteingemisch „SDS-6H“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet (Tab. B2).

Markersubstanz	Molekulargewicht
Myosin	205.000
β -Galactosidase	116.000
Phosphorylase B	97.400
Rinderserumalbumin (BSA)	66.000
Ovalbumin	45.000
Carboanhydrase	29.000

Tab. B2: Molekulargewichtsmarker SDS-6H.

Probenvorbereitung:

4 x Probenpuffer: 4,6 ml Stabilisierungs-Puffer (s. Kap. B4.1)
 4 ml SDS (20 %-ig)
 0,4 ml β -Mercaptoethanol (10 %-ig)
 2 ml Glycerin in Wasser
 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Die Proben wurden mit 25 % Probenpuffer versetzt und zusammen mit dem Marker auf dem Heizblock für mindestens 5 min bei 95 °C denaturiert.

4.6.2 Native PAGE

Bei der nativen PAGE werden Proteine sowohl nach ihrer Molekülmasse, als auch nach ihrer spezifischen Eigenladung und Konformation (Tertiärstruktur) aufgetrennt. Daher enthielten alle Puffer weder SDS noch β -Mercaptoethanol und eine Hitzedenaturierung der Proben bei 95 °C entfiel.

Probenvorbereitung:

Probenpuffer: 90 % Glycerin
 10 % Stabilisierungs-Puffer (s. Kap. B4.1)
 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Für beide Systeme verwendete Lösungen:

Acrylamidlösung: 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
 (Rotiphorese® Gel 30; Roth, Karlsruhe)

Polymerisationsstarter: - 10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat) in *Aqua dest.*
 - TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)

Puffer	SDS-PAGE	Native PAGE
Trenngel-Puffer	1,5 mol/l Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8	1,5 mol/l Tris/HCl pH 8,8
Sammelgel-Puffer	0,5 mol/l Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8	0,5 mol/l Tris/HCl pH 6,8
Elektrophorese-Puffer	0,023 mol/l Tris/HCl 0,19 mol/l Glycin 0,2 % SDS pH 8,3	0,023 mol/l Tris/HCl 0,19 mol/l Glycin pH 8,3

Tab. B3: Systemspezifische Lösungen

Lösung	Trenngel			Sammelgel
% Acrylamidlösung	5	7,5	10	3,9
Rotiphorese® [ml]	2,5	3,75	5	0,7
Trenngel-Puffer [ml]	3,75	3,75	3,75	-
Sammelgel-Puffer [ml]	-	-	-	1,25
H₂O [ml]	8,7	7,5	6,2	3,1
TEMED [µl]	5	5	5	5
APS 10 % [µl]	150	150	150	150

Tab. B4: Pipettierschema für 3 Minigele.

Durchführung:

Die Durchführung der PAGE erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern für Minigele im Format 80 x 80 mm, mit einer Schichtdicke von 1,5 mm. Vor dem Gießen des Gels wurde zwischen eine vordere Ohrenglasplatte und eine hintere Glasplatte, an beiden Seiten sowie an der Unterkante ein *Spacer* gelegt. Der untere Abstandshalter befand sich hierbei nur einige Millimeter zwischen den Glasplatten befand, um das Gel nicht zu sehr in der Länge zu verkürzen. Die Platten wurden anschließend mit je zwei Klammern an jeder Seite zusammengehalten und von außen mit 1 %-iger Agaroselösung abgedichtet. Anschließend wurde zuerst das Trenngel angesetzt und bis etwa 1 cm unter den oberen Rand zwischen die beiden Platten gegossen. Um eine möglichst gerade Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erreichen, wurde letzteres sofort nachdem Gießen mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation nach ca. 30 min wurde das Wasser wieder entfernt und das Sammelgel zwischen die Platten eingefüllt und umgehend der Probenkamm mit 13 Taschen möglichst luftblasenfrei in das Sammelgel gesteckt. Nachdem nach weiteren 20 Minuten auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der untere *Spacer* aus dem Trenngel entfernt und das fertige Gel in die Elektrophoresekammer (PHERO-minivert, Biotec Fischer, Reiskirchen) eingespannt.

Die obere und untere Pufferkammer wurde mit dem Elektrophorese-Puffer aufgefüllt und der Probenkamm vorsichtig gerade nach oben aus dem Gel gezogen. Das Gel wurde schließlich mit den Proteinproben sowie dem Marker (SDS-PAGE) beladen, der Kammerdeckel aufgesetzt und die Kabel der oberen Pufferkammer mit der Kathode und die der unteren mit der Anode des Netzgerätes verbunden. Die PAGE erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 - 26 mA und wurde, sobald die Lauffront des Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 90 Minuten), abgebrochen. Nach Entfernung des Gels aus der Laufkammer wurden die Glasplatten vorsichtig von dem Gel abgehoben und das Sammelgel von dem Trenngel entfernt.

Zur Färbung des Trenngels kam dieses für mindestens eine Stunde oder über Nacht in die Färbelösung und wurde darin auf dem Schüttler geschwenkt. Die Entfärbung des Gelhintergrunds erfolgte durch Inkubation in Entfärbelösung, bis nur noch die Proteinbanden auf dem Gel angefärbt waren. Eine längerfristige Aufbewahrung wurde durch Lagerung des Gels in 7,5 %-iger Essigsäure oder durch Einschweißen in eine Folie ermöglicht.

Färbelösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva)
	40 % Ethanol
	7,5 % Essigsäure
Entfärbelösung:	20 % Isopropanol
	7 % Essigsäure

4.6.3 Aktivitätsfärbung

Die Phenoloxidase-Aktivitäten der KLH-UE beider Isoformen sowie des Fragments KLH1-abc wurden mit Hilfe des in Kap. B4.12.1 beschriebenen MBTH-Assays (Pifferi & Baldassari, 1973) untersucht, welcher von Nellaiappan und Vinayakam (1993) ursprünglich für Gelsysteme modifiziert worden ist. Im Rahmen dieser Arbeit diente der Test zur qualitativen Bestimmung von Monophenolhydroxylase- bzw. Diphenoloxidase-Aktivitäten, nach Auftrennung in der nativen PAGE (Kap. B4.6.2). Als Substrate dienten die Diphenole Dopamin, Catechol und L-DOPA sowie die Monophenole Tyramin und 4-Methylphenol in der Aktivitäts-Färbelösung (Kap. B4.8.3, Tab. B5). Die Dauer der Inkubation richtete sich hierbei nach der Wahl des Substrates. Reaktionen mit Diphenolen waren in der Regel nach 30 Minuten abgeschlossen, während die Färbungen mit monophenolischen Substraten für mindestens eine Stunde oder teilweise auch über Nacht bei 4 °C erfolgten. Zur Aktivierung der Proteine dienten 23 mM (0,6 %) SDS in insgesamt 16 ml der Aktivitäts-Färbelösung. Bei den Monophenolen wurde zur Aktivitätssteigerung, anstelle von Phosphat-Puffer, 78 mM Tris-Puffer mit 15 mM MgCl₂ eingesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (Nr. T3824, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und die Negativkontrolle erfolgte mit *Aqua dest.*, anstelle des Aktivators SDS im Färbeansatz. Coomassie-gefärbte Vergleichsgele ermöglichten die Zuordnung der enzymatischen Aktivität zur diskreten Proteinbande. Die Durchführung der Aktivitätstests erfolgte ansonsten wie unter Kap. B4.8.3 beschrieben. Die weiterführende Charakterisierung der Phenoloxidase-Aktivitäten erfolgte mittels des gleichen Testansatzes anhand von verschiedenen immunologisch präzipitierten KLH-Proteinen mittels der sensitiveren 2D-Immunelektrophorese (Kap. B4.8.1 und Kap. B4.8.3).

4.7 Limitierte proteolytische Spaltungen

Das in Untereinheiten dissoziierte KLH wurden mit folgenden Proteasen gespalten:

- Elastase Typ IV aus Schweinepankreas (Sigma-Aldrich/No. E-0258): spaltet spezifisch an Aminosäuren mit kleinen und ungeladenen Seitengruppen, wie sie typischerweise in den Linkerregionen zwischen den Domänen einer Untereinheit vorkommen.
- *Staphylococcus aureus*, strain V8 Endoproteinase Gluc-C (Sigma-Aldrich/No. 45172): spaltet Peptidketten C-terminal nach Glutamat und Aspartat.
- Trypsin Typ XIII aus Rinderpankreas (Sigma-Aldrich/No. T-8642): spaltet Peptidketten spezifisch C-terminal nach Arginin oder Lysin.

Alle Proteasen wurden vor dem Einsatz entsprechend ihrem pH-Optimum in 0,1 M NH₄CO₃ (pH 8,0) gelöst (Lamy *et al.*, 1987). Die jeweilige Protease wurde in der Regel in einer Endkonzentration von 2 % (w/w) zu der Hämocyaninprobe gegeben und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Abweichende Proteasekonzentrationen und/oder Inkubationszeiten sind an

entsprechenden Stellen aufgeführt. Die Proteolyse wurde vor den nachfolgenden Arbeiten durch Zugabe von 1 - 15 mM *Pefabloc*[®] SC und Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C inhibiert. Lediglich bei den mit Elastase gespaltenen Untereinheiten erfolgte ein Abbruch der Spaltung durch Einfrieren bei - 20 °C.

4.8 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Anhand der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (1965) und Weeke (1973) lassen sich wasserlösliche Proteine immunologisch charakterisieren. Hierbei wird ein Proteingemisch in zwei Dimensionen in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine nur aufgrund unterschiedlicher Ladungen, was in einer unterschiedlich schnellen Wanderung der Proteine von der Kathode zur Anode resultiert. Größe und Tertiärstruktur des Proteins spielen hier keine Rolle, da die Agarose durch die niedrige Konzentration kein enges Netzwerk zu bilden vermag. Auch in der zweiten Dimension wandern die bereits getrennten Komponenten wieder von der Kathode zur Anode, hier allerdings gegen einen der Agarose zugegebenen Antikörper. Letzterer bildet mit den elektrophoretisch beweglichen Antigenmolekülen (Proteinen) zunächst lösliche Komplexe, da das Antigen im Überschuss vorliegt. An der Stelle, wo der **Konzentrations-Äquivalenzpunkt** zwischen Protein und Antikörper erreicht ist, verbinden sich beide Moleküle zu einem dreidimensionalen Netz und sind nach der Färbung als charakteristisches, gipfförmiges Präzipitat sichtbar. Bei allen während der Arbeit durchgeführten Immunelektrophoresen befand sich die Anode der ersten Dimension links, die Anode der zweiten Dimension oben im Bild. Anhand der unterschiedlichen Muster der Präzipitate lassen sich Rückschlüsse auf die strukturelle Verwandtschaft zwischen den Proteinen eines Proteingemisches ziehen (Abb. B6). Aufgrund der Proteinauftrennung in zwei Dimensionen spricht man auch von „crossed“ Immunelektrophorese.

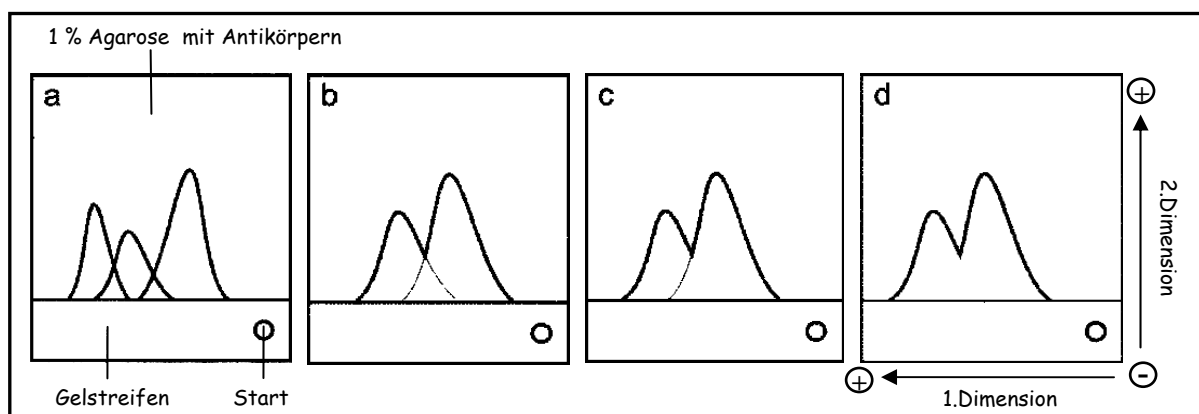


Abb. B6: Grundform der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit möglichen Präzipitationsmustern.
 a) immunologisch nicht identische Proteine; b) immunologisch partiell identische Proteine; c) siehe b), jedoch ist das linke Protein gegenüber dem rechten immunologisch unvollständig; d) immunologisch identische Proteine.
 Quelle: Dissertation Bergmann (2004).

Verwendete Lösungen:

Immunoelktroden-Puffer (5 x):	19 mM Na-Diethylbarbiturat 0,1 M Diethylbarbitursäure pH 8,6
1 % Agarosegel:	1 % (w/v) Agarose M (Amersham Pharmacia, Freiburg) in 1 x Elektrodenpuffer lösen und auf dem Heizblock aufkochen.
Waschlösung:	0,6 % NaCl
Färbelösung:	Methanol /Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v) 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärbelösung:	Isopropanol / Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v)

Verwendete Antikörper (Charles River, Kisslegg/Sulzfeld; gelagert bei -80 °C):

KLH1:	anti-KLH 1/4 aus Kaninchen Nr.4 - polyklonal
KLH2:	anti-KLH 2/V aus Kaninchen Nr.5 - polyklonal
KLH-Gesamt:	Mischung aus anti-KLH1/4 und anti-KLH2/V (1:1)

4.8.1 *Crossed Immunelektrophorese*

Durchführung:**1. Dimension:**

Die Agarose wurde zunächst aufgekocht und 10 ml derselbigen auf eine Glasplatte (10 x 7 cm) pipettiert. Mit Hilfe einer Vorlage wurden je nach gewünschter Proteinkonzentration und Proteinmenge (2 - 4 µg) Löcher mit einem Durchmesser von 2 - 4 mm aus der erstarrten Agarose gestanzt und die Proben in diese aufgetragen. Als Lauffrontmarker dienten jeweils 2 µl Bromphenolblau-Glycerin-Lösung (0,5 % BPB; 20 % Glycerin in H₂O), die separat in den äußersten Probenlöchern in der Agarose mitlief. Damit über der Agaroseplatte ein elektrisches Feld angelegt werden konnte, wurden Pufferbrücken aus Chromatographiepapier 3MM (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) zwischen Gel und Elektroden-Puffer luftblasenfrei aufgelegt. Die Elektrophorese wurde in der ersten Dimension bei 600 V in einer mit Leitungswasser gekühlten (17 °C) Multiphor-Apparatur (Modell 2117, Fa. Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Nach etwa 90 Minuten hatte der Farbstoff das Gel-Ende erreicht und die Elektrophorese wurde gestoppt.

2. Dimension:

Mittels einer Vorlage wurden Gelstreifen (1 cm x 4,2 cm) mit dem aufgetrennten Proteingemisch ausgeschnitten und auf die hydrophile Seite eines geviertelten GelBond[®]-Films (4,2 cm x 5 cm, Stärke 0,2 mm, Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf) transferiert. Anschließend wurden 2 ml geschmolzene und auf 58 °C temperierte Agarose mit dem Antikörper gründlich gemischt und auf die freie Stelle des Gel Bond[®]- Films gegossen. Die

Elektrophorese erfolgte auf die gleiche Weise wie die erste Dimension, allerdings bei 300 V und über Nacht.

Nach dem Lauf wurden ungebundenes Protein und Antikörper zunächst ausgesalzt, um den Hintergrund durch diese Moleküle nach dem Färben möglichst gering zu halten. Hierbei wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 5 Minuten Pressen der GelBond FMC[®] mit angefeuchtetem Filterpapier (Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg)
- 10 Minuten Waschen in 0,6 % NaCl-Lösung
- 5 Minuten Pressen mit angefeuchtetem Filterpapier
- 10 Minuten Waschen in frischer 0,6 % NaCl-Lösung
- 5 Minuten Pressen mit angefeuchtetem Filterpapier
- 10 Minuten Waschen in *Aqua dest.*
- 5 Minuten Pressen mit angefeuchtetem Filterpapier

Im Anschluss wurden die Immungele mit einem Fön getrocknet und anschließend für fünf Minuten in Coomassie[®] Brilliant Blue G 250 gefärbt. Dann erfolgte ein Waschschritt der gefärbten Immungele in *Aqua dest.* und schließlich die Entfärbung in Entfärbelösung. Vor der Auswertung wurden die GelBond[®]-Filme erneut mit dem Fön getrocknet.

4.8.2 *Crossed-line Immunelektrophorese*

Zur immunologischen Bestimmung der strukturellen Verwandtschaft eines Proteins mit einer ursprünglich in der ersten Dimension aufgetragenen Proteinprobe, wird das Verfahren der *Crossed-line* Immunelektrophorese angewendet (Krøll, 1973). Hierbei wird, unmittelbar an den Gelstreifen der ersten Dimension angrenzend, ein(e) Trog/Line (30 mm x 4 mm) ausgeschnitten (Abb. B7). In diesen wird das zu testende und zusammen mit erwärmter Immunoagarose vermischte Protein (4 - 10 µg) in einem Endvolumen von 100 µl pipettiert, um den Trog vollständig zu versiegeln. Ansonsten erfolgt die Durchführung der zweiten Dimension wie bereits unter 4.8.1 beschrieben. Besteht eine strukturelle Verwandtschaft zwischen den Proteinen, so fusioniert das *Line*-Protein mit dem Hauptprotein (Abb. B7 a, b). Werden beide unabhängig voneinander präzipitiert, kann eine Verwandtschaft ausgeschlossen werden (Abb. B7 c).

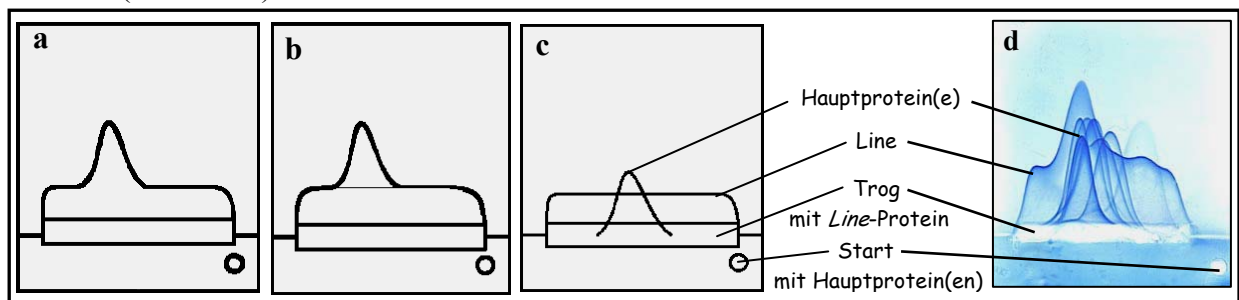


Abb. B7: *Crossed-line* Immunelektrophorese mit möglichen Präzipitationsmustern.

a – c) Schema der *Crossed-line* Immunelektrophorese mit: a) Das Hauptprotein und das *Line*-Protein sind immunologisch identisch. b) Die beiden Proteine sind immunologisch verwandt. Das *Line*-Protein trägt zusätzliche Epitope, die von den Antikörpern erkannt werden. c) Die beiden Proteine sind immunologisch nicht miteinander verwandt. d) *Crossed-line* Immunelektrophorese, wobei das *Line*-Protein nur mit einem der acht aufgetrennten Hauptproteine der ersten Dimension verwandt ist.

4.8.3 Aktivitätsfärbung

Trotz der Auftrennung und der anschließenden immunologischen Präzipitation während der 2D-Immunelektrophorese bleibt die natürliche Struktur und Funktion der Proteine weitestgehend erhalten. Somit lässt sich durch Zugabe eines geeigneten Substrats die eventuell vorhandene enzymatische Aktivität der auf dem GelBond®-Film präzipitierten Proteine nachweisen. Tyrosinasen bzw. Phenoloxidasen lassen sich mit Hilfe des in Kap. 4.12.1 beschriebenen MBTH-Assays (Pifferi & Baldassari, 1973) nachweisen. Dieser Test ist von Nellaiappan und Vinayakam (1993) ursprünglich für Gelsysteme modifiziert worden und wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl zur Ermittlung von Monophenolhydroxylase- als auch zur Bestimmung von Diphenoloxidasen-Aktivitäten an immunologisch präzipitierten Proteinstrukturen eingesetzt. Eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel (Kap. B4.8.1) ermöglichte eine Zuordnung der katalytischen Aktivitäten zu bestimmten Proteinen.

Durchführung:

Nach Beendigung der 2D-Immunelektrophorese wurden die GelBond®-Filme für etwa 10 Minuten in kaltem Phosphat- oder Tris-Puffer (Tab. B5) inkubiert, um den basischen Immunoelktroden-Puffer durch neutralen Puffer (pH 7,0) auszutauschen und so eine Autooxidation des Substrates (Dopamin, Catechol, L-DOPA) zu verlangsamen (Kap. B4.13.1). Anschließend erfolgte die Inkubation der Immuno-Filme in der Aktivitäts-Färbelösung (4 °C), und die Färbung wurde dokumentiert, sobald deutlich gefärbte Präzipitationsgipfel zu erkennen waren. Die Dauer der Inkubation richtete sich hierbei nach der Wahl des Substrates. Reaktionen mit Diphenolen waren in der Regel nach 30 Minuten abgeschlossen, während die Färbungen mit monophenolischen Substraten für mindestens eine Stunde oder teilweise auch über Nacht bei 4 °C erfolgten. Als Substrate wurden für den Nachweis der Diphenolase-Aktivität Dopamin, Catechol und L-DOPA eingesetzt sowie Tyramin, 4-Methylphenol (*p*-cresol) und 4-tert-Butylphenol für den Test auf Monophenolase-Aktivität. Zur Aktivierung dienten 23 mM (0,6 %) SDS in 16 ml der Aktivitäts-Färbelösung. Bei den Monophenolen wurde anstelle von Phosphat-Puffer teilweise 78 mM Tris-Puffer mit 15 mM MgCl₂ zur Aktivitätssteigerung eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten Färbelösungen mit *Aqua dest.* anstelle des Aktivators SDS.

Aktivitäts-Färbelösung	Ansatz pro GelBond®-Film	Stammlösung
1) 62 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 2) 78 mM Tris-Puffer + 15 mM MgCl ₂ , pH7,0	10 ml	1) 100 mM 2) 125 mM + 25 mM MgCl ₂
3,2 mM Substrat	5 ml	10 mM
450 µm MBTH	0,5 ml	13,9 mM
23 mM SDS (0,6 %)	0,5 ml	385 mM (10 %)

Tab. B5: Aktivitäts-Färbelösung des MBTH-Assays für native PAGE und *Crossed IE*.

4.9 Anionenaustausch-Chromatographie (AEC)

Das Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) beruht auf einer in eine Glassäule eingefüllten **stationären Phase**, welche eine starke (quartäres Ammonium, $-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$) oder schwache (Diethylaminoethyl, $-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$), positiv geladene ionische Gruppe trägt. Letztere sitzt an den starren und stark verzweigten Agarosekugeln der Sepharose, die einen Durchmesser von 34 μm haben. Nach der Injektion der Probe durch ein Ventil in die Probenschleife, gelangen die Proteine durch den Druck der Präzisionspumpe mit maximal acht Bar auf die Säule und binden zunächst aufgrund ihrer negativen Eigenladung an die positiv geladenen Gruppen der Agarosekugeln. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden verschiedene lineare oder Stufengradienten mit Hilfe eines Gradientenmischers, welcher die Laufmittel A und B (mobile Phase) in einem zuvor definierten Verhältnis miteinander mischt, über die Säule gegeben. Durch die Änderung der Ionenstärke in der **mobilen Phase** wird die Elutionskraft derselbigen erhöht. Die Proteine eluieren gemäß ihrer relativen Bindungsstärke in der stationären Phase bei kleineren Molekülen in der Regel früher als bei größeren Proteinen, mit einer stärkeren negativen Eigenladung. Die optische Dichte der eluierten Fraktionen wird anschließend in einem Photometer bei 280 nm gemessen, um deren Proteinkonzentration zu bestimmen. Im nachgeschalteten Computer kann ein Elutionsprofil erstellt werden, in dem die Absorptionen als Gipfel dargestellt werden.

Das Verfahren der Flüssigkeits-Chromatographie wurde in dieser Arbeit zur Isolierung einzelner Proteinfragmente eines Protease-Verdaus angewendet. Der Aufbau dieses Trennsystems ist in Abb. B8 schematisch dargestellt. Die Methode entspricht prinzipiell einer HPLC-Apparatur, wobei die Probenauftrennung allerdings unter niedrigerem Druck erfolgte.

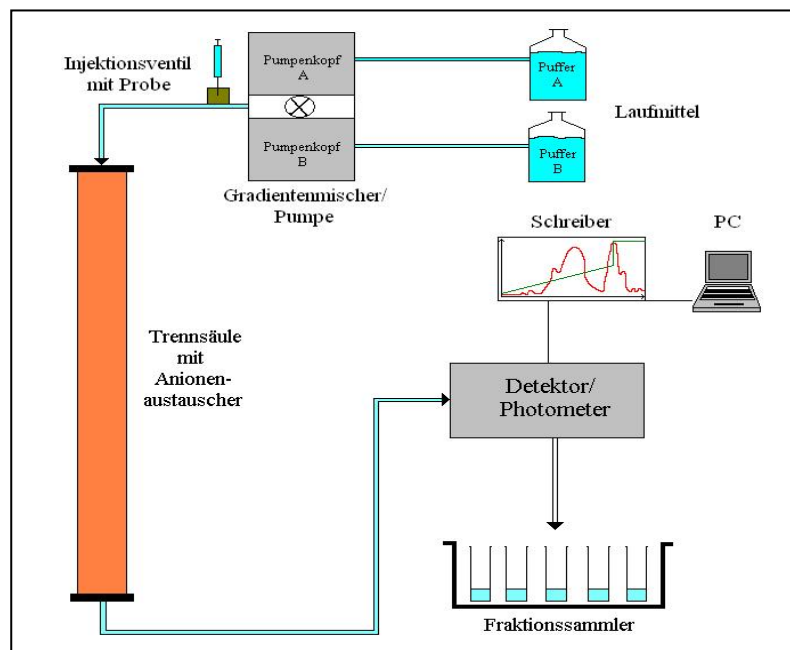


Abb. B8: Schematische Darstellung einer HPLC-Apparatur.

Das Proteingemisch wird über das Injektionsventil auf die Säule aufgetragen und über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Die eluierten Proben werden von einem Fraktionssammler für anschließende Analysen gesammelt und deren Proteinkonzentrationen photometrisch bestimmt. Ein Computer zeichnet das Elutionsprofil für die spätere Auswertung auf.

Anionenaustauschermatrizes (Pharmacia) mit geladener Gruppe:	- Q-Sepharose: Quartäres Ammonium - DEAE-Sepharose: Diethylaminoethyl
Laufmittel A	20 mM Tris, pH 8,0, steril filtriert
Laufmittel B	20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,0, steril filtriert
Säulenbettvolumina	53 ml; 210 ml
Säulenmaße	Länge 30 cm, Ø 15 mm; Länge 30 cm, Ø 30 mm
Flussraten	0,5 ml/Min.; 1 ml/Min. bei Raumtemperatur
Druck	7 – 8 Bar
Elutionszeit pro Fraktion	2 Min.
Max. Auftragsvolumen Probenschleife	5 ml
Wellenlänge	280 nm
NaCl-Gradient (linear)	0 – 0,5 M; 0,16 – 0,5 M; 0,16 – 0,4 M
Dauer der Läufe	160 Min (53 ml-Säule); 220 Min. (210 ml-Säule)

Tab. B6: Einstellungen sowie verwendete Lösungen und Materialien der AEC-Läufe.

Verwendete Geräte:

- Gilson Präzisionspumpe, Modell 321
- Gilson Detektor/Photometer, Modell UV/vis-151
- Gilson Fraktionssammler, Modell FC 203 B
- PC mit Software Unipoint Version 3.3

4.10 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Bei dieser Methode werden Proteine aus einem Gemisch in einer Matrix aus kleinen Partikeln nach ihrer Größe aufgetrennt (Größenausschluss-Chromatographie = SEC). Die Partikel besitzen Poren definierter Größe, die so gewählt ist, dass kleine Proteine eindringen können, größere allerdings nicht. Als Matrix wurde das Bio-Gel[®] der Fa. BioRad (München) eingesetzt. Es besteht aus Polyacrylamidkugeln, welche durch die Co-Polymerisation von Acrylamid und N-N'-Methylen-Bisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Während des Laufs in der *Econo*-Chromatographiesäule können kleinere Moleküle in das dreidimensionale Netzwerk der Polyacrylamidkugeln einwandern und werden so zurückgehalten, während größere Moleküle die Säule mit der mobilen Phase ungehindert passieren können. Als Folge der weiteren Laufstrecke der kleineren Proteine eluieren die größeren Moleküle zuerst von der Säule. Mittels eines Detektors wurde die Extinktion der Fraktionen nach Austreten aus der Säule bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und von einem Flachbettstreifen graphisch festgehalten. Zur späteren Analyse der eluierten Proben wurden die einzelnen Fraktionen für jeweils 13 Minuten von einem Fraktionssammler gesammelt. Der schematische Aufbau einer Gelfiltrations-Apparatur ist in Abb. B9 dargestellt. Die Einstellungen der Geräte blieben bei den Trennungen weitestgehend unverändert, lediglich die Empfindlichkeit des Detektors wurde den jeweils aufgetragenen Proteinmengen angepasst (0,5 – 10 mg).

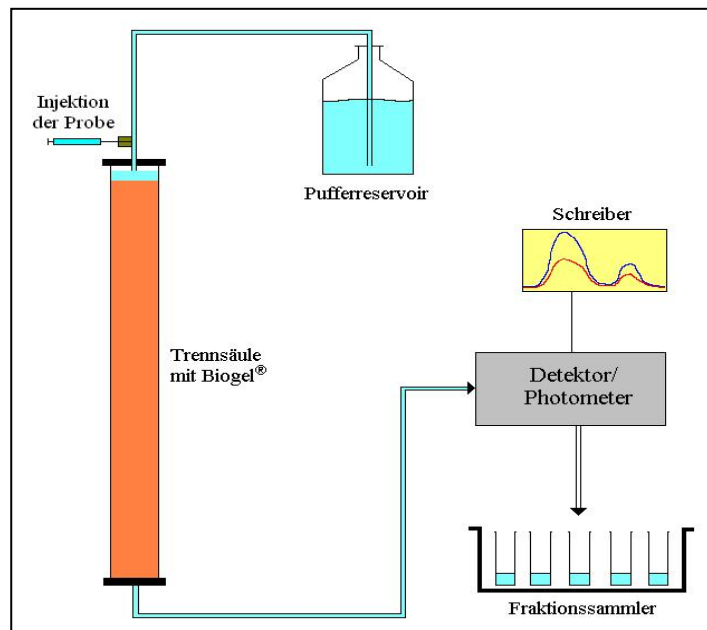


Abb. B9: Schematische Darstellung einer Gelfiltrations-Apparatur.

Die eluierten Fraktionen werden von einem Fraktionssammler für anschließende Analysen gesammelt und die Proteinkonzentrationen in einem Photometer gemessen. Das Elutionsprofil wird von einem Schreiber für eine spätere Auswertung aufgezeichnet.

Gelmedium (Biogel® , Fa. BioRad) mit Trennbereich (M_w):	P-60: 3000 – 60000 Da P-100: 5000 – 100000 Da A-15m: 40000 – 15000000 Da
Elutionsmittel	Stab.-Puffer, pH 7,4/8,5 (Kap. B4.1 + B4.3) Gly/OH-Puffer, pH 9,6 (Kap. B4.4)
Säulenbettvolumen	210 ml
Säulenmaße	Länge 120 cm, Ø 15 mm
Flussraten	0,5 – 1 ml/Fraktion (je nach Gelmedium)
Elutionszeit pro Fraktion	13 Min.
Max. Auftragsvolumen	1 ml
Wellenlänge	280 nm

Tab. B7: Einstellungen sowie verwendete Lösungen und Materialien der SEC-Läufe.

Verwendete Geräte:

- Gilson M 115 UV Detektor (Abimed, Langenfelden)
- Gilson FC 203 Fraktionssammler (Abimed, Langenfelden)
- Flachbettschreiber (Kipp & Zonen, Holland)

4.11 Langzeitlagerung der zur Kristallisation bestimmten Proteinproben

Für kristallographische und strukturbestimmende Projekte ist eine längerfristige Lagerung der Proteinlösung unabdingbar. Die übliche Methode des Einfrierens in einer Glycerol-Lösung kann insofern problematisch sein, dass dieses Gefrierschutzmittel Einfluss auf eine erfolgreiche Kristallisation haben kann und daher nach dem Auftauen durch Dialyse entfernt werden muss. Eine längere Lagerung bei 4 °C ohne Einfrieren kann die Proteinprobe hingegen durch Proteolyse, Oxidation oder Degradation beeinträchtigen. Da es im Rahmen

dieser Arbeit entscheidend war, bis zur erfolgreichen Kristallisation eine stabile Proteinprobe zu besitzen, wurde auf die Methode von Deng *et al.* (2003) zurückgegriffen. Hierbei wurden Aliquots des zu kristallisierenden Proteins in dünnwandigen, 0,2 ml PCR-Tubes eingefroren, indem sie mit zwei Pinzetten in flüssigen Stickstoff eingetaucht wurden. Die Eintauchdauer richtete sich dabei nach dem Aliquotvolumen (Abb. B10).

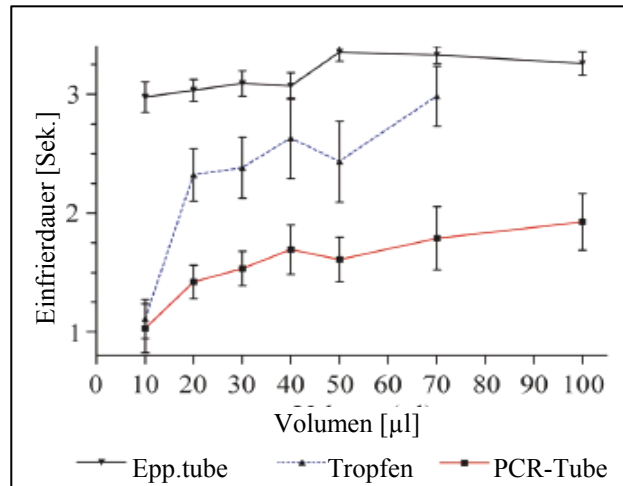


Abb. B10: Inkubationsdauer der zur Kristallisation bestimmten Proteinprobe in flüssigem Stickstoff bei unterschiedlichen Aliquotvolumina (verändert nach Deng *et al.*, 2003).

Die geringste Einfrierzeit ergibt sich beim Einfrieren in dünnwandigen PCR-Tubes. Diese Methode ist durch das sehr schnelle Einfrieren zugleich am schonendsten für die Proteine. Die Werte sind ein Mittelwert von 10 Wiederholungen.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Proteinprobe in den dünnwandigen PCR-Tubes schneller gefriert, als durch direktes Einfrieren eines Probentropfens in flüssigem Stickstoff oder in dickwandigen Eppendorf-Tubes. Generell kann ein Einfrieren zur Denaturierung und Aggregation der Proteine führen, da es zu Änderungen des pH-Werts oder zur wassereiskristall-induzierten Protein- und Lösungsmittelkonzentrierung kommen kann (Franks, 1985). Sehr schnelles Einfrieren wie im Falle der dünnwandigen (~ 1mm) PCR-Tubes kann diese Effekte minimieren und verhindert ein Ausfallen des Proteins nach dem Auftauen.

4.12 Proteasenaktivitäts-Nachweis mittels Azocasein

Diese recht einfache Methode beruht auf der Kopplung von Casein an einen roten Azofarbstoff, wodurch eine kolorimetrische Quantifizierung der proteolytischen Aktivität einer Probe erfolgen kann. Bei dem Substrat handelt es sich um das künstliche Protein Azocasein, welches sich z.B. durch derivatisierte bzw. diazotierte Phenylalanin- und Tryptophanreste des Caseins (diazotiertes Casein) auszeichnet. Aus den konjugierten Doppelbindungen der Aminosäurederivate resultiert die typische gelbe Färbung des Substrats. Durch proteolytische Aktivität werden diese diazotierten Peptide abgespalten und lösen sich im wässrigen Medium, so dass diese farblos erscheint (Abb. B11). Die Lichtabsorption entspricht hierbei der Menge/Konzentration an gelösten Peptiden und somit der

Spaltungsaktivität der Protease. Die Extinktion der Lösung zur Quantifizierung der Azocasein-Hydrolyse wird bei 340 nm gemessen.

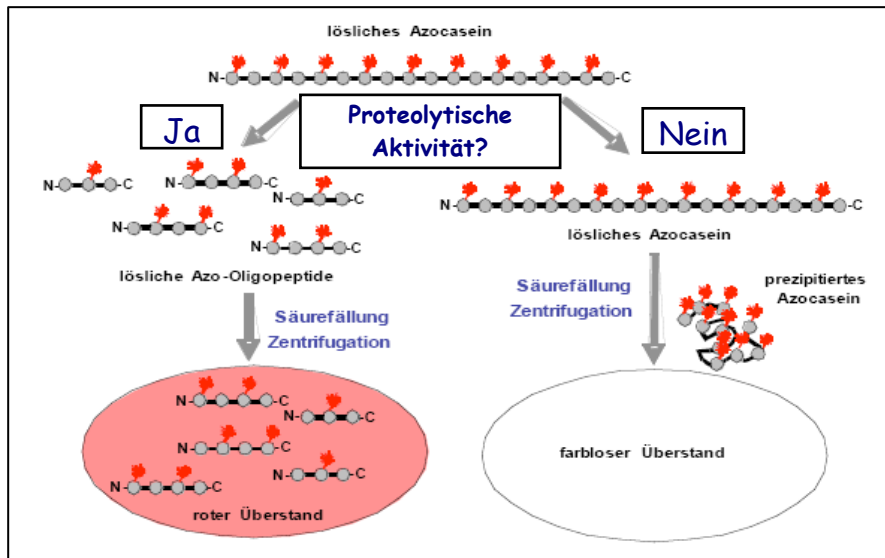


Abb. B11: Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocasein-Assay.

Die Extinktion der Lösung bei 340 nm ist ein Maß für die Hydrolyse des Azocaseins und somit für die Spaltungsaktivität der Protease.

Quelle: verändert nach www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio-132_05/pdf/28enzymes05.pdf

Durchführung:

Es wurden 200 µl der Azocasein-Lösung zusammen mit 50 µl der jeweiligen Probe für fünf Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Falls möglich erfolgten Doppelansätze. Als Positivkontrolle dienten gleiche Mengen der Protease, wie bei den Spaltungsansätzen (Kap. B4.7) im jeweiligen Puffer, als Negativkontrollen ausschließlich die entsprechenden Pufferlösungen ohne Protease. Anschließend erfolgte eine Säurefällung mittels Zugabe von 600 µl Trichloressigsäure zu den Ansätzen, gefolgt von einer fünfminütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) bei 5000 x g. Die Extinktion zur Ermittlung der Lichtabsorption wurde schließlich in einem UV/Visible Spectrophotometer „*Ultrospec 3100 pro*“ (Amersham Biosciences, München) bei 340 nm bestimmt.

Verwendete Lösungen:

Azocasein-Lösung:	11 mg/ml Azocasein → in Ethanolamin lösen
Ethanolamin:	20 mM + 140 mM NaCl pH 9,5
Trichloressigsäure:	5 %-ig

4.13 Enzymaktivitätstests

Zur Untersuchung von Monophenolhydroxylase- (Tyrosinase) bzw. Diphenoloxidase-Aktivitäten (Tyrosinase, Catecholoxidase) verschiedener nativer KLH-Strukturen wie

Didekameran, Untereinheiten oder funktionellen Einheiten wurde der MBTH-Assay verwendet. Quantitative Aussagen bezüglich der Aktivität erfolgten mit Hilfe von kinetischen Messungen im Spektralphotometer, während qualitative Bestimmungen durch Aktivitätsfärbungen anhand der nativen PAGE (Kap. B4.6.3) sowie der sensitiveren 2D-Immunelektrophorese (Kap. B4.8.3) durchgeführt wurden.

4.13.1 MBTH-Enzymassay

Die katalytische Umsetzung von Mono- und Diphenolen zu den entsprechenden Chinonen erfolgt durch Tyrosinasen bzw. Phenoloxidasen. Diphenoloxidasen oxidieren u.a. L-DOPA zu DOPAchinson, das schließlich nichtenzymatisch zum DOPAchrom zyklisiert (Abb. B11). Auch die Polymerisation zu Melanin über das intermediäre Indol-5,6-Chinon erfolgt ohne weitere Enzyme. Zum Nachweis von Diphenoloxidasen wird häufig der DOPAchrom-Assay angewendet, wobei spektroskopisch die Bildung des rötlichen DOPAchroms bei 475 nm verfolgt wird, um quantitative Aussagen bezüglich der Enzymaktivität machen zu können. Der Vorteil dieses Assays besteht darin, dass keine weiteren Reagenzien für die Nachweisreaktion benötigt werden. Allerdings wird die anschließende Katalyse bis hin zum Melanin nicht unterbunden (Mason, 1948). Hierin liegt der entscheidende Vorteil des von Pifferi und Baldassari (1973) eingeführten und von Winder und Harris (1991) sowie Jaenicke (2002) weiter entwickelten MBTH-Assays (Abb. B12), der auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde.

MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydraxon), auch als *Besthorns Hydraxon* bekannt, reagiert in einer Michaelis-Addition mit einem Chinon zu einem auch im sauren Milieu (pH 1) stabilen, violetten Reaktionsprodukt. Dessen Absorptionsmaximum liegt, je nach Substrat, bei etwa 494 - 507 nm (Rodríguez-López *et al.*, 1994; Espin *et al.*, 1997) und wird zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen. Die autokatalytische Weiterreaktion der Chinone zu Melanin wird bei dieser Methode verhindert (Abb. B12). Da der molare Absorptionskoeffizient beim Umsatz von Tyrosin bzw. DOPA für das DOPAchinson-MBTH-Addukt bei 507 nm bei $22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ liegt (Espin *et al.*, 1997), ist der Test somit 6-mal sensitiver als der DOPAchrom-Assay.

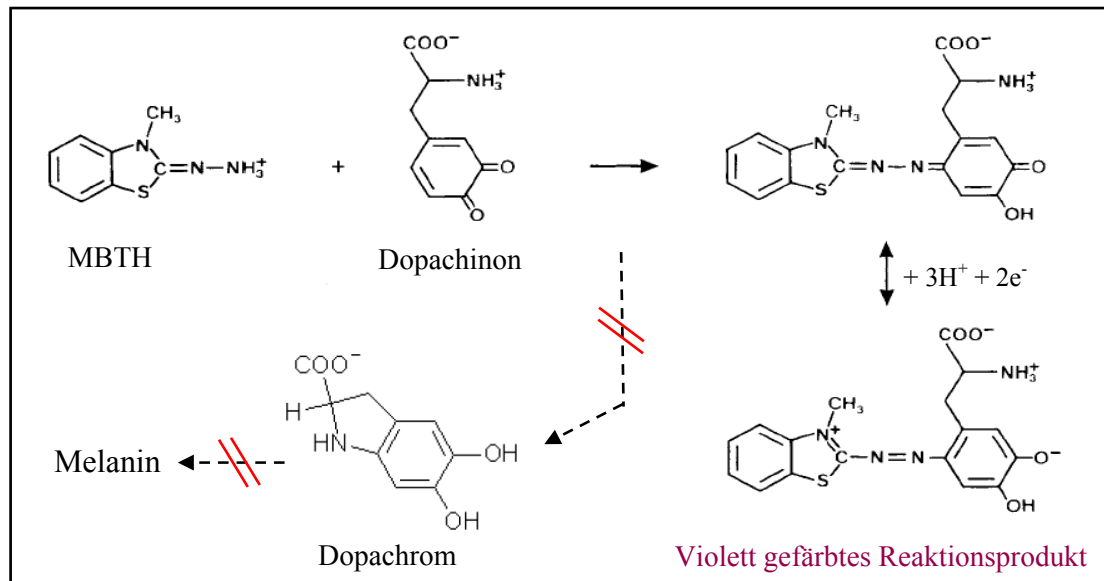


Abb. B12: Reaktion von DOPachinon mit MBTH (verändert nach Winder & Harris, 1991).

DOPachinon entsteht beim Umsatz von L-DOPA (hier als Beispiel für ein diphenolisches Substrat) und reagiert mit MBTH in einer Michael-Addition zu einem violetten gefärbten Pigment. Eine autokatalytische Weiterreaktion der Chinone zu Melanin wird verhindert. Andere Mono- und Diphenole reagieren mit MBTH auf ähnliche Weise. *MBTH*: 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon.

4.13.2 Kinetiken

Die quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte anhand der Bildung des violetten Reaktionsprodukts im MBTH-Assay. Obwohl die Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte, je nach Substrat, zwischen 494 – 507 nm variieren (Espin *et al.*, 1997), wurden die Kinetikmessungen für alle getesteten Substrate bei 505 nm durchgeführt und die relativen Umsatzraten ($\Delta OD_{505nm}/Min.$), soweit möglich, im *steady state* bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren von 340 – 600 nm sowie der Messung der Zunahme der OD_{505nm} diente ein *Hitachi U-3000 Spektrophotometer* (Uwe Binninger Analytik, Schwäbisch Gmünd). Die Temperierung der Proben erfolgte in einem *Thermo Haake* (Karlsruhe) C35-P Wasserbad bei 25 °C. Referenzläufe wurden mit gleichen Volumina des jeweiligen Proteinpuffers anstelle des Proteins/Enzyms durchgeführt und von den eigentlichen Probenspektren abgezogen. Bei Ansätzen zur Messung intrinsischer Enzymaktivität ohne SDS-Aktivierung, dienten gleiche Volumina *Aqua bidest.* anstelle des Aktivators.

Lösung	Ansatz (1 ml)	Stammlösung
<u>Protein/Enzym:</u> 1,0 mg/ml (Monophenol-Umsatz) 0,2 mg/ml (Diphenol-Umsatz)	200µl	5 mg/ml 1 mg/ml
<u>4 mM Substrat in:</u> 1) 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH7,0 <u>oder</u> 2) 50 mM Tris-Puffer (mit 0/10/20 mM MgCl ₂ /CaCl ₂), pH 7,0	400 µl	<u>10 mM Substrat in:</u> 1) 0,25 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0 <u>oder</u> 2) 125 mM Tris-Puffer (mit 0/25/50 mM MgCl ₂ /CaCl ₂), pH 7,0
0,2 mM MBTH in <i>Aqua bidest.</i>	200 µl	1 mM
2 mM SDS	200 µl	10 mM

Tab. B8: Reaktionsansätze und dazugehörige Komponenten des MBTH-Assays für Messungen im Spektralphotometer.

Durchführung:

Die Messungen der Reaktionsansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1000 µl in Halbmikro-Einwegküvetten (Plastibrand 1,5 ml PMAA Küvetten, Roth, Karlsruhe). Die Stammlösungen der entsprechenden Puffer wurden zum Ansetzen der Substratlösungen verwendet und mit den übrigen Reagenzien im Reaktionsansatz entsprechend verdünnt (Tab. B8). Somit konnte auf eine zusätzliche Zugabe zur Volumenergänzung der Ansätze verzichtet werden. Als Substrate (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) kamen die Monophenole Tyramin (4-Hydroxyphenethylamin) und 4-Methylphenol (*p*-cresol) sowie die Diphenole Catechol (1,2-Dihydroxybenzol), Dopamin (3,4-Dihydroxyphenethylamin) und L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin), mit einer Konzentration von jeweils 4 mM, zum Einsatz. Zur Messung der Kinetiken wurde in der Regel Phosphat-Puffer pH 7,0 eingesetzt. Um den Einfluss des Puffers auf die Umsatzraten zu untersuchen, wurden Messungen in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,0) durchgeführt. Nach Zugabe der Proteinlösung (in Gly/OH-Puffer, pH 9,6) hatte die Reaktionslösung einen pH-Wert von 7,4. Bei Untersuchungen zum Einfluss von Mg²⁺ und Ca²⁺-Ionen wurden dem Tris-Puffer zusätzlich 0/10/20 mM MgCl₂ bzw. CaCl₂ hinzugefügt. Alle Messungen erfolgten unter gleichwertigen Bedingungen und Konzentrationen, mit Ausnahme der Protein-/Enzymkonzentrationen. Diese betragen bei den Messungen der Diphenol-Umsätze 0,2 mg/ml im Ansatz, wurden bei den Messungen der Monophenol-Umsätze allerdings zur Reduzierung der *Lagphase* auf 1 mg/ml erhöht (Duckworth *et al.*, 1970; Garcia-Cánovas *et al.*, 1980). Die Stammlösungen der Puffer wurden bei 4°C gelagert, während Substrat- und MBTH-Stammlösungen unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt und bis zur Messung dunkel und auf Eis aufbewahrt wurden, um eine Autooxidation der Diphenole zu verzögern. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in Ethanol wurde *Aqua bidest.* verwendet. Als Aktivator diente eine 10 mM Stammlösung von SDS, welche längerfristig bei

Raumtemperatur gelagert werden konnte. Puffer, Substrat, (Aktivator) und Protein/Enzym wurden vor Beginn der Messung direkt in der Einmal-Messküvette (Fa. Roth, Karlsruhe) gemischt und ca. 30 Sekunden, bei 25 °C, im Spektralphotometer temperiert. Die Messungen der Spektren sowie die Verfolgung der relativen Umsatzraten bei 505 nm wurden bei Diphenolen für 20 Minuten gemessen, Monophenolkinetiken wurden für 60 Minuten oder teilweise auch über Nacht verfolgt. Die quantitative Darstellung der Spektren erfolgte, vor allem bei den diphenolischen Messungen mit starker Autooxidation der Substrate, durch manuellen Abzug der entsprechenden Referenzläufe mit Puffer anstelle von Protein/Enzym.

5 *Allgemeine biophysikalische Methoden*

5.1 **Röntgenstrukturanalyse**

Zur Bestimmung der atomaren Auflösung, d.h. zur Ermittlung eines dreidimensionalen Strukturmodells eines Proteins mit den Positionen der einzelnen Atome, reichen elektronenmikroskopische Techniken aufgrund der zu geringen Auflösung häufig nicht mehr aus. Man benötigt hierzu röntgenkristallographische Methoden, welche nicht nur Kenntnisse über die Faltung der Polypeptidkette vermitteln, sondern vielmehr auch die Proteinfunktion auf molekularer Ebene verständlich machen. Voraussetzung für eine atomare Auflösung ist ein Proteinkristall, an welchem durch Beugung von Röntgenstrahlen auf die Anordnung der Atome im Kristall zurückgeschlossen werden kann. Die Röntgenstrukturanalyse erfordert mehrere Arbeitsschritte, die im Folgenden kurz näher beschrieben werden.

5.1.1 *Kristallisation*

Zur Röntgenstrukturanalyse wird das Protein in kristallinem Zustand benötigt. Um eine Kristallisation zu ermöglichen, sollte das Protein in bestmöglicher Homogenität gereinigt vorliegen, was in dieser Arbeit durch SDS-PAGE (Kap. B4.6.1) überprüft wurde. Zur Erzielung einer möglichst hohen Auflösung sollten die einzelnen Kristalle möglichst groß und perfekt aufgebaut sein. Da die Eigenschaften eines Proteins wie Molekulargewicht, Aminosäuresequenz oder isoelektrischer Punkt im Allgemeinen keinen Hinweis auf die Bedingungen der Kristallisation geben, ist sie eine Technik, die auf dem Prinzip von Versuch und Irrtum basiert. Somit ist eine Reinigung des gewünschten Proteins in größeren Mengen, was u.a. auch ein Ziel dieser Arbeit war, von entscheidendem Vorteil bei der Suche nach den optimalen Bedingungen.

Das Prinzip der Kristallisation beruht darin, dass Moleküle aus einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand übergehen. Diese Übersättigung der Proteinlösung wird in der Regel durch Hinzufügen eines sogenannten **Präzipitans** erreicht, welches die Proteine bei einer bestimmten Konzentration aus der Lösung verdrängt. Als Präzipitans werden Salze, organische Verbindungen oder Alkohole häufig auch in Verbindung mit verschiedenen Fällungsmitteln eingesetzt. Zudem unterliegt die Kristallisation den Parametern pH-Wert sowie Temperatur, und die Ansätze können entsprechend variiert werden.

Eine weitere wichtige Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Kristallisation, neben großer Reinheit des Proteins, ist die Überwindung der sogenannten **Keimbildungsbarriere**. Das Problem besteht darin, dass sich Kristallisationskeime generell nur in übersättigten Lösungen bilden, diese jedoch eher ungünstig für das Kristallwachstum sind, da hier bevorzugt viele kleine Kristalle entstehen. Um in den für das Wachstum günstigen **metastabilen Bereich** der Lösung zu gelangen, in dem sich allerdings keine Kristallisationskeime bilden, bedient man sich der sogenannten **Dampfdiffusionsmethode**. Hierbei wird die Proteinlösung mit der Fällungslösung gemischt und in einem versiegelten Raum einem sehr viel größeren Reservoir der Fällungslösung gegenübergestellt. Als Folge der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen kommt es zu einem Transport von Wassermolekülen in Richtung Reservoir. Die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen nimmt daraufhin zu, bis die Keimbildungsbarriere überschritten ist und Kristallisationskeime gebildet werden. Die Konsequenz daraus wiederum ist eine Verringerung der Proteinkonzentration im Tropfen, was im idealen Fall im metastabilen Bereich endet, in dem keine Kristalle mehr entstehen, sondern die vorhandenen wenigen Keime langsam weiterwachsen (Abb. B13).

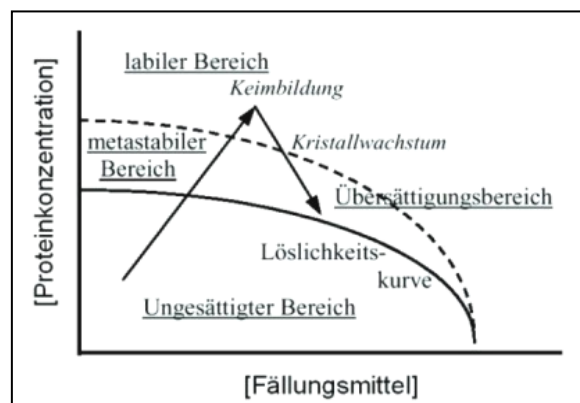


Abb. B13: Phasendiagramm der optimalen Proteinkristallisation.

Die Pfeile repräsentieren den Konzentrations-Zeit-Verlauf während des Kristallisationsprozesses.

Quelle: <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/~paddy/dipl/node38.html>

Zur Kristallisation mittels Dampfdiffusion existieren zwei gängige Methoden: *Sitting drop* und *Hanging drop* (Abb. B14).

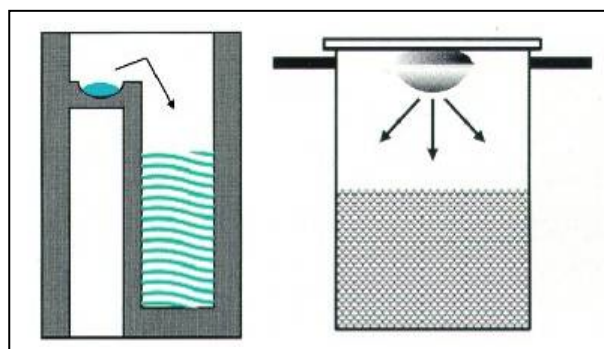


Abb. B14: Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode im *Sitting*- bzw. *Hanging drop*-Verfahren.

Links: *Sitting drop*- und rechts *Hanging drop*-Methode. Die Pfeile symbolisieren die Richtung des Wassertransports vom Proteintropfen mit niedriger Fällungsmittelkonzentration, in Richtung Pufferreservoir mit höherer Fällungsmittelkonzentration.

Quelle: <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/~paddy/dipl/node38.html>

Beide Methoden kamen auch bei dieser Arbeit zum Einsatz und wurden in Zusammenarbeit mit Jun.-Prof. Dr. [REDACTED] (*Inst. für Molekulare Biophysik, Uni Mainz*) durchgeführt:

Durchführung generell:

- Klimaanlage während dem Ansetzen ausschalten
- Sauber arbeiten (Handschuhe, Mundschutz)!
- Löcher der 4 x 6-Mikrotiterplatten für spätere luftdichte Verklebung der Deckgläschen mit Vaseline umranden
- Ansätze planen mit 1 ml Endvolumen
- Proben vor dem Ansetzen abzentrifugieren
- Kontrolle der Ansätze im Binokular direkt nach dem Ansetzen auf eventuelle Proteinausfällungen und Verunreinigungen
- Weitere Kontrolle der Ansätze auf beginnende Kristallisation nach jeder Woche

Durchführung *Sitting drop*:

- Stege mit Pinzette in die Löcher der 4 x 6-Mikrotiterplatte einsetzen
- 3 µl Protein- und 3 µl Fällungslösung in Probenloch im Steg auftragen
- Restliche Fällungslösung in Reservoir pipettieren
- Nicht-silikonisiertes Deckglas vorsichtig aufsetzen und andrücken

Durchführung *Hanging drop*:

- 3 µl Protein- und 3 µl Fällungslösung auf silikonisiertes, hydrophobes Deckglas pipettieren
- Restliche Fällungslösung in Reservoir pipettieren
- Das Deckglas mit dem Tropfen Richtung Pufferreservoir vorsichtig aufsetzen und andrücken

Neben diesen zwei gängigen Methoden existiert noch die *Batch-Kristallisation* unter Öl. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst freundlicherweise vom *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* im *Microbatch*-Verfahren durchgeführt, um so eine schnellere Detektion der Kristallisationsbedingungen der aufgereinigten FU KLH1-h zu erzielen. Das Verfahren lässt sich mit der Dampfdiffusionsmethode vergleichen, sofern wasserdurchlässige Öle verwendet werden (z.B. Silikonöl). Hierbei wird der Tropfen aus Proteinlösung und Fällungsmittellösung nach dem Zusammenpipettieren mit Öl überschichtet und dann bei 18 °C gelagert. Der einzige Unterschied zur *Hanging-* bzw. *Sitting drop*-Methode ist, dass der Wasserentzug nicht bei einer bestimmten Konzentration endet und der Tropfen somit völlig austrocknen kann. Die Bedingungen der Kristallisation bzw. dessen Ansätze sind in den Tabellen B9 und B10 aufgeführt.

Bedingungen	Screening 1	Screening 2
Fällungslösung/Präzipitans:	8 % (w/v) PEG 1000 50 mM K ₂ HPO ₄ 50 mM Na-Citrat, pH 4,0	5 % (w/v) PEG 6000 0,1 M Zitronensäure, pH 5,0
Temperatur	20 °C	20 °C
Proteinkonzentration im Ansatz	~ 10 mg/ml	~ 10 mg/ml
Pufferlösung des Proteins	10 mM Tris, pH 8,0	10 mM Tris, pH 8,0

Tab. B9: Vom *Hauptman-Woodward Medical Research Institute* (Buffalo, USA) ermittelte Bedingungen zur Kristallisation der FU KLH1-h.

Lösung	Ansatz für ein Well (1 ml)	Stammlösung
50 mM K ₂ HPO ₄	50 µl	1 M
50 mM Na-Citratpuffer, pH 4,0	50 µl	1 M
8 % (w/v) PEG 1000	320 µl	25 % (w/v)
H ₂ O	580 µl	/

Tab. B10: Kristallisationsansätze des *Instituts für Molekulare Biophysik* (Uni Mainz), am Beispiel des ersten Screenings der FU KLH1-h (Tab. B9).

5.1.2 Charakterisierung der Kristalle

Proteinkristalle bestehen aus bis zu 10^{12} Molekülen und können von unterschiedlicher Größe und Form sein. Für die Röntgenstrukturanalyse sind Kantenlängen von 0,1 bis 0,5 mm sehr gut geeignet. Die Kristalle können weiter in sogenannte **Einheitszellen** unterteilt werden, die das gesamte Kristallgitter aufbauen. Die Kanten jeder Einheitszelle sind gleichbedeutend mit den sogenannten **Kristallachsen**. Alle Einheitszellen weisen in der Regel eine interne Symmetrie auf, das heißt, sie zeigen immer wiederkehrende Anordnungen, welche z.B. durch Rotation um eine Achse ineinander überführt werden können. Folglich lässt sich die Einheitszelle durch eine kleinere, sogenannte **asymmetrische Einheit** beschreiben, die durch Anwendung der Symmetrioperationen eine Einheitszelle ergibt. Sie ist somit insgesamt das kleinste wiederholte Muster, das im Kristall regulär auftaucht. Durch die Kombination der Gittertypen mit einer oder mehreren Symmetrioperationen erhält man die **Raumgruppen**. Nach der erfolgreichen Kristallisation erfolgt mittels Röntgenbeugung zunächst eine Charakterisierung der Raumgruppen, sowie der Größe der Einheitszelle, um Hinweise auf die Qualität der Kristalle in Bezug auf die spätere erreichbare Auflösung zu gewinnen.

5.1.3 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

Die experimentelle Messanordnung zur Röntgenbeugung besteht aus einer Röntgenstrahlungsquelle sowie einem Detektor zur Messung der gebeugten Röntgenstrahlen. Zur Erzeugung von Röntgenstrahlung im Labor kommt ein Drehanoden-Röntgengenerator zum Einsatz (Abb. B15). In der Regel ist dieser mit einer Kupferanode ausgestattet und erzeugt Röntgenstrahlen mit einer Wellenlänge von 1,54 Å. Häufig wird, wie u.a. auch in dieser Arbeit, die Röntgenstrahlung am Synchrotron eingesetzt. Der Vorteil besteht hier in einer wesentlich

intensiveren Strahlung (Wellenlängen variabel von $0,2 - 4 \text{ \AA}$), was auch die Röntgenstrukturanalyse von sehr kleinen Kristallen erlaubt.

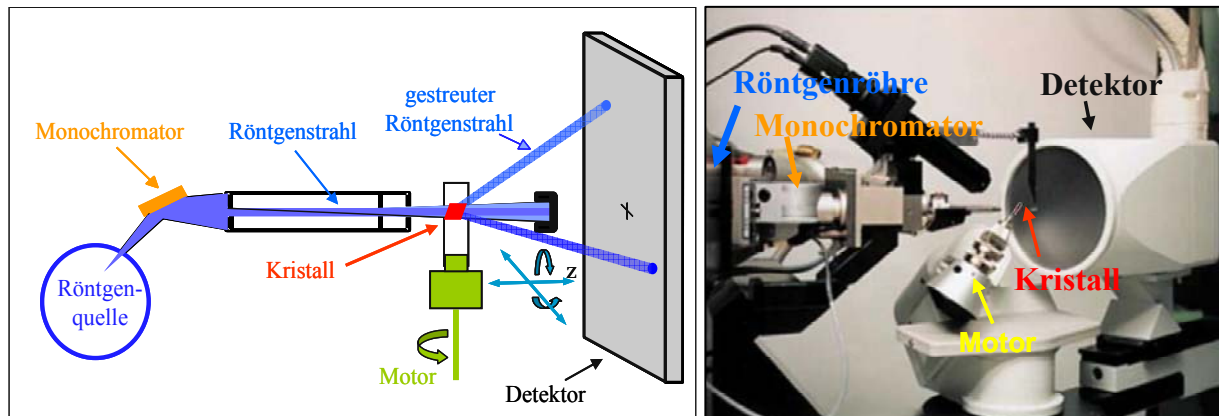


Abb. B15: Schemazeichnung und Foto einer Röntgenstrahlungsquelle (Drehanode) zur Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten an einem Proteinkristall.

Zur Erzeugung von Röntgenlicht mit nur einer Wellenlänge wird ein Monochromator verwendet. Die Intensitäten der am Kristall gestreuten Röntgenstrahlen werden von einem Detektor (*Image Plate*) ermittelt.

Im Folgenden soll kurz auf die physikalischen Grundlagen der Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen eingegangen werden:

Nachdem ein Röntgenstrahl einen Kristall getroffen hat, verlässt der größte Teil dieses **Primärstrahls** diesen wieder unverändert. Ein Teil tritt jedoch in Wechselwirkung mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall, was in deren Anregung resultiert. Nach Rückkehr der angeregten Elektronen in den Grundzustand, wird Röntgenstrahlung gleicher Frequenz in Form kugelförmiger Sekundärwellen in alle Richtungen emittiert. Die so von den Atomen jeder Einheitszelle ausgehenden Streuwellen gleicher Amplitude interferieren miteinander und ergeben die resultierende Streuwelle des Kristalls. Hierbei kommt es je nach Abstand der Atome untereinander für die neu entstehenden Streuwellen zu unterschiedlichen Phasenverschiebungen. Die sich periodisch wiederholende räumliche Anordnung der Atome im Kristallgitter kann in einer **konstruktiven** oder **destruktiven Interferenz** der von den Atomen abgegebenen Röntgenstrahlung resultieren. Die Art der Interferenz hängt hierbei vom Abstand der Atome untereinander ab. Da Kristalle aus dreidimensionalen und periodisch angeordneten Einheitszellen bestehen, sind die Phasenverschiebungen der von den einzelnen Atomarten jeder Einheitszelle ausgehenden Wellen über den gesamten Kristall identisch. Die Phasenverschiebung hängt allerdings nicht nur vom Abstand der Einheitszellen ab, sondern auch von der Streu- und Beobachtungsrichtung. Dies gilt entsprechend auch für eine Partialwelle, die von einer Einheitszelle in der dritten Raumrichtung entsteht. Da im Kristall sehr viele Wellen aufaddiert werden, genügt bereits eine geringfügige Phasenverschiebung für eine destruktive Interferenz der resultierenden Streuwelle. Folglich sind die Streuwellen eines Kristalls in den allermeisten Richtungen ausgelöscht. Einzelne Schichten von identischen Atomen innerhalb eines Kristalls fasst man mathematisch zu sogenannten **Netzebenen** zusammen. Dies sind Ebenen, die durch Gitterpunkte der Einheitszellen gehen. Die Ebenen einer **Netzebenenschar** (unendlich viele parallele Ebenen) haben einen charakteristischen

Abstand d zueinander, welcher wiederum für den Phasenunterschied der entstehenden interferierenden Röntgenstrahlung bestimmend ist.

Das **Braggsche Gesetz** ist die zugrunde liegende mathematische Beziehung für die Ermittlung der Struktur aus dem der Röntgenbeugung erhaltenen Beugungsbild:

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

mit d = Netzebenenabstand,

θ = Winkel zwischen dem einfallenden Strahl und der Gitterebene,

n = Ordnung der Reflektion,

λ = Wellenlänge der Röntgenstrahlung,

Die linke Seite der Bragg-Gleichung beschreibt den Phasenunterschied zweier an zwei Netzebenen mit dem Abstand d gebeugten Röntgenstrahlen. Beträgt dieser ein ganzzahliges Vielfaches ($n = 1, 2, 3 \dots$) der Wellenlänge, kommt es zu konstruktiver Interferenz. Diese gilt dann für alle parallelen Ebenen, da für diese der Wegunterschied auch ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Es gibt also für jede Netzebenenschar nur bestimmte Winkel unter denen Reflexion stattfindet. Tatsächlich ist das vom Detektor aufgenommene Röntgenbeugungsbild das Ergebnis der durch konstruktive Interferenz entstandenen Röntgenstrahlen aller Atome im Kristall. Die Richtung des gebeugten Röntgenstrahls ist hierbei von der Art des kristallinen Gitters abhängig. Zur Orientierung von möglichst vielen Kristallebenen im Beugungswinkel zum Primärstrahl wird der Kristall im Röntgenstrahl gedreht, um Beugungsbilder unter verschiedenen Winkeln zu erhalten. Hierbei gilt, dass ein Kristall mit hoher Symmetrie insgesamt weniger gedreht werden muss, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Die Intensität der aufgenommenen **Braggreflexe** aller Atome in jedem Reflex beinhaltet die Information über die Struktur des untersuchten Moleküls und kann bestimmt werden. Sie ist proportional zum Quadrat des Streufaktors der Elektronen in der Einheitszelle. Da die vom Detektor aufgenommenen Braggreflexe die Kristallstruktur im **inversen Raum** wiedergeben, ist die zu erwartende Auflösung der Röntgenstruktur umso höher, je weiter außen die Reflexe am Detektor liegen. Konstruktive bzw. destruktive Interferenz kann man aus erscheinenden Reflexen bzw. systematischen Auslöschungen erschließen. Alle anderen Phasenbeziehungen, die die eigentliche Information für die Verteilung der Elektronendichte im Kristall tragen, gehen verloren. Man spricht in diesem Zusammenhang in der Röntgenstrukturanalyse auch von dem **Phasenproblem** (Kap. B5.1.4). Die Bestimmung der Elektronendichteverteilung ergibt sich, nach Lösung dieses Problems, schließlich durch eine **Fourier-Transformation**.

Da Proteinkristalle große, mit Pufferlösung gefüllte Kanäle zwischen den Proteinmolekülen enthalten, sind sie sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung und müssen ständig von einer Lösung (meist die Reservoirlösung des Kristallisationsversuchs) umgeben sein. Zur Fixierung des Kristalls im Röntgenstrahl, gibt es die Möglichkeit, diesen in eine

Glaskapillare (\varnothing 0,1 – 1 mm) zu überführen, die ihn umgebende Lösung fast vollständig zu entfernen und die Kapillare an beiden Enden mittels Wachs luftdicht zu versiegeln. Eine andere Möglichkeit besteht in der Kryotechnik, bei welcher der Kristall unmittelbar nach der Präparation eingefroren wird, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Um ein Ausdehnen des Kristallwassers und ein Sprengen des Kristalls beim Gefrieren zu verhindern, werden Gefrierschutzmittel (Glukose, Glycerol) zur Kristallisationslösung hinzugefügt. Das „Fischen“ der Kristalle aus der Probenlösung erfolgt hierbei mittels sogenannter *Cryo-Loops* (Nylonfaden mit \varnothing 10 – 20 μm).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Aufnahme und Auswertung der Röntgenbeugungsdaten freundlicherweise von Dr. [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], *MPI für Medizinische Forschung*, Heidelberg), an einer *Rigaku 007HF Drehanode* mit *Osmic-Spiegel*, auf der eine *MAR345 Image Plate* montiert ist, sowie am Synchrotron an der *Beamline PXII* des *Swiss Light Source* mit *MAR225 CCD Detektor* (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz). Die Daten wurden mittel *XDS* (Kabsch, 1993) ausgewertet.

Die Präparation der Kristalle erfolgte durch Einfrieren (flüssiger Stickstoff) in der Kristallisationslösung, die 13 % (w/v) Polyethylenglykol und 30 % (w/v) Glycerin als Gefrierschutzmittel enthielt.

5.1.4 Bestimmung der Phasen

Die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome im Kristall ist in den gebeugten Röntgenstrahlen enthalten, und zwar in Form der drei beschreibenden Größen einer elektromagnetischen Welle: der **Wellenlänge**, der **Amplitude** sowie der **Phase**. Da die Wellenlänge des Primärstrahls durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert wird, ist diese Information bekannt. Die Amplitude wiederum lässt sich anhand der relativen Intensitäten der gebeugten Röntgenstrahlen durch den Detektor ermitteln. Allein die Messung der Phasen ist prinzipiell nicht möglich, da der entscheidende Teil der Information über einen Reflex, der das Quadrat der Amplitude darstellt, verloren geht. Durch die Streuung der Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome ergeben sich nicht sofort die exakten Atomkoordinaten, sondern vielmehr die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als **Elektronendichte** bezeichnet wird. Zur Bestimmung der messtechnisch nicht direkt zugänglichen, aber für die Molekülstruktur unabdingbaren Phaseninformation, gibt es mehrere Möglichkeiten. Prinzipiell gibt es die Methoden des **isomorphen** und des **molekularen Ersatzes**. Die Proteinkristalle werden beim isomorphen Ersatz in Lösungen von Salzen oder Verbindungen, die ein Atom mit hoher Massenzahl enthalten, transferiert. Die durch diese Schweratom-Position erhaltene Phaseninformation erlaubt eine grobe Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur. Wird nur die Lage eines an das Protein gebundenen Schweratoms im Kristall bestimmt, spricht man von *Single Isomorphous Replacement (SIR)*, während beim *Multiple Isomorphous Replacement (MIR)* viele unterschiedlicher Metallverbindungen der Reihe nach getestet werden, um eine Bindung an

verschiedenen Stellen des Proteins zu erreichen. Letztere erlaubt eine deutlich geringere Fehlerhäufigkeit bei der Phasenabschätzung und resultiert somit eher in interpretierbaren Elektronendichtekarten. Problematisch kann es allerdings werden, wenn es durch den Einbau von Schwermetallen zu einer Zerstörung der Einheitszellen kommt.

Häufiger wird daher das *Molecular Replacement (MR)* angewendet, wenn wie im Falle dieser Arbeit, bereits ein dreidimensionales Strukturmodell vorhanden ist. Aus den Koordinaten der bekannten Proteinstruktur können die Strukturfaktoramplituden und die Phasen für das Modell berechnet werden. Anhand der Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden wird eine Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur erhalten. Das bekannte Strukturmodell muss korrekt in der neuen Kristallzelle platziert werden, bevor mit der Korrektur und Verfeinerung der Struktur begonnen werden kann.

Der molekulare Ersatz erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Programm *PHASER* (McCoy, 2005) und eine Verbesserung der Phasen wurde mittels *RESOLVE* erreicht (Terwilliger, 2004). Die C-Alpha-Helices wurden mit *XFIT* (McRee, 1999) eingepasst und die Faltung anhand der Röntgenstruktur sowie der verfügbaren Sequenz mit dem Programm *MODELLER 9.2* modelliert. Nach ähnlichen Faltungen wurde mit *DALI* (Holm, 1993) gesucht. Die Auswertung der Daten erfolgte freundlicher Weise von Dr. [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], *MPI für Medizinische Forschung*, Heidelberg) und [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], *Institut für Zoologie*, Uni Mainz).

5.1.5 Modellbau und Strukturverfeinerung

Der letzte Arbeitsschritt beinhaltet die Interpretation der Elektronendichtekarte und deren Umwandlung in ein dreidimensionales Modell der Proteinstruktur. Dabei hängt die Qualität der Elektronendichte vom Fehler der Phasen ab sowie der Auflösung der Beugungsdaten. Letztere wird durch die Eigenschaften der Kristalle sowie der kristallinen Ordnung begrenzt. Ab einer Auflösung von 3 Å kann meist der Verlauf der Polypeptidkette verfolgt werden, wie die Windung einer α -Helix. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann ab dieser Auflösung auch eine Zuordnung der Seitenketten erfolgen. Ab 2 Å werden Details wie Konformationen von Peptidbindungen oder langen Seitenketten sichtbar, jedoch erst ab 1 Å werden Atome als einzelne Kugeln in der Elektronendichte sichtbar. Erste Modelle besitzen aufgrund einer Vielzahl von Fehlern meist nur eine Auflösung von 3 Å, welche allerdings durch kristallographische Verfeinerung mit Hilfe von Computerprogrammen häufig auf knapp 2 Å minimiert werden können.

5.2 Differenz Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Die DSC ist eine der wichtigsten Methoden für quantitative kalorimetrische Untersuchungen an Biomolekülen. Derartige thermodynamische Studien helfen bei der umfassenden Aufklärung biochemischer und biologischer Systeme sowie der Analyse von Bindungsphänomenen oder Prozessen der Strukturbildung. In dieser Arbeit wurde sie zur Untersuchung

der Proteinstabilität in Verbindung mit anderen biophysikalischen Methoden eingesetzt, um so eine Verknüpfung zwischen Thermodynamik, Struktur und Funktion herzustellen. Folglich kommt dieser Methode in diesem Zusammenhang eine eher grundlagenwissenschaftliche Bedeutung zu.

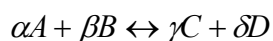
Ein Protein in wässriger Lösung befindet sich in einem Gleichgewichtszustand zwischen nativer (gefalteter) und denaturierter (ungefalteter) Konformation. Die Stabilität des nativen Zustands hängt von der *Gibbs* freien Energie (ΔG) des Systems und der thermodynamischen Beziehung zwischen **Enthalpie-** (ΔH) und **Entropieänderung** (ΔS) ab.

GIBBS-HELMHOLTZsche Gleichung:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ein positiver Wert für ΔG zeigt an, dass der native Zustand stabiler ist als der Denaturierte und je positiver ΔG , desto höher die Stabilität. Derartige thermodynamische Betrachtungen helfen dabei, die Triebkräfte biochemischer Reaktionen besser zu verstehen.

Für eine allgemeine Reaktionsgleichung



ergibt sich die **Gleichgewichtskonstante K** wie folgt:

$$K = \frac{[C]^\gamma \cdot [D]^\delta}{[A]^\alpha \cdot [B]^\beta}$$

Aus der Gleichgewichtskonstanten K errechnet sich die **freie Standardreaktionsenthalpie**:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K,$$

mit der Gaskonstanten $R = 8,314 \text{ J/K/Mol}$ und der absoluten Temperatur K (in Kelvin).

Eine weitere wichtige Schlüsselgröße ist die **Standardreaktionsenthalpie** ΔH° . Zu ihrer experimentellen Bestimmung gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder durch Messung der Reaktionswärmen mit kalorimetrischen Techniken oder mittels der **VAN'T HOFF-Gleichung** aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten:

$$d \ln K / dT = \Delta H^\circ / RT^2$$

Schließlich kann auch die Reaktionsenthalpie temperaturabhängig sein gemäß dem **KIRCH-HOFF**schen Satz:

$$d(\Delta H) / dT = \Delta C_p.$$

Hierbei ist ΔC_p die **Änderung der Wärmekapazität**, welche sich wiederum als die Differenz der Molwärmern der Reaktionspartner A und B beschreiben lässt,

$$\Delta C_p = [C_p]_B - [C_p]_A.$$

Die Wärmekapazitätsänderung spielt u.a. bei der Beurteilung hydrophober Wechselwirkungen bei biochemischen Reaktionen eine bedeutende Rolle.

Während der DSC-Messung werden Probe und Referenz, deren stoffliche Zusammensetzung unverändert bleibt, durch das Scanning-Kalorimeter einer programmierten Aufheizung ausgesetzt. Proben- und Referenzzelle besitzen exakt das gleiche Volumen (0,5 ml) und sind mit einem System von Temperaturfühlern und Heizelementen ausgestattet (Abb. B16). Beide Zellen werden simultan aufgeheizt. Erfolgt in eine der Zellen eine temperaturinduzierte Reaktion, würde die auftretende Reaktionswärme in einer minimalen **Temperaturdifferenz ΔT** resultieren. Dem wirkt die Steuerelektronik des Gerätes entgegen, indem es in der einen Zelle den Heizstrom erhöht und in der anderen Zelle erniedrigt. Somit wird der auftretende Wärmeeffekt kompensiert und die unterschiedliche Heizleistung als Funktion der Temperatur von einem PC graphisch dargestellt.

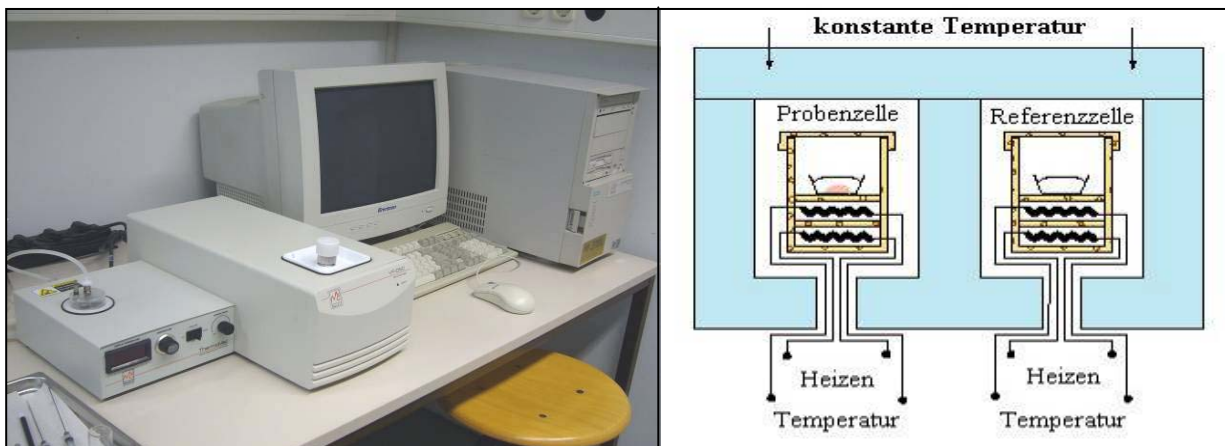


Abb. B16: Foto und Schemazeichnung eines Differenz Scanning-Kalorimeters (leistungskompensiert).

Quelle Schemazeichnung: verändert nach

http://www.ifw.tu-bs.de/ifw/deutsch/forschung/physik_mess/transformation/kalorimetrie/index.htm

In der vorliegenden Arbeit dienten die kalorimetrischen Untersuchungen der Proteine größtenteils dem Ziel, temperaturinduzierte Strukturübergänge aufzuzeigen. Eine solche Entfaltung der nativen Tertiär- und Sekundärstruktur, in eine mehr oder weniger ungeordnete Struktur des thermisch entfalteten Proteins, ist beispielhaft in Abb. B17 als endotherme Kurve dargestellt.

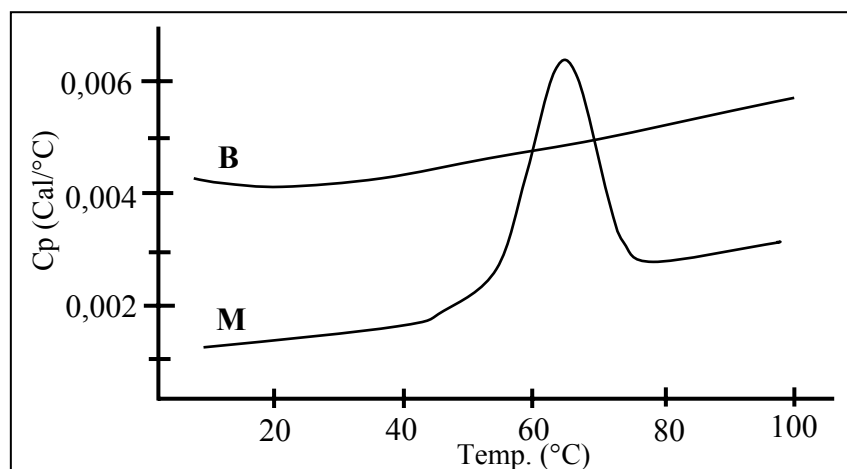


Abb. B17: Unbearbeitete scanning-kalorimetrische Kurve.

Das Gerät zeichnet den bei der Proteinentfaltung auftretenden Unterschied im Wärmefluss, in Abhängigkeit von der Temperatur auf (Cal/°C). Hier ist eine endotherme Kurve dargestellt. Zur Auswertung wird die Basislinie des Gerätes (B), z.B. in 20 mM MOPS-Puffer, von der Messkurve des Proteins im gleichen Puffer (M) subtrahiert.

Zur Auswertung der gemessenen DSC-Kurve, wird die gemessene Basislinie des Gerätes von der Messkurve subtrahiert. Aus der somit ermittelten Wärmekapazitätsfunktion lassen sich folgende Parameter ablesen (Abb. B18): **Umwandlungs- oder Reaktionswärme (ΔH)**, **Halbumwandlungstemperatur (T_m)** und **Wärmekapazität (C_p)** der Probe.

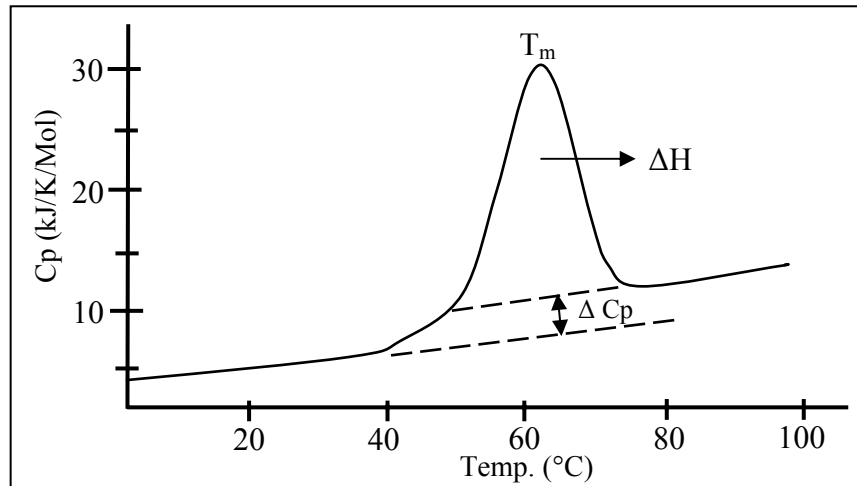


Abb. B18: Bearbeitetes DSC-Thermogramm.

Nachdem die Basislinie des Gerätes von der Messlinie subtrahiert und die Wärmekapazität des nativen Proteins gleich Null gesetzt wurde, können folgende Parameter aus dem Thermogramm ermittelt werden: die Halbumwandlungstemperatur/Schmelzpunkt (T_m), die Reaktionswärme (ΔH) und die Änderung der Wärmekapazität von gefaltetem zu ungefaltetem Protein (ΔC_p)

Je höher der Schmelzpunkt eines Proteins, desto stabiler ist das Protein in der Regel bei geringeren Temperaturen. Wieviel Energie in Form von Hitze der Proteinprobe zugeführt werden muss, hängt dabei davon ab, ob der Prozess der Entfaltung exotherm oder endotherm ist. Gleichzeitig kann anhand der DSC-Kurve die Änderungen der Wärmekapazität ΔC_p der Proteindenaturierung abgelesen werden. Letztere beruhen größtenteils auf Änderungen in der Hydratisierung von Seitenketten, welche im nativen Zustand im Inneren des Moleküls verborgen liegen, allerdings im denaturierten Zustand für das Lösungsmittel zugänglich nach außen exponiert vorkommen. Grundsätzlich sind viele Faktoren für die Faltung und Stabilität eines nativen Proteins verantwortlich. Hierzu zählen u.a. hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie die konformationelle Entropie. Da bestimmte Puffer, bzw. -zusätze ein Protein zusätzlich stabilisieren, aber auch destabilisieren können, lassen sich solche Effekte ebenfalls mit Hilfe der DSC durch eine Zu- bzw. Abnahme des T_m ermitteln.

Durchführung:

Alle Pufferlösungen wurden zuvor in einer *Thermovac*-Vakuumpumpe entgast und die Proteinlösungen mit entgastem Puffer nach Bedarf verdünnt. Beide Zellen wurden vor jedem Lauf gründlich gereinigt und mit Wasser gespült. Die Befüllung der Zellen (0,5 ml) erfolgte mit einer 2 ml Hamiltonspritze, welche in einen weißen Plastikfilter in der Zellenöffnung bis zum Anschlag eingeführt wurde. Dann wurde die Lösung langsam injiziert, bis sie oberhalb des Trichters stand. Um etwaige Luftblasen aus der Zelle zu treiben, wurden einige Male

schlagartig kleine Mengen injiziert. Anschließend wurden mit der Einstellspritze mit einer Verdickung im unteren Drittels des Metallteils, etwa 100 µl Probe entzogen, um die Mengen an Flüssigkeit in beiden Zellen in Gleichstand zu bringen, da die Methode mengensensitiv ist. Vor dem Starten der Messung wurde der Deckel soweit aufgeschraubt, bis die Druckanzeige auf etwa 30 psi war. Vor jeder Messung der eigentlichen Proteinprobe gegen Puffer wurde zuerst ein Puffer/Pufferlauf als Referenzlauf durchgeführt und dieser später von der eigentlichen Messung abgezogen. KLH-Didekamere, Untereinheiten sowie funktionelle Einheiten mit Konzentrationen zwischen 0,2 – 2 mg/ml, wurden bei unterschiedlichen Scanraten (15 °/30 °/60 °/90 °C/Std.), auf verschiedene Temperaturen zwischen 20 °C und 100 °C erhitzt und nach dem DSC-Lauf auf 20 °C gehalten. Nach dem Abkühlen des ersten Heizzyklus wurde die Proteinlösung in der kalorimetrischen Zelle erneut erhitzt, um eine etwaige Reversibilität der thermischen Entfaltung nachzuweisen. Die Halbumwandlungstemperatur (T_m) wurde anhand der maximalen Hitzekapazität der Schmelzkurve bestimmt.

Verwendete Geräte (Northhampton, USA):

- VP-DSC Mikrokalorimeter von MicroCal
- Thermovac Vakuumpumpe von MicroCal
- PC mit Software Origin 6.0 und VPViewer 5.0

Verwendete Puffer:

Glycin/NaOH-Puffer:	0,13 M Glycin pH 9,6 (20 °C)
MOPS-Puffer <u>mit</u> NaCl, MgCl₂, CaCl₂:	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 7,2 und 8,5 (20 °C)
MOPS-Puffer <u>ohne</u> NaCl, MgCl₂, CaCl₂:	20 mM MOPS pH 7,2 (20°C)

5.3 Spektroskopie

5.3.1 Absorptionsspektroskopie

Die Methode der Absorptionsspektroskopie nutzt elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichts. Hierbei wird die zu untersuchende gelöste Substanz mit Licht bestimmter Wellenlänge durchstrahlt und das durch die Probe dringende Licht detektiert. Der eigentliche Messwert ist die optische Dichte (*Optical Density* = Extinktion), welche sich bei dem Vorhandensein von Biopolymeren in der Probe durch eine Absorption von Licht bestimmter Wellenlänge auszeichnet. Proteine und Nukleinsäuren tragen Chromophore, die bei unterschiedlichen Wellenlängen charakteristische Absorptions-

muster besitzen. Proteine zeigen, zusätzlich zur Absorption des Proteinerückgrats (Peptidbindungen) zwischen 190 und 220 nm durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp), eine weitere charakteristische Proteinbande zwischen 250 – 290 nm. Da Tryptophan, als Folge seiner typischen Ringstruktur, jedoch das stärkste Absorptionsmaximum bei 280 nm zeigt, kann die photometrische Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge zur groben Abschätzung der Proteinkonzentration sehr reiner Proteinlösungen herangezogen werden. Ist der Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{280\text{nm}}[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$) des aufgereinigten Proteins bekannt, sowie eine ausreichende Homogenität und Verdünnung der Lösung gewährleistet, kann die Konzentration ($c [\text{M}]$) mit Hilfe des **Lambert-Beer'schen Gesetzes** berechnet werden:

$$A_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{nm}} * c * d \quad (\text{mit } d = \text{Weglänge} = 1 \text{ cm})$$

Vorraussetzung für verlässliche Messresultate ist hierbei eine gemessene Absorption ($A_{280\text{nm}}$) im Bereich von 0,2 – 1,0, um zu gewährleisten, dass jedes Molekül monochromatisches Licht unabhängig von den anderen Molekülen aufnehmen kann. Mit Hilfe von Absorptionsspektren lassen sich neben der Konzentration weitere spezifische Eigenschaften eines Moleküls ablesen. Im Falle des Hämocyanins wurden solche Spektren zur Qualitätssicherung in einem *Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer* (Amersham Biosciences, München) sowie dem *Cary 300 Spektrometer* (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) von 250 - 700 nm gemessen. Beim KLH lassen sich zwei typische Absorptionsmaxima bei 280 nm und bei 345 nm feststellen. Das Maximum bei 280 nm resultiert hierbei aus der proteintypischen Absorption der aromatischen Aminosäuren, während der kleinere Gipfel bei 345 nm auf das Hämocyanin-typische, oxygenierte Typ III-Kupferzentrum (Cu-O₂-Cu-Komplex) hinweist. Bei nativen und voll oxygenierten Hämocyaninen beträgt das 340/280 nm-Verhältnis ~ 0,21 (Salvato & Beltramini, 1990). Um Aussagen über die eingesetzten Proteinmengen bzw. etwaige Verluste durch Aufreinigungsschritte machen zu können, wurden einfache Konzentrationsmessungen der Proben durch Messung bei 280 nm im „BioPhotometer“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, während ein Spektrum mit einer zusätzlichen Absorptionsbande bei 345 nm dem eindeutigen Nachweis von Hämocyanin in der Probe diente. Falls die Proteine in Stabilisierungspuffer (Kap. B4.1) gelöst vorliegen, entspricht eine OD von 0,7 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Bei allen übrigen Lösungsmitteln ist diese Proteinkonzentration in der Regel erst bei einer OD von 1 erreicht.

Zur Bestimmung der O₂-Affinität mit steigender Temperatur, wurden im Rahmen der thermodynamischen Untersuchungen am KLH Absorptionsspektren im Bereich von 250 – 500 nm im *Cary 300 Spektrometer* (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) gemessen. Der *Baselineabzug* erfolgte bei allen Messungen automatisch. Die gemessenen Proben, Temperaturreihen sowie verwendeten Puffer sind in Tab. B11 dargestellt. Die Aufheizung erfolgte im Wasserbad mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten je Temperaturintervall.

Proteinprobe	Proteinkonzentration	Temperaturreihe	Puffer (s. Kap. B5.2)
KLH1-Didekamere	0,5 mg/ml	40 °/50 °/60 °/70 °C	MOPS <u>mit</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2
KLH1-h	0,2 mg/ml	20 °/40 °/ 60 °C	MOPS <u>ohne</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2
KLH2-c	0,2 mg/ml	20 °/40 °/50 °/60 °/ 65 °C	MOPS <u>ohne</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2

Tab. B11: Temperaturreihen der im Photometer gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern.

Des Weiteren wurde die Methode der Absorptionsspektroskopie zur Messung der Phenoloxidase-Aktivität von KLH-Strukturen sowie der Messung von Enzymkinetiken bei 505 nm angewandt (Kap. B4.13). Hierzu diente eine *Hitachi U-3000 Spektrophotometer* (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd).

5.3.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist in der Biologie eine beliebte Methode zur Berechnung der Sekundärstrukturgehalte von Proteinen (Winter & Noll, 1998). So ist es mit ihrer Hilfe z.B. möglich, ein Abbild des Faltungszustands des Proteins zu ermitteln. Die CD-Spektroskopie kann als eine spezielle Form der Absorptionsspektroskopie im UV-, bzw. sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Strahlung betrachtet werden und beruht auf der Wechselwirkung zirkular polarisierten Lichts mit optisch aktiven Substanzen. Zirkular polarisiertes Licht wird durch die Überlagerung zweier senkrecht zueinander stehender linear polarisierter Wellen gleicher Amplitude erzeugt, deren Phase um $\pi/2 = 90^\circ$ verschoben ist. Diese Phasenverschiebung kann durch sogenannte $\lambda/4$ -Plättchen hergestellt werden. Dies ist ein Kalkspat-, Glimmer- oder Gipskristall, der so geschnitten ist, dass der senkrechte Einfall von linear polarisiertem Licht in einer Aufspaltung in zwei Teile resultiert, die sich wiederum mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im Kristall fortpflanzen. Diese Geschwindigkeitsdifferenz ist das Ergebnis der verschiedenen Brechungsindizes für die Kristallachsen und führt zu einer Phasendifferenz der beiden Wellen nach Austritt aus dem Kristall. Durch eine angemessene Wahl der Dicke des Plättchens in Abhängigkeit von der Wellenlänge kann ein Phasenunterschied von $\lambda/4 = 90^\circ$ erzielt werden. Wenn das linear polarisierte Licht nun unter einem Winkel von 45° , bezogen auf die Kristallachse, einfällt, erhält man zwei Anteile gleicher Amplitude, wobei die Phasendifferenz dann zirkular polarisiertes Licht erzeugt. Das Vorzeichen der Phasendifferenz bestimmt hierbei, ob man links- oder rechts polarisiertes Licht erhält. Ein anderer Einfallswinkel resultiert in elliptisch polarisiertem Licht. Lösungen mit optisch aktiven, organischen Molekülen besitzen unterschiedliche Brechungsindizes für links- und rechts polarisiertes Licht, so dass der Durchtritt linear polarisierten Lichtes in einer unterschiedlichen Verzögerung der links- und rechts polarisierten Anteile resultiert. Somit sind beide Komponenten nach Verlassen der Probe phasenverschoben, und ihre Überlagerung führt zu linearisiertem Licht, das gegenüber

der ursprünglichen Orientierung gedreht ist (**optische Rotationsdispersion** = ORD). ORD-aktive Substanzen zeigen auch **Zirkulardichroismus**, der auf sehr geringen unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten für links (ϵ_L) und rechts (ϵ_R) zirkular polarisiertem Licht beruht. Der resultierende Unterschied $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ist die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie. Bei Makromolekülen wie Proteinen resultiert die optische Aktivität nicht ausschließlich auf dem Vorhandensein asymmetrischer C-Atome (Peptidbindung). Vielmehr werden die Orbitale der Moleküle durch Wechselwirkungen, die zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen, auch in ihrer Chiralität verändert. Folglich zeigen die Sekundärstrukturelemente in Proteinen (α -Helices, β -Faltblätter, *random coil* usw.) unterschiedliche CD-Spektren (Abb. B19).

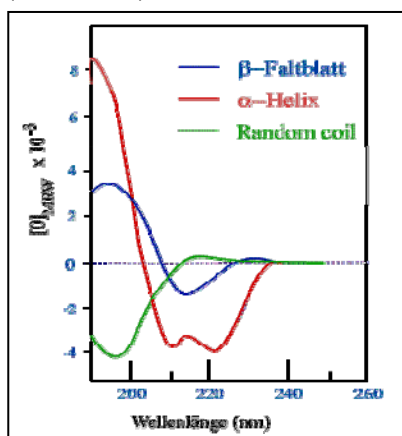


Abb. B19: CD-Spektren von Poly-L-Lysin.

Die Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblatt und *random coil* zeigen unterschiedliche CD-Spektren.

Quelle:

<http://www.chemgapedia.de/vsengine/printvlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu.html>

Die vom CD-Spektrometer primär gemessenen und vom Photomultiplier verstärkten Signale entsprechen der Intensität des Lichtes vor- und nach Durchtritt durch die Probe (I_L und I_R). Dabei zeigen die gemessene Intensität durch das Hin- und Herschalten zwischen links- und rechts-polarisiertem Licht, einen entsprechend zeitabhängigen Verlauf. Der schematische Aufbau eines CD-Spektrometers ist in Abb. B20 dargestellt.

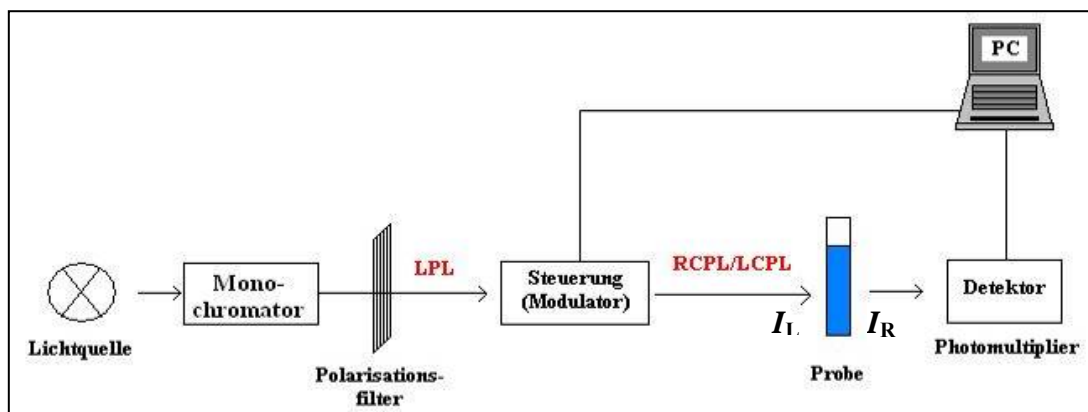


Abb. B20: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers.

LPL = linear polarisiertes Licht; RCPL/LCPL = rechts/links zirkular polarisiertes Licht; I_L = Lichtintensität links, vor Durchtritt der Probe; I_R = Lichtintensität rechts, nach Durchtritt der Probe.

Die CD-Spektroskopie kam im Rahmen dieser Arbeit als ergänzende Methode zur DSC (Kap. B5.2), im Zuge der Stabilitätsuntersuchungen am KLH zum Einsatz. Das Ziel war hierbei, mögliche Änderungen der Sekundärstrukturanteile nach Erhitzung im Vergleich zum nativen Protein zu detektieren.

Durchführung:

Die CD-Messungen erfolgten unter drei verschiedenen Grundeinstellungen (Tab. B12).

Einstellung	λ -Intervalle	Messgeschwindigkeit	Messungen/Graph (gemittelt)
1	0,5 nm	0,16 nm/s	10
2	0,5 nm	0,16 nm/s	5
3	1 nm	0,2 nm/s	8

Tab. B12: Grundeinstellungen zur Optimierung der Messdauer.

Die Variation der Einstellungen diente der Optimierung der Messdauer. Da eine verringerte Anzahl der gemittelten Werte (2) in einer zu geringen Linearität der Graphen resultierte, wurde die Anzahl der zu mittelnden Werte und die Dauer der Messungen/Messpunkte erhöht. Um die Gesamtdauer der Messungen moderat zu halten, wurde das Wellenlängenintervall zwischen den Messungen auf 1nm erhöht (3). Nach manuellem Offsetabzug erfolgte eine Kalibrierung der Graphen.

Die Spektren wurden nach Erhitzung der KLH1-Didekamere und KLH1-Untereinheiten auf verschiedene Temperaturen und in verschiedenen Puffern gemessen (Tab. B13). Die Aufheizung erfolgte im Wasserbad, bei einer jeweiligen Inkubationszeit von 10 Minuten je Temperaturstufe.

Proteinprobe	Proteinkonzentration	Temperaturreihe	Puffer (s. Kap. B5.2)
KLH1-Didekamere	0,3 mg/ml	20 ° /40 °/60 °/70 °C	MOPS <u>mit</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2
KLH1-UE	0,3 mg/ml	20 ° /70 °/90 °C	MOPS <u>ohne</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2

Tab. B13: Temperaturreihen der im CD-Spektrometer gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern.

Verwendete Geräte (Division d'Instruments):

- Jobin Yvon CD 6 (CD-Spektrometer)
- PC mit Software Data Max
- Wasserbad C 25 (Thermo Haake, Karlsruhe)

5.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie umfasst alle Methoden, die die Fluoreszenzeigenschaften von *Fluorophoren* ausnutzt. Zu diesen zählen auch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und

Phenylalanin, welche aufgrund ihrer aromatischen Ringstrukturen nach Anregung mittels UV-Licht fluoreszieren können. (Abb. B21). Die delokalisierten Elektronen in den bindenden π -Orbitalen dieser Aminosäuren treten leicht in Wechselwirkung mit der Umgebung und werden bei Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu_A$) in ein höheres Orbital (π^*) angehoben. Dieser Übergang vom Grundzustand S_0 in einen der angeregten Zustände S_1 oder S_2 ist extrem schnell und vollzieht sich innerhalb von etwa 10^{-15} Sekunden. Ein Wechsel aus dem oberen angeregten Zustand S_2 nach S_1 kann ohne Emission eines Photons erfolgen, während der Übergang aus S_1 in den Grundzustand für einen bestimmten Bruchteil der Elektronen in freierwerdender Energie in Form eines Fluoreszenzphotons ($h\nu_F$) resultiert. Durch Energieverluste (Gitter-, Molekülschwingungen) ist die emittierte Energie geringer als die absorbierte Energie, was in einer Verschiebung zu größeren Wellenlängen resultiert. Bei manchen Verbindungen kann es zu einem Übergang aus einem angeregten Singulett-Zustand (antiparalleler Spin) in einen Triplett-Zustand (T_1) kommen, was zu einer Spinumkehr des angeregten Elektrons führt. Der anschließende Sprung in den Grundzustand erfordert erneut eine Spinumkehr (Phosphoreszenz) und ist sehr unwahrscheinlich. Somit ergeben sich bei diesem Phänomen, im Vergleich zur Fluoreszenz, nur sehr geringe Umsatzraten und es ist nur ein langsames Abklingen der Phosphoreszenz zu beobachten (Abb. B21).

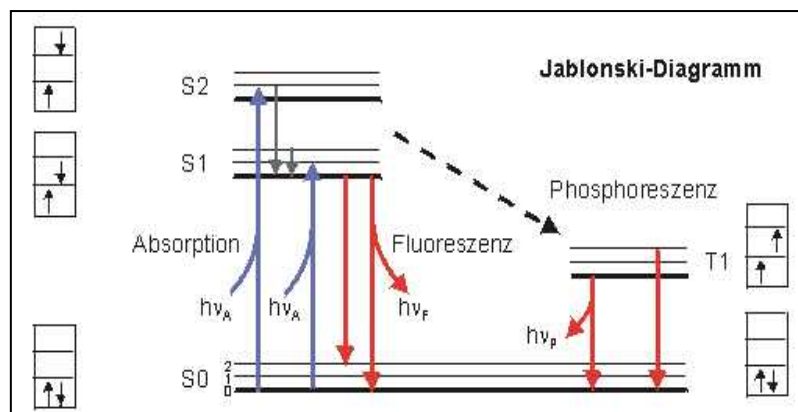


Abb. B21: Jablonski-Diagramm.

Ein Jablonski-Diagramm zeigt die Energien der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten.

Quelle: <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/fluo11.htm>

Die Fluoreszenz steht in verdünnten Lösungen im linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Fluorophors und hängt neben stoffspezifischen Größen (z.B. Quantenbausbeute und molarer Extinktionskoeffizient) auch von gerätespezifischen Größen ab (z.B. Schichtdicke der Messzelle). Aus diesem Grund wird die Fluoreszenz stets in **relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI)** angegeben. Allerdings kommt es bei Konzentrationen des Fluorophors oberhalb des Sättigungsbereiches zu einer **Konzentrations-Fluoreszenzlöschung** (*concentration quenching*) in Verbindung mit einer Abnahme der RFI. Man spricht in diesem Zusammenhang von dem sogenannten **Inner-filter-Effekt**, wenn das Anregungslicht bei hohen Fluorophor-Konzentrationen so stark absorbiert wird, dass es von den Fluorophoren herausgefiltert und an einem tieferen Eindringen gehindert wird. Das

Anregungslicht ist somit innerhalb der Lösung nicht konstant und führt zu veränderten Spektren und Fluoreszenzintensitäten. Auch Wechselwirkungen und Reaktionen der angeregten, fluoreszierenden Verbindung mit nichtangeregten Molekülen der gleichen Verbindung oder auch mit Fremdstoffen können zu einer Löschung der Fluoreszenz, d.h. zur Abnahme der Fluoreszenz führen. Dieser nichtstrahlende Deaktivierungsprozess wird auch als "quenching" bezeichnet und kann durch neutrale Moleküle wie Sauerstoff, aber auch Anionen oder Kationen erfolgen.

Bei den aromatischen Aminosäuren nimmt die Fluoreszenzintensität von Trp über Tyr zu Phe hin ab. Während die Fluoreszenz von Proteinen durch Trp dominiert wird, ist die Phe-Fluoreszenz vernachlässigbar gering und in der Regel nicht detektierbar. Häufig kommt es in kompakten Proteinen auch zu einem strahlungslosen Energietransfer von Tyr auf Trp, so dass die Emission von Tyr in nativen Proteinen ebenfalls häufig „überlagert“ wird. Die Fluoreszenzmaxima der Trp-Reste an der Proteinoberfläche liegt bei 350-353 nm, während diese in hydrophoben Regionen eines Proteins zwischen 315-350 nm liegen. Bei der Denaturierung kommt es als Folge der Auffaltung zu einer Rotverschiebung der Trp-Fluoreszenz, da alle Trp in wässrige Umgebung gelangen. Ein Fluoreszenzspektrum ist somit erheblich sensitiver für die unmittelbare Umgebung der chromophoren Gruppe als ein Absorptionsspektrum, und die Änderung der Trp-Fluoreszenz kann daher sehr gut für das Verfolgen von Faltungs-/Denaturierungsreaktionen verwendet werden.

Durchführung:

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie ergänzend zur DSC (Kap. B5.2) sowie der CD-Spektroskopie (Kap. B5.3.2) zur Charakterisierung der thermischen Stabilität der Tertiärstrukturen des KLH sowie zur Untersuchung des Sauerstoffbeladungszustand bei unterschiedlichen Temperaturen angewandt (Tab. B14).

Die Fluoreszenzintensität nimmt mit zunehmender Temperatur ab, weil die Wahrscheinlichkeit von desaktivierenden Stößen mit anderen Molekülen wächst. Daher war eine sehr gute Temperierung der Proben essenziell. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 300 – 450 nm in Halbmikro-Fluoreszenz-Küvetten mit einem Füllvolumen von 1 ml. Die Anregung erfolgte mittels einer Xenonlampe bei 280 nm, wobei ein Monochromator die Einstellung einer bestimmten Wellenlänge erlaubte. Die Detektion erfolgte mittels eines *Photomultipliers*. Die *Baseline* wurde bei allen Messungen manuell abgezogen.

Proteinprobe	Proteinkonzentration	Temperaturreihe	Puffer (s. Kap. B5.2)
KLH1-Didekamere	0,25 mg/ml	20 ° /40 °/50 °/55 °/ 60 °/65 °/70 °C	MOPS <u>mit</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2
KLH1-UE	0,15 mg/ml	20 ° /40 °/50 °/55 °/ 60 °/65 °/70 °/75 °/ 80 °/85 °C	MOPS <u>ohne</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2
KLH1-h	0,25 mg/ml	20 ° /40 °/50 °/ 60 °/70 °/80 °C	MOPS <u>mit</u> NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , pH 7,2

Tab. B14: Temperaturreihen der im Fluorimeter gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern.

Verwendete Geräte:

- Hitachi F 4500 Fluoreszenz-Spektrometer (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd)
- Wasserbad C 25 P (Thermo Haake, Karlsruhe)

5.4 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ist ein nützliches Werkzeug, z.B. zur Untersuchung von Proteinlösungen auf Homogenität, aber auch zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Biopolymeren. Hierzu analysiert man das Streulicht eines Lasers an einer gelösten Probe (Abb. B22). Beim Durchtritt des Lasers durch die Probe wird ca. 1 % des Lichts an den gelösten Molekülen gestreut. Zieht man zur Analyse des Molekulargewichts die Intensität des Streulichts unter einem bestimmten Winkel heran, so spricht man von der **statischen Lichtstreuung**. Als Folge der **Brownschen Molekularbewegung** wird die Anzahl und Position der Teilchen im Streuvolumen jedoch minimal verändert, so dass die Intensität des Streulichts kleinen Schwankungen unterliegt. Die destruktive oder konstruktive Interferenz des gestreuten Lichtes in Abhängigkeit von der relativen Position der streuenden Teilchen zueinander, führt zu zeitabhängigen Fluktuationen der Streuintensität, die gemessen und der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen durch das Medium zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung der Viskosität des Lösungsmittels erhält man so den hydrodynamischen Radius der Moleküle in Lösung. Man spricht in diesem Falle von **dynamischer Lichtstreuung** oder **Photonenkorrelations-Spektroskopie**. Der Vorteil der DLS-Technik besteht darin, dass abgesehen von der Viskosität des Lösungsmittels und dessen Brechungsindex, keine weiteren Parameter für die Messung benötigt werden. Weder die Konzentration der Probe, noch deren Kontrastfaktor, eine wichtige Größe in der statischen Lichtstreuung, muss bekannt sein.

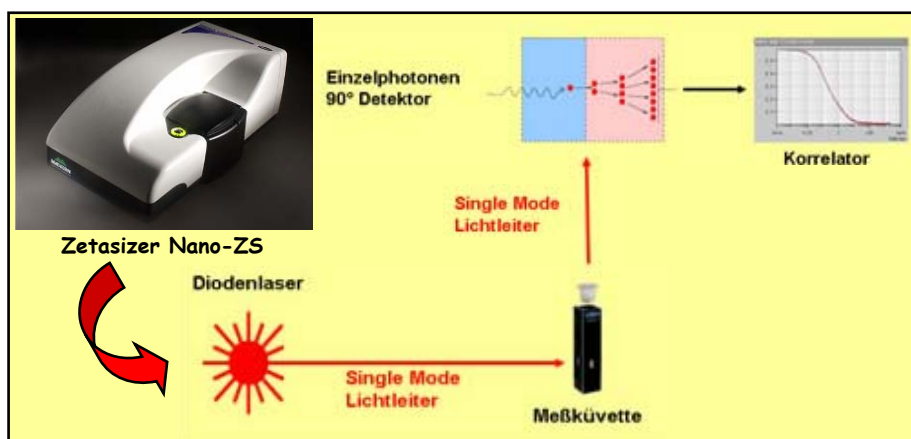


Abb. B22: Schematischer Aufbau eines modernen DLS-Instruments.

Ein DLS-Instrument (Zetasizer Nano-ZS) besteht aus einem kompakten Diodenlaser und einer hochwertigen Faseroptik (*Single Mode* Lichtleiter), welche für die hohe Sensitivität verantwortlich ist. Das Instrument misst in sehr kurzen Zeitabständen die Streulichtintensität einer Probe und korreliert die Messwerte miteinander. Durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Makromolekülen entsteht eine definierte Korrelationsfunktion aus der über einen mathematischen Fit der Diffusionskoeffizient der gelösten Makromoleküle bestimmt werden kann. Aus diesem wiederum lässt sich der hydrodynamische Radius der gelösten Probe ermitteln.

Quellen: verändert nach <http://www.chemie.de/articles/d/61632/>; <http://fcab.foodsci.umass.edu/equipment.html>

Durchführung:

Die DLS wurde als ergänzende Methode zur Stabilitätsuntersuchung der KLH1-Didekamere, nach Behandlung mit SDS angewandt. Letzteres wurde zur Aktivierung bei Untersuchungen zur Phenoloxidase-Aktivität eingesetzt (Kap. B4.13). Für die Messungen zur SDS-Stabilität wurden die Proteinproben in Stabilisierungs-Puffer pH 7,4 in einer 45 µl Küvette, für 20 Minuten, mit 0,5, 1 und 2 mM SDS inkubiert und anschließend je Messung 10 Scans von 10 Sekunden Dauer bei 20 °C durchgeführt.

Verwendete Geräte:

- Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments)
- PC mit Software DTS(Nano)

Verwendeter Puffer:

Stabilisierungs-Puffer: s. Kap. B4.1

5.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht eine vergrößerte Abbildung kleiner, durchstrahlbarer Objekte mit Hilfe von Elektronenstrahlen. Im optischen Aufbau ähneln diese Mikroskope den Lichtmikroskopen, allerdings werden bei einem TEM zur Beleuchtung eine Elektronenquelle (statt der Glühbirne) und zur Strahlfokussierung elektromagnetische Linsen (statt Glaslinsen) verwendet (Abb. B23). Um die Wechselwirkung der Elektronen mit Gasmolekülen möglichst klein und die freie Wegstrecke derselben möglichst groß zu halten, wird im TEM im Vakuum gearbeitet. Die von der Elektronenquelle gelieferten Elektronen werden vom Kondensor-Linsensystem so abgelenkt, dass sie den zu beobachtenden Objektabschnitt gleichmäßig ausleuchten und alle etwa parallel zueinander auf das Objekt einfallen. Durch Streuung der Elektronen in der zu untersuchenden Probe ändert sich deren Bewegungsrichtung, und solche, die das Objekt unter demselben Winkel verlassen, werden in der hinteren Brennebene der Objektivlinse in einem Punkt fokussiert. Die im TEM erreichbare Wellenlänge hängt von der Beschleunigungsspannung ab (60 – 1200 kV) und ist sehr viel kleiner als die von sichtbarem Licht. Moderne Transmissionselektronenmikroskope können noch Abstände im atomaren Bereich ($< 0,2$ nm) sichtbar machen. Das Bild der Probe, das durch die Wechselwirkung der einfallenden Elektronen mit den Probenatomen entsteht, wird auf einem Leuchtschirm dargestellt und kann auf einem photographischen Negativ oder einer CCD-Kamera aufgezeichnet werden.

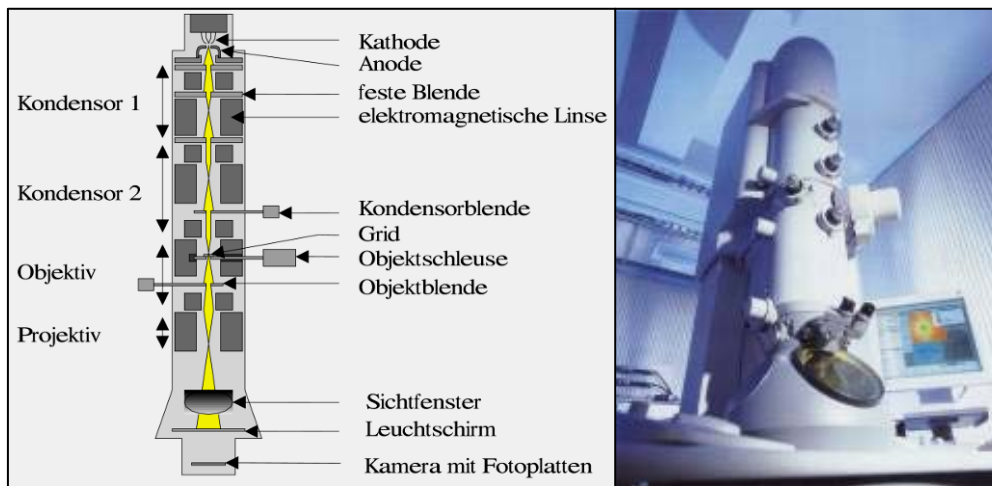


Abb. B23: Schemazeichnung und Foto eines Transmissionselektronenmikroskops.

Quellen: www.zoosyst-berlin.de/methods/TEM_Bild.html (links),
www.bio.uni-mainz.de/zoo/meissner/Bilder_allgemein/tem.jpg (rechts)

Das Hauptproblem bei biologischen Proben, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, ist deren Strahlenempfindlichkeit. Die Unbeständigkeit im Elektronenstrahl stellt vielleicht den wichtigsten Faktor dar, der sehr hohe Auflösungen an biologischen Objekten erschwert. Aus diesen Gründen müssen biologische Objekte vor der Beobachtung in eine „mikroskopgerechte“ Form, d.h. in gut durchstrahlbare, vakuum- und einigermaßen strahlenbeständige Präparate mit genügend hohem Kontrast überführt werden. Für die Fixierung und Kontrastierung existieren heute zahlreiche Techniken, wobei in dieser Arbeit das Prinzip der Negativkontrastierung angewandt wurde. Es beruht auf einer mehr oder weniger weitgehenden Einhüllung der biologischen Probe in ein amorphes Material, welches die Elektronen stark streut. So kann durch dessen Einsatz eine Erhöhung der Dichte des Untergrunds eine somit eine **negative Kontrastierung** erzielt werden, wobei nicht nur das Objekt als Ganzes, sondern auch vorhandene Substrukturen negativ kontrastiert werden. Als Kontrastierungsmittel eignen sich hierbei besonders Verbindungen mit hohem Atomgewicht (z.B. Schwermetalle wie Uranylacetat), die eine starke Elektronenstreuung bewirken.

Durchführung:

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten „sukzessiven“ Kontrastierung wurden zuerst das Objekt und anschließend das Kontrastierungsmittel auf Trägernetze aufgebracht. Als Trägerfilme wurden mit einem Kohlenstofffilm beschichtete Kupfernetzchen mit 300 - 400 Maschen verwendet. Kurz vor der Beladung mit der Proteinprobe wurden die Netzchen in einer Aufdampfanlage einer Hitzeentladung ausgesetzt, um die Kohlenstoffoberfläche hydrophil und somit für das Protein adsorptionsfähiger zu machen und eine gleichmäßige Verteilung von Objekt und Kontrastierungsmittel zu gewährleisten. Für die TEM-Präparation wurde die *Single droplet*-Methode im „*Negative-Staining*“-Verfahren angewendet (Harris & Horne, 1991). Dazu wurden auf Parafilm folgende Tropfen untereinander vorgelegt:

- 1 Tropfen Proteinlösung (~ 0,1 mg/ml)
- 3 Tropfen *Aqua dest.*
- 1 Tropfen Kontrastierungsmittel: 2 % Uranylacetat

Das Netzchen wurde nun mit einer Pinzette vorsichtig in der oben aufgeführten Reihenfolge mit der Kohlenstoffoberfläche durch die Lösungen gezogen, wobei zwischen den einzelnen Tropfen das Netzchen mittels eines Filterpapiers trocken gesaugt wurde. Das Netzchen wurde anschließend auf Filterpapier in einer Petrischale getrocknet und dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Untersuchung der Präparate wurde in einem *FEI Tecnai 12* Transmissions-Elektronenmikroskop mit CCD-Kamera durchgeführt und die Bilder in digitaler Form bearbeitet und festgehalten.

Im Rahmen dieser Arbeit kam die TEM als zusätzliche Methode zur Stabilitätsuntersuchung der KLH1-Didekamere, sowohl unter thermodynamischen Gesichtspunkten anhand verschiedener Temperaturreihen, als auch nach Behandlung mit SDS zum Einsatz. Für die temperaturabhängigen Versuche wurden die KLH1-Didekamere (0,5 mg/ml) sowohl in MOPS-Puffer mit, als auch ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$ gelöst und 20 Minuten bei Temperaturen von 25° - 70 °C auf dem Heizblock inkubiert. SDS wurde zur Aktivierung bei Untersuchungen zur Phenoloxidase-Aktivität eingesetzt (Kap. B4.13), wobei die TEM hier als optische Methode zur Kontrolle des Oligomerisierungszustands der KLH1-Didekameren in Stabilisierungs-Puffer nach Zusatz von 0,5, 1 und 2 mM SDS diente.

C Ergebnisse

1 *Ablauf und Strategie der Projekte*

Bevor mit den Experimenten zur Kristallisation der FU-h des KLH1 sowie den enzymkinetischen und thermodynamischen Studien begonnen werden konnte, mussten zunächst beide Isoformen des KLH aus der Hämolymphe von *Megathura crenulata* isoliert werden. Anschließend sollte die FU-h in möglichst reiner Form und in großen Mengen für die nachfolgende Kristallisation aufgereinigt werden. Auch für die thermodynamischen Studien sowie der Untersuchung auf Tyrosinase-/Catecholoxidase-Aktivität war eine Aufreinigung verschiedener Oligomerisierungsformen beider Isoformen wie Didekameren, Dekamere, Untereinheiten, Untereinheiten-Fragmenten (Mehrdomänen-Fragmente) und möglichst vieler einzelner FUs (Monodomänen-Fragmente), in möglichst reiner Form unabdingbar. Hierbei konnte teilweise auf Strategien zurückgegriffen werden, die bereits während früherer Arbeiten (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1994, 1999; Gebauer & Harris, 1999) sowie meiner Diplomarbeit (Büchler, 2004) etabliert wurden, bzw. diese als Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer Aufreinigungsstrategien benutzt werden. Nach proteolytischer Spaltung der Untereinheiten kam eine Anionenaustausch- sowie Größenausschluss-Chromatographie zur Aufreinigung der Fragmente bzw. einzelnen FUs zum Einsatz. Die Identifizierung der eluierten Proteinfragmente erfolgte ausschließlich immunologisch mittels der zweidimensionalen Immunelektrophorese, welche sich in diesem Fall auch aufgrund vorheriger Arbeiten und der verfügbaren Anti-KLH-Antikörper, als optimale Methode herausstellte. Nachdem ungefähr 20 mg an reiner FU KLH1-h aufgereinigt vorlagen, sollte die Probe zum *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* geschickt werden, um dort in einem Microbatch-Verfahren Bedingungen zu finden, die in einer Proteinkristallisation resultierten. Die dann bekannten Bedingungen sollten schließlich am *Institut für molekulare Biophysik (Mainz)* erneut angewandt werden, mit dem Ziel, aus den daraus gewonnenen Proteinkristallen am *Institut für medizinische Forschung (Heidelberg)* und am Synchrotron des *Paul-Scherrer Instituts (Schweiz)* eine Röntgenstruktur zu ermitteln. Bezüglich der Studien zur enzymatischen Aktivierung des KLH sowie der thermodynamischen Stabilität kamen die gleichen Methoden zur Aufreinigung von Mono- oder Mehrdomänenfragmente zum Einsatz, wie bereits oben beschrieben. Zur Abtrennung von (Di)dekameren von größeren Multidekameren kam eine Größenausschluss-Chromatographie zur Anwendung. Um reine KLH2-Didekamere zu erhalten, musste allerdings auf die Hämolymphe-Entnahme am Tier zurückgegriffen werden, welches zuvor 3 Monate in Gefangenschaft gehalten wurde und die Isoform 1 nahezu komplett metabolisiert hatte.

2 Isolierung von KLH1- und KLH2-Didekameran und deren Untereinheiten

Sowohl die Studien zur Tyrosinase-/Catecholoxidase-Aktivität, als auch die Untersuchungen zur Temperaturstabilität des KLH, sollten u.a. auch an den Oligomeren Didekameran (DD) sowie den Untereinheiten (UE) beider KLH-Isoformen erfolgen. Diese mussten hierfür zunächst in reiner Form isoliert werden. Die Abtrennung der Untereinheiten war zudem für die nachfolgenden proteolytischen Spaltungen zur Isolierung einzelner FUs oder größerer Fragmente mittels Anionenaustausch- oder Größenausschluss-Chromatographie erforderlich. Die Aufreinigung erfolgte nach der Methode von Harris *et al.*, (1995) und beruht auf der selektiven Dissoziation der KLH2-DD in die Untereinheiten (UE), nach Dialyse des Gesamt-KLH (Firma Biosyn[®], Fellbach) gegen Ammoniummolybdat pH 5,7. KLH1 bleibt unter diesen Bedingungen in seiner nativen Struktur als Didekamere intakt und befindet sich nach mehrstündiger Zentrifugation im Pellet. Die dissoziierten KLH2-UE des Überstands wurden abgenommen und gegen Glycin-Puffer pH 9,6 dialysiert, während das Zentrifugationspellet mit den KLH1-DD in Stabilisierungs-Puffer pH 7,4 resuspendiert wurde. Zur Reinheitsprüfung wurde mit gelöstem Pellet und Überstand eine 5%-ige native PAGE sowie eine zweidimensionale Immunelektrophorese (*Crossed* IE) durchgeführt (Abb. C1).

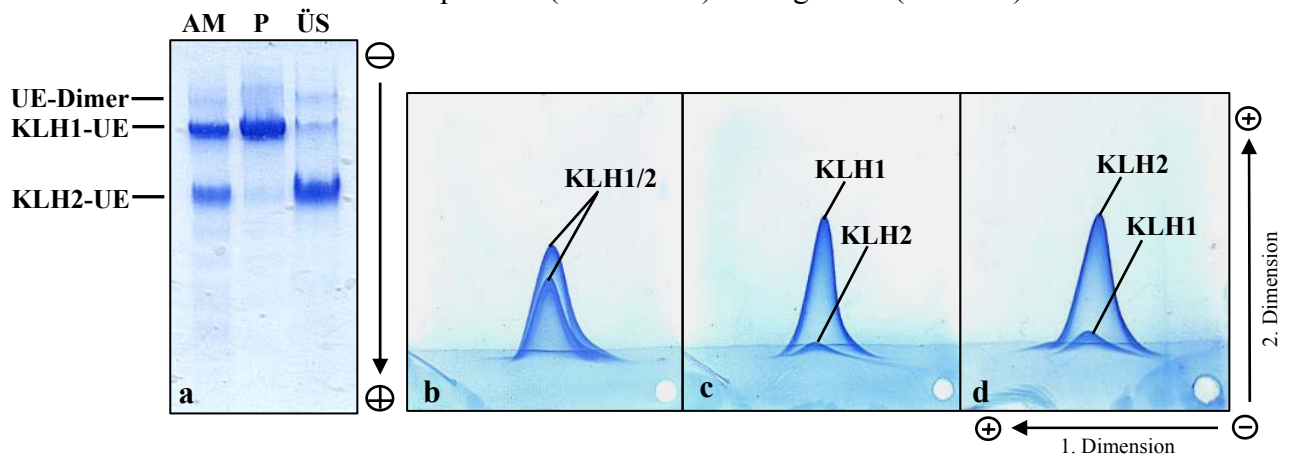


Abb. C1: Reinheitsprüfung der Isolierung beider Isoformen mittels nativer PAGE und 2D-IE.

a) 5% native PAGE des KLH-Gesamt vor der Aufreinigung (AM) sowie des resuspendierten Pellets (P) und des Überstands (ÜS) der Zentrifugation. Es zeigte sich im Vergleich zum Ausgangsmaterial jeweils nur noch eine Hauptbande mit der KLH1- bzw. KLH2-UE. Noch nicht dissoziierte UE-Dimere lassen sich ebenfalls im Gel erkennen. b - d) *Crossed*-IE der gleichen Proben wie unter a) beschrieben, mit KLH-Gesamt (b), Pellet (c) und ÜS (d) der Zentrifugation. Nach der Aufreinigung sind in b) und c) nur noch kleine Kontaminationen an KLH1 bzw. KLH2 sichtbar. Die Ausbeuten beider Isoformen beliefen sich auf 75 – 85 %.

Unter den alkalischen Bedingungen von PAGE und IE kam es zu einer Dissoziation der KLH1-DD in die UE, was jedoch für den Zweck der Reinheitsprüfung kein Problem darstellte. Beide Methoden zeigten eine erfolgreiche Isolierung beider Isoformen. Es waren nur noch kleinere Kontaminationen der jeweils anderen Isoform im nativen Gel (Abb. C1 a) sowie der *Crossed* IE (Abb. C1 b – d) nachweisbar, wobei KLH1 stets reiner vorlag als KLH2. Die Ausbeuten an beiden isolierten Isoformen beliefen sich auf 75 – 85 %.

Um die in Stabilisierungs-Puffer resuspendierten KLH1-DD des Zentrifugationspellets auf das Vorkommen von etwaigen restlichen KLH2-Multidekameran (MD) zu überprüfen, wurde

die Probe im TEM überprüft (Abb. C2). Dort zeigte sich, dass das gelöste Pellet nahezu rein an KLH1-DD und kleineren -Clustern war, während KLH2-MD nicht auszumachen waren.

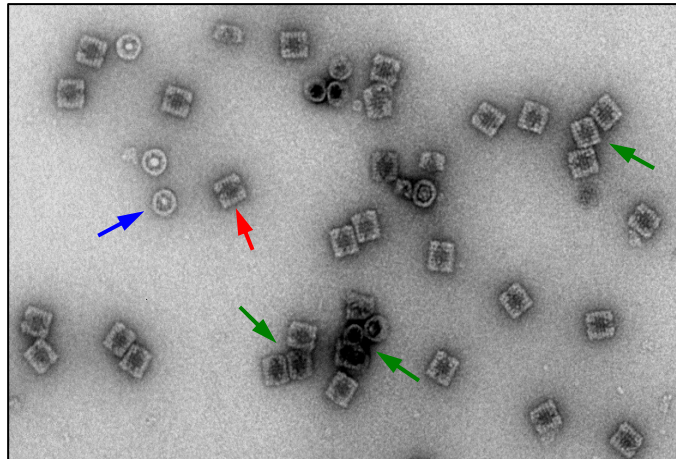


Abb. C2: Überprüfung der isolierten KLH1-DD im TEM.

Das in Stabilisierungspuffer gelöste Pellet der Zentrifugation war nahezu rein an KLH1-DD (roter Pfeil: Seitenansicht; blauer Pfeil: Topansicht) und kleineren KLH1-DD-Clustern (grüne Pfeile). KLH2-MD waren im TEM nicht zu erkennen.

Die Aufreinigung nach Harris *et al.* (1995) resultierte zwar in einer erfolgreichen Abtrennung beider Isoformen, allerdings waren die KLH2-DD nach Dialyse in Ammoniummolybdat pH 5,7 bereits in Untereinheiten zerfallen. Zur Isolierung der DD dieser Isoform musste demnach eine andere Strategie gewählt werden. Hierbei wurde nicht auf das KLH der Firma Biosyn[®] zurückgegriffen, sondern das Hämocyanin frisch aus einer Schlüsselbohrschnecke gezapft, die bereits längere Zeit in Gefangenschaft gehalten wurde. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass die Schnecken unter diesen Bedingungen, aufgrund von Mangelernährung, nahezu ihr gesamtes KLH1 als Quelle für Aminosäuren metabolisieren. Um das Hämocyanin der Schnecke auf das etwaige Vorkommen beider Isoformen bzw. die Reinheit an KLH2 zu überprüfen, wurde eine 5%-ige native PAGE durchgeführt (Abb. C3).

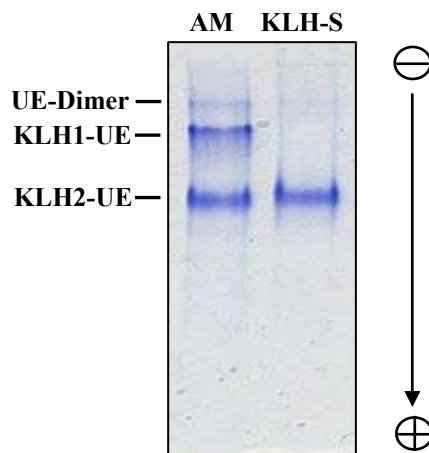


Abb. C3: Überprüfung des Hämocyanins von *Megathura crenulata* nach dreimonatiger Hälterung mittels nativer PAGE.

Eine 5%-ige native PAGE des frisch gezapften KLH aus der Schnecke (KLH-S), zeigte im Vergleich zum KLH-Gesamt der Firma Biosyn[®] (AM), keinerlei Vorkommen mehr an KLH1.

Die Auftrennung des gezapften KLH aus *Megathura crenulata* (Abb. C3, KLH-S) mittels nativer PAGE, ergab im Vergleich zum KLH-Gesamt der Firma Biosyn® (Abb. C3, AM) keinerlei Vorkommen der Isoform 1. Diese wurde somit vollständig von der Schnecke metabolisiert. Da auch keine Degradation des KLH2 zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, dass das gezapfte Hämocyanin in Form von KLH2-DD und Multidekameran vorlag. Zur Abtrennung der letzteren wurde das Hämocyanin zunächst einer Größenausschluss-Chromatographie (SEC, Biogel® A-15m) unterzogen, um Fraktionen reiner KLH2-DD zu erhalten (Abb. C4).

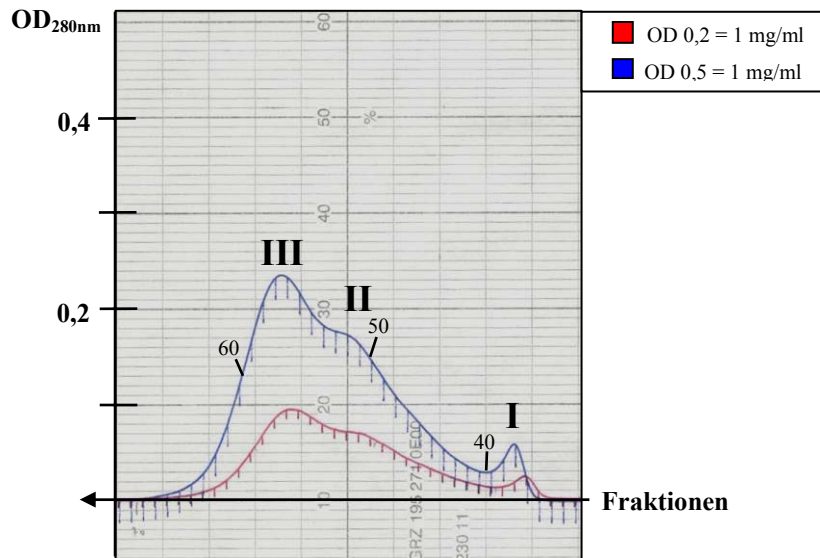


Abb. C4: SEC des aus der Schnecke gezapften KLH2.

Die SEC im Biogel® A-15m resultierte in drei Elutionsgipfeln, was auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Die Elution erfolgte mittels Stabilisierungspuffer pH 7,4. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 1,0 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. I – III: Elutionsgipfel.

Das Elutionsprofil der SEC lieferte drei Elutionsgipfel, so dass bereits von einer erfolgreichen Abtrennung unterschiedlich großer Proteine ausgegangen werden konnte (Abb. C4). Um Fraktionen reiner KLH2-DD auszumachen, wurden ausgewählte Fraktionen jedes Gipfels im TEM analysiert (Abb. C5).

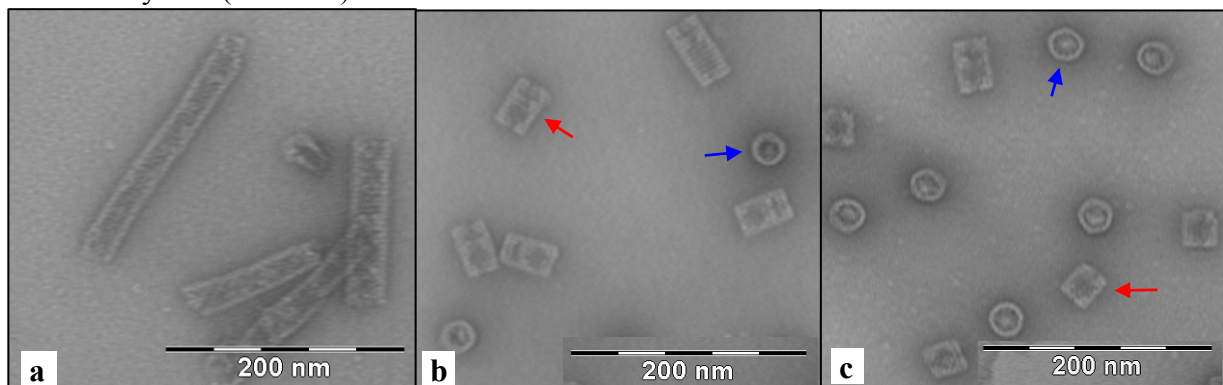


Abb. C5: Fraktionen der Elutionsgipfel I - III der SEC des KLH2 (Abb. C4) im TEM.

a) Fraktion 38 des Elutionsgipfels I mit langen Multidekameran. b) Fraktion 51 des Elutionsgipfels II mit kurzen Multidekameran. c) Fraktion 59 des Elutionsgipfels III mit überwiegend KLH2-Didekameran. Rote Pfeile: Seitenansicht, blaue Pfeile: Topansicht.

Im TEM zeigte sich wie erwartet, eine sehr gute Abtrennung der unterschiedlich großen Oligomerisierungsformen des KLH2. So kam es innerhalb des ersten Gipfels der SEC zu einer Elution sehr langer Multidekamere (Abb. C5 a), gefolgt von sehr kurzen Multidekameren in Elutionsgipfel II (Abb. C5 b). Letztere bestanden größtenteils aus einem zentralen Didekamer und nicht mehr wie ein oder zwei angelagerten Dekameren an einer Seite des Hohlzylinders. Die Fraktionen des letzten und größten Elutionsgipfels III enthielten fast ausschließlich die gewünschten Didekamere des KLH2 (Abb. C5 c). Diese Fraktionen wurden vereinigt und für die nachfolgenden Studien herangezogen.

Die proteolytischen Spaltungen zur Isolierung einzelner FUs oder größerer Fragmente, erfolgten anhand der Untereinheiten beider Isoformen. Eine Dissoziation der DD kann durch alkalische Bedingungen und den Entzug zweiwertiger Kationen erzielt werden. Entsprechend wurden die aufgereinigten KLH1-DD des resuspendierten Zentrifugationspellets (Abb. C2) gegen Glycin-Puffer pH 9,6 dialysiert, um KLH1-UE zu erhalten. Die bereits in Ammoniummolybdat-Puffer pH 5,7 zerfallenen KLH2-Untereinheiten des Zentrifugenüberstandes wurden ebenfalls gegen Glycin-Puffer dialysiert, um das für die weiteren Untersuchungen störende Ammoniummolybdat vollständig zu entfernen.

3 Isolierung von KLH1-Dekameren

Für die thermodynamischen Studien (Kap. C14) sollten auch die oligomeren Dekamere des KLH einer Hitzedenaturierung unterzogen werden, um deren Thermostabilität mit der Stabilität von Didekameren vergleichen zu können. Söhngen *et al.* (1997) konnten zeigen, dass die KLH1-DD nach Dialyse gegen Stabilisierungs-Puffer mit einem pH-Wert von 8,5 in Dekamere zerfallen und diese unter diesen Bedingungen auch einige Tage stabil bleiben. Entsprechend wurden die bereits aufgereinigten KLH1-Didekamere (Kap. C2) über Nacht gegen Stabilisierungs-Puffer pH 8,5 dialysiert und die Proben am nächsten Tag auf eine erfolgreiche Dissoziation in einzelne Dekamere im TEM überprüft. Da jedoch neben einer Vielzahl von Dekameren auch noch zahlreiche Didekamere sowie Bruchstücke zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt), wurde zur Abtrennung reiner Dekamere eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC, Biogel[®] A-15m) durchgeführt (Abb. C6).

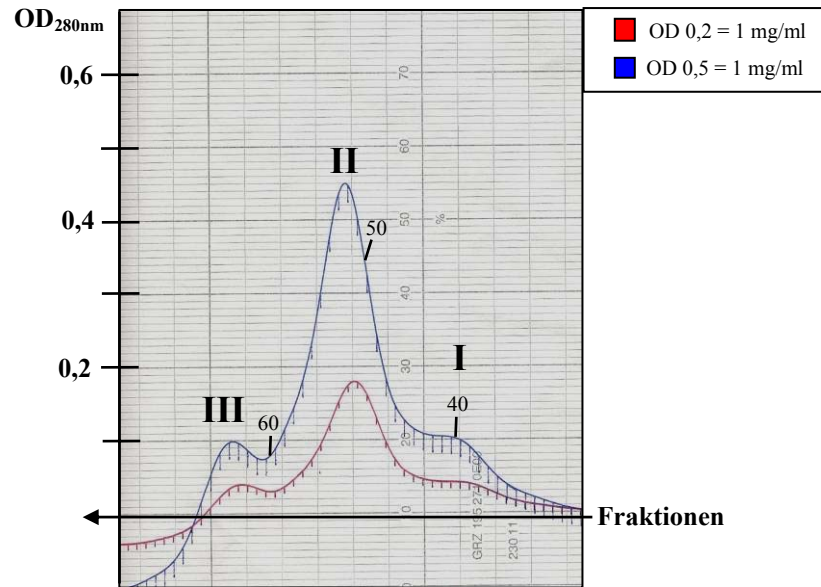


Abb. C6: SEC der gegen Stabilisierungs-Puffer pH 8,5 dialysierten KLH1-DD.

Die SEC im Biogel[®] A-15m resultierte in drei Elutionsgipfeln, was auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Die Elution erfolgte mittels Stabilisierungs-Puffer pH 8,5. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 1,0 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. I – III: Elutionsgipfel.

Im Elutionsprofil der SEC waren drei Elutionsgipfel zu erkennen, was bereits auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Zur genaueren Analyse wurden von jedem Elutionsgipfel jeweils ausgewählte Fraktionen im TEM auf das ausschließliche Vorkommen von KLH1-Dekameren überprüft (Abb. C7).

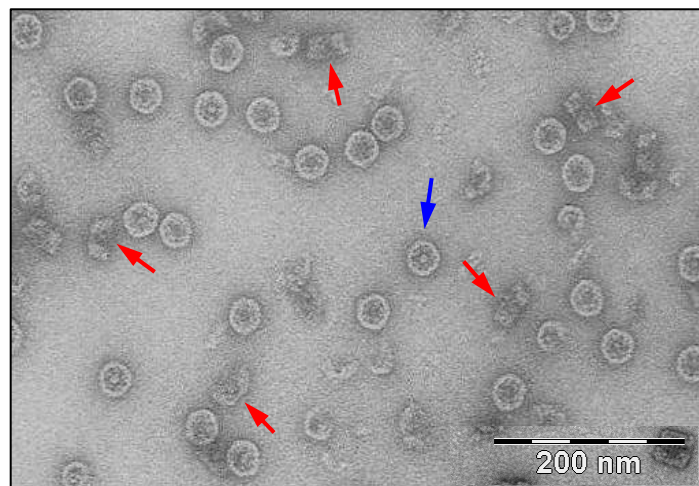


Abb. C7: Fraktion 50 des Elutionsgipfels II der SEC (Abb. C6) im TEM.

Durch die SEC konnte im Elutionsgipfel II eine Abtrennung der KLH1-Dekamere (rote Pfeile: Seitenansicht; blauer Pfeil: Topansicht) von KLH1-DD/-Clustern und kleineren Bruchstücken erzielt werden.

In den TEM-Aufnahmen konnte im ersten kleineren Elutionsgipfel der SEC erwartungsgemäß eine Elution der größeren KLH1-DD-Clustern beobachtet werden, gefolgt von den kleineren Dekameren im Hauptgipfel II (Abb. C7) und den kleinsten Bruchstücken im Gipfel III. Die reinen KLH1-Dekamer-Fractionen des Gipfels II wurden vereinigt und für die nachfolgenden Studien herangezogen.

4 Isolierung von Mono- und Mehrdomänen-Fragmenten des KLH2

Für die späteren enzymkinetischen (Kap. C13) und thermodynamischen (Kap. C14) Studien mussten zunächst möglichst viele Fragmente und einzelne FUs des KLH2 in reiner Form isoliert werden. Hierzu wurden die isolierten KLH2-Untereinheiten (Kap. C2) mit verschiedenen Proteasen gespalten und die Spaltprodukte über Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) abgetrennt. Falls nur eine unzureichende Abtrennung der Fragmente und/oder FUs erfolgte, wurden bestimmte Fraktionen einer weiteren Aufreinigung durch Größenausschluss-Chromatographie (SEC) unterzogen.

4.1 Spaltung der KLH2-Untereinheiten mit Trypsin

Nach Gebauer *et al.* (1994) sollte eine Spaltung der KLH2-UE mit Trypsin in den Fragmenten -ab, -b, -c, -de und -fg resultieren. Um entsprechend größere Mengen der einzelnen FUs KLH2-b und KLH2-c in reiner Form zu gewinnen, wurden 70 mg der KLH2-UE mit insgesamt 2 % (w/w) Trypsin, für fünf Stunden bei 37 °C gespalten. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Spaltprodukte über eine große Anionenaustauscher-Säule (Q-Sepharose, 210 ml Bettvolumen) mittels eines linearen Elutionsgradienten von 0 – 0,5 M NaCl. (Abb. C8 a). Die Fraktionen der ersten drei der insgesamt vier Elutionsgipfel wurden auf einer 10%-igen SDS-PAGE auf Reinheit einzelner Fragmente oder FUs überprüft (Abb. C8 b).

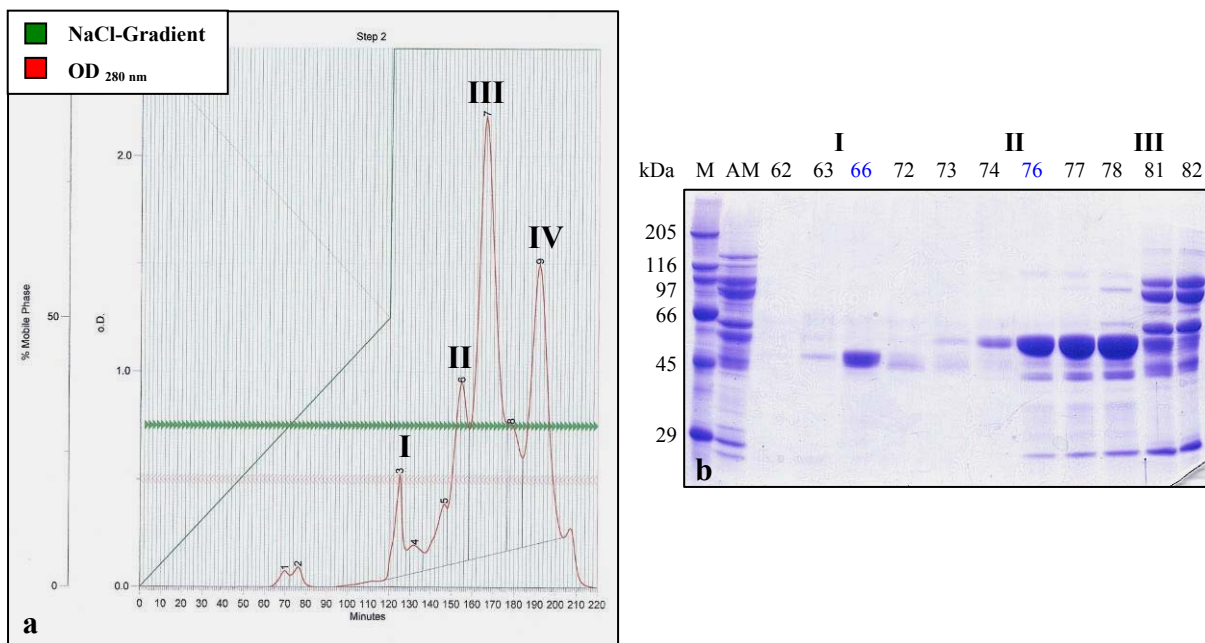


Abb. C8: Auftrennung der mit Trypsin limitiert gespaltenen KLH2-UE über AEC.

a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. Grün: NaCl-Gradient; Rot: OD_{280nm}. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der ersten drei Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C9). M: Proteinmarker; AM: Ausgangsmaterial der AEC (mit Trypsin gespalten KLH2-UE); I – IV: Elutionsgipfel.

Die SDS-PAGE der mit Trypsin limitiert gespaltenen KLH2-UE (AM) zeigte größtenteils eine Spaltung in Mono- bzw. Didomänen-Fragmente mit molekularen Massen zwischen

50 - 100 kDa (Abb. C8 b). Wie zu erwarten, resultierte die AEC in einer Elution kleinerer Fragmente in den ersten beiden Elutionsgipfeln, wobei die molekulare Masse der Hauptbanden mit ~ 50 kDa auf Monodomänen-Fragmente, also einzelne FUs schließen ließ (Abb. C8 b). Um nachzuweisen, um welche FUs es sich in den ersten beiden Elutionsgipfeln handelte, wurde mit den entsprechenden Fraktionen eine *Crossed-line* IE durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich eine immunologische Verwandtschaft des *Line*-Proteins mit anderen FUs der ersten Dimension nachweisen (Abb. C9 b, d). Zur Reinheitsprüfung wurde zusätzlich eine *Crossed* IE durchgeführt, wobei die Proteine einer Fraktion in der ersten Dimension zuerst nach Ladung aufgetrennt und anschließend in der zweiten Dimension gegen einen polyklonalen Anti-KLH-Antikörper laufen gelassen wurden (Abb. C9 c, e).

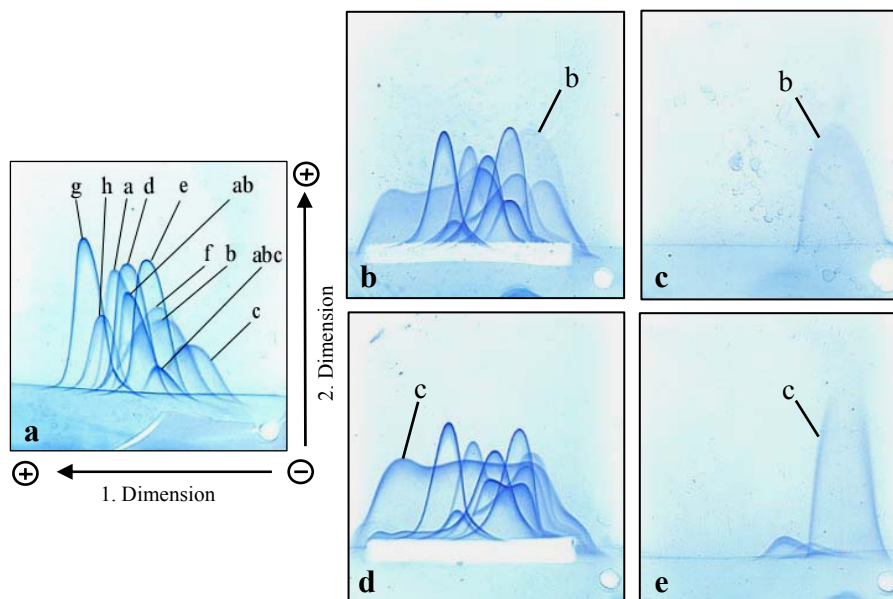


Abb. C9: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C8) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Kontrolle). b - c) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktion 66 der AEC. d - e) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktion 76 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Mittels der *Crossed-line* IE konnte das Monodomänen-Fragment in Fraktion 66 der AEC eindeutig als FU KLH2-b identifiziert werden (Abb. C9 b), da das *Line*-Protein ausschließlich mit der FU-b der Elastasespaltung der KLH2-UE fusionierte (Abb. C9 a) und in einem erhöhten Präzipitationsgipfel resultierte. Die hohe Reinheit innerhalb dieser Fraktion konnte neben der SDS-PAGE (Abb. C8 b) zusätzlich durch eine *Crossed* IE nachgewiesen werden, da sich hier nur ein Präzipitationsgipfel zeigte (Abb. C9 c). Bei der FU des zweiten Elutionsgipfels handelte es sich um die FU KLH2-c (Abb. C9 d), wobei die Fraktionen hier allerdings noch leicht mit anderen Proteinfragmenten kontaminiert waren. Diese Verunreinigung ließ sich bereits in der SDS-PAGE anhand zusätzlicher kleinerer Proteinbanden erkennen (Abb. C8 b). Entsprechend waren bei der *Crossed* IE noch kleinere weitere Präzipitationsgipfel sichtbar (Abb. C9 e). Dennoch war die Reinheit noch ausreichend, um mit dieser FU weitere Experimente durchzuführen. Die Ausbeute der

Aufreinigung dieser beiden FUs betrug 5 mg (60 %) für die FU KLH2-c, allerdings lediglich 340 µg (4 %) für die FU KLH2-b. Zur Gewinnung größerer Mengen der letzteren wurde die Aufreinigung entweder mehrmals wiederholt oder die Spaltdauer auf 6 Stunden erhöht, um die Spaltprodukte anschließend auf einer Säule mit geringerem Bettvolumen (53 ml) aufzutrennen. Durch diese Strategie konnte die Ausbeute an KLH2-b zwar auf 1,9 mg (29 %) erhöht werden, allerdings waren die Fraktionen der FU-c unter diesen Bedingungen zu stark verunreinigt, um sie verwenden zu können (Daten nicht gezeigt).

4.2 Spaltung der KLH2-Untereinheiten mit V8-Protease

Die limitierte Proteolyse mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease resultierte nach Söhngen *et al.* (1997) und Gebauer & Harris (1999) in einer Spaltung der KLH2-UE in die Tridomänen-Fragmente KLH2-abc sowie die Pentamerdomänen-Fragmente KLH2-defgh. Die Anzahl der letzteren nimmt durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration und längere Inkubationsdauer mit dem Enzym ab. Gleichzeitig zeigt sich in der SDS-PAGE eine Zunahme der Tetramerdomänen-Fragmente KLH2-defg. Zur Isolierung der Fragmente KLH2-abc und -defgh wurden 70 mg der aufgereinigten KLH2-UE mit 2 % (w/w) V8-Protease für vier Stunden bei 37 °C gespalten und die Spaltprodukte anschließend über eine große AEC-Säule (Q-Sepharose, 210 ml Bettvolumen), mittels eines linearen Elutionsgradienten von 0,16 – 0,5 M NaCl abgetrennt. Hierbei zeigte sich eine Elution der Fragmente in drei Elutionsgipfeln (Abb. C10 a). Ausgewählte Fraktionen derselben wurden zur Reinheitsprüfung einer 10 %-igen SDS-PAGE unterzogen (Abb. C10 b, c).

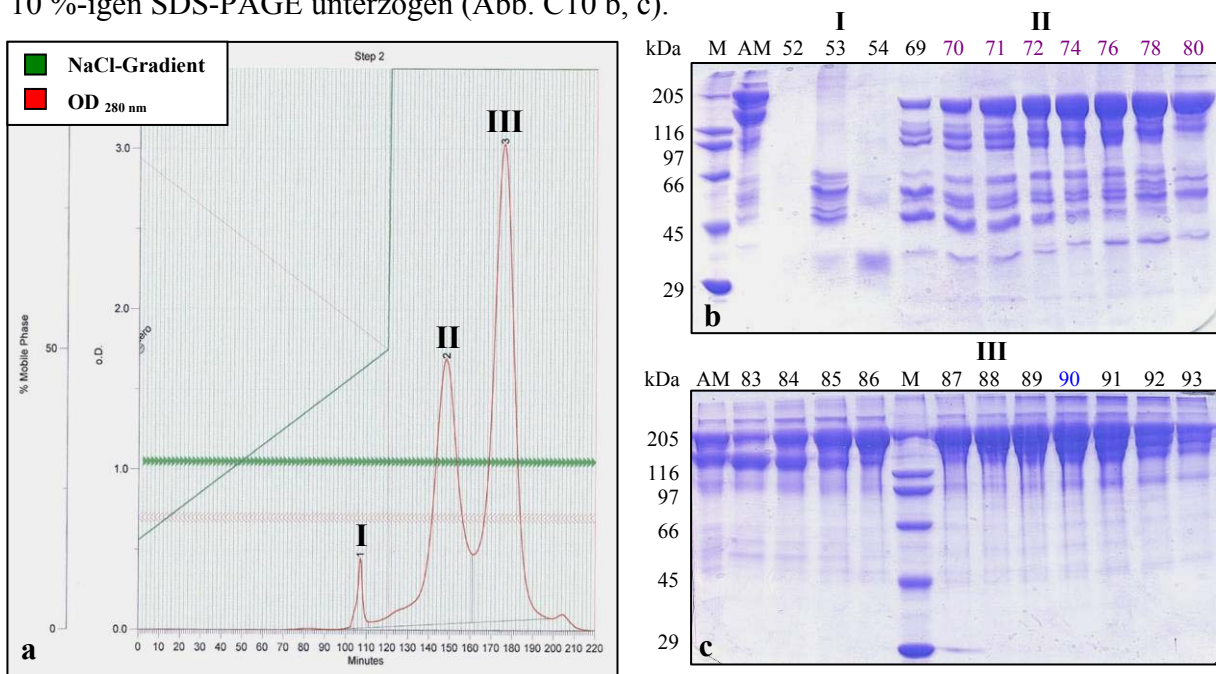


Abb. C10: Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH2-UE über AEC.
 a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,16 - 0,5 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. Grün: NaCl-Gradient; Rot: OD_{280nm}. b - c) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der drei Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C9). Violett gekennzeichnete Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung auf eine SEC-Säule aufgetragen (Abb. C12) M: Proteinmarker; AM: Ausgangsmaterial der AEC (mit V8-Protease gespalten KLH2-UE); I – III: Elutionsgipfel.

Durch die Inkubation der KLH2-UE mit 2 % V8-Protease für vier Stunden, kam es größtenteils zu einer Spaltung der UE in Tri- und Tetramerdomänen-Fragmente (Abb. C10 b, AM). Allerdings ließen sich mittels der SDS-PAGE auch zahlreiche Mono- und Didomänen-Fragmente nachweisen, die zusammen mit den Tridomänen-Fragmenten im Gipfel II eluierten. Die Monodomänen-Fragmente in Elutionsgipfel I konnten aufgrund ihrer nur geringen Größenunterschiede nicht weiter abgetrennt werden. Zur immunologischen Charakterisierung der Tri-, Tetra- und Pentamerdomänen-Fragmente des Gipfels III, wurde mit ausgewählten Fraktionen eine *Crossed-line* IE durchgeführt (Abb. C11).

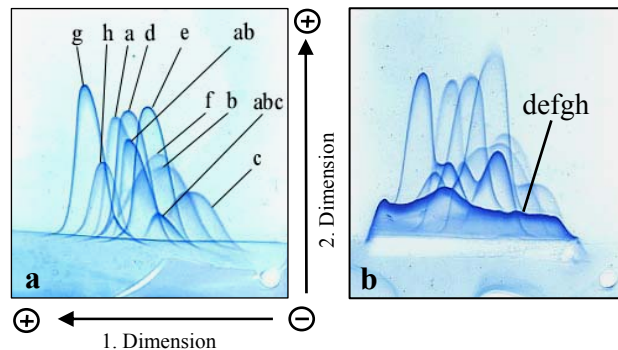


Abb. C11: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen des Elutionsgipfels III der AEC (Abb. C10) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Kontrolle). b) *Crossed-line* IE der Fraktion 90 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Durch die *Crossed-line* IE konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den größeren Fragmenten des Elutionsgipfels III der AEC (Abb. C10) um die Fragmente -defgh der KLH2-UE handelte (Abb. C11). Gemäß der molekularen Massen in der SDS-PAGE (Abb. C10 c) kamen innerhalb der Fraktionen des Gipfels III jedoch auch die Fragmente KLH2-def, sowie -defg vor, die in der *Crossed-line* IE aufgrund ihrer immunologischen Verwandtschaft in einem gemeinsamen erhöhten Präzipitationsgipfel resultierten. Die Fraktionen waren frei von den FUs KLH2-a, -ab sowie -abc, da diese als einzige nicht in der *Line* angehoben wurden (Abb. C11 b).

Um die im Gipfel II der AEC eluierten Tridomänen-Fragmente von den kleineren Bruchstücken abzutrennen, wurden die Fraktionen 70 – 80 (17 mg) vereinigt, aufkonzentriert und einer SEC (Biogel® P-100) unterzogen (Abb. C12). Hierbei zeigte sich eine Elution der Fragmente in zwei Elutionsgipfeln (Abb. C12 a). Ausgewählte Fraktionen derselben wurden zur Reinheitsprüfung einer 10 %-igen SDS-PAGE unterzogen (Abb. C12 b).

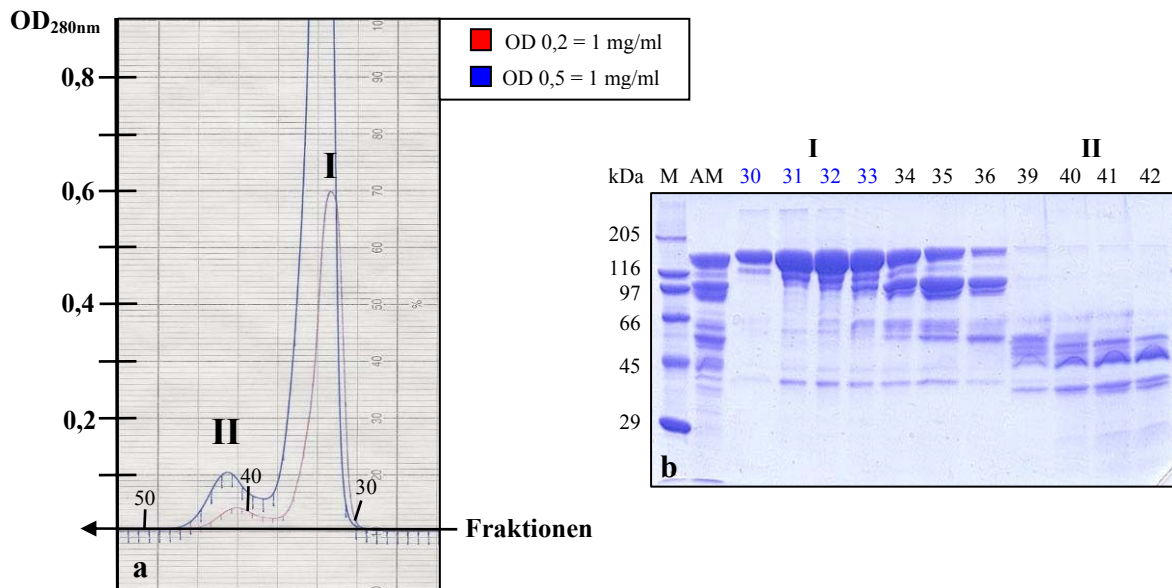


Abb. C12: Auftrennung der Fragmente des Gipfels II der AEC (Abb. C10) mittels SEC (Biogel® P-100).

a) Das Elutionsprofil der SEC zeigte zwei Elutionsgipfel, was auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Die Elution erfolgte mittels Glycin-Puffer pH 9,6. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 1,0 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der zwei Elutionsgipfel der SEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C13). *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der SEC (Fraktionen 70 – 80 der AEC); *I – II*: Elutionsgipfel.

Durch die weiterführende Aufreinigung der Fragmente des Elutionsgipfels II der AEC (Abb. C12 b, AM) mittels SEC, konnte eine Abtrennung der größeren Tridomänen-Fragmente von mehreren kleineren Monodomänen-Fragmenten (Gipfel II) erzielt werden, wobei letztere im Gipfel II von der Säule eluierten. Zur immunologischen Charakterisierung der größeren Proteine des Gipfels I der SEC, wurden die Fraktionen 30 – 33 mit den geringsten Verunreinigungen vereinigt und einer *Crossed-* sowie *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C13).

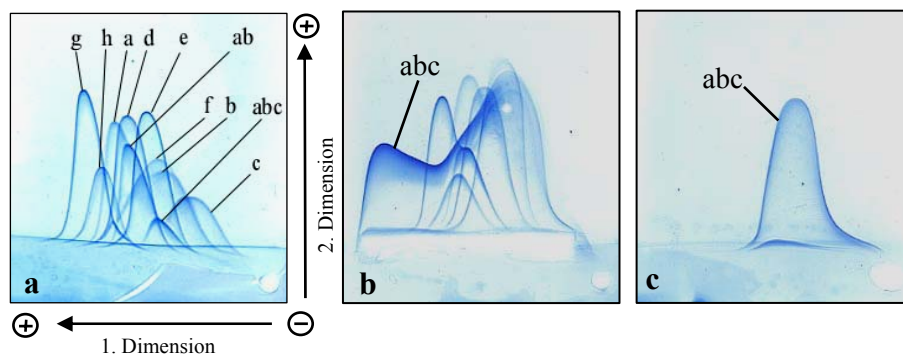


Abb. C13: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C12) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Kontrolle). b) *Crossed-line* IE der Fraktionen 30 - 33 der SEC. c) *Crossed* IE der Fraktionen 30 - 33 der SEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Die *Crossed-line* IE der gemäß SDS-PAGE reinsten Fraktionen des ersten Elutionsgipfels der SEC (Abb. C12 b), lieferte den Nachweis, dass es sich bei dem Tridomänen-Fragment eindeutig um KLH2-abc handelte, da das *Line*-Protein vollständig mit den FUs KLH2-a, -ab

und -abc der Elastasespaltung der KLH2-UE (Abb. C13 a) fusionierte (Abb. C13 b). Die große Reinheit der vereinigten Fraktionen an KLH2-abc zeigte sich in der *Crossed* IE, wo eine nur sehr geringfügige Kontamination mit anderen Proteinfragmenten der V8-Spaltung zu erkennen war (Abb. C13 c). Die Ausbeute des aufgereinigten Tridomänen-Fragments KLH2-abc belief sich auf 12 mg (45 %).

4.3 Sekundärspaltung der V8-Spaltprodukte der KLH2-UE mit Trypsin

Um weitere FUs der KLH2-UE aufzureinigen, können die größeren Tetra- und Pentamerdomänen-Fragmente (-defg, -defgh) der Spaltung mit V8-Protease (Kap. C4.2, Abb. C10) einer Sekundärspaltung mit Trypsin unterzogen werden. Hierbei entstehen bevorzugt die Didomänen-Fragmente KLH2-de, -fg sowie die einzelnen FUs-h, die sich durch eine AEC isolieren lassen (Gebauer *et al.*, 1994, 1999; Gebauer & Harris, 1999). Bereits während meiner Diplomarbeit (2004) stellte sich der Einsatz größerer Mengen an V8-Protease sowie eine Enzyminkubation für fünf, anstelle von vier Stunden, als vorteilhaft zur Isolierung größerer Mengen des Didomänen-Fragments KLH2-fg heraus. Die Menge der Tetramerdomänen-Fragmente -defgh nimmt hierbei allerdings zu Gunsten des Tetramerdomänen-Fragments -defg ab (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer & Harris, 1999). Die Isolierung der FU-h erwies sich unter diesen Bedingungen nach der Sekundärspaltung mit Trypsin jedoch als schwierig und konnte bereits während meiner Diplomarbeit nicht erzielt werden. Wie sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, sollte der FU KLH2-f eine besondere Rolle bei den Studien zur Tyrosinasefunktion zukommen, weshalb auf die Isolierung größerer Mengen an KLH2-fg besonderen Wert gelegt wurde. Entsprechend wurden 60 mg der KLH2-UE, für fünf Stunden bei 37 °C, nach einmaliger Zugabe von 10 % (w/w) V8-Protease gespalten und die Proteinfragmente über eine AEC-Säule (Q-Sepharose), mittels eines linearen Elutionsgradienten von 0 – 0,5 M NaCl aufgetrennt. Da die Elution der größeren Fragmente gemäß der V8-Spaltung in Kap. 2.3.2 (Abb. C10) im Gipfel III erfolgte, wird hier auf einer erneute Darstellung des Elutionsprofils sowie der SDS-PAGE verzichtet. Die Fraktionen des Elutionsgipfels III mit den Fragmenten KLH2-defg(h) wurden vereinigt (13 mg), aufkonzentriert und anschließend einer limitierten Sekundärspaltung mit 2 % (w/w) Trypsin unterzogen. Auch hier erfolgte die Spaltung für 5 Stunden bei 37 °C. Die nachfolgende erneute Auftrennung der sekundären Spaltprodukte auf einer kleinen AEC-Säule (Q-Sepharose, 53 ml Bettvolumen), lieferte bei einem linearen Elutionsgradienten von 0 – 0,5 M NaCl eine Elution der Proteine in drei Elutionsgipfeln (Abb. C14 a). Ausgewählte Fraktionen derselben wurden mittels einer 10 %-igen SDS-PAGE auf Reinheit überprüft (Abb. C14 b).

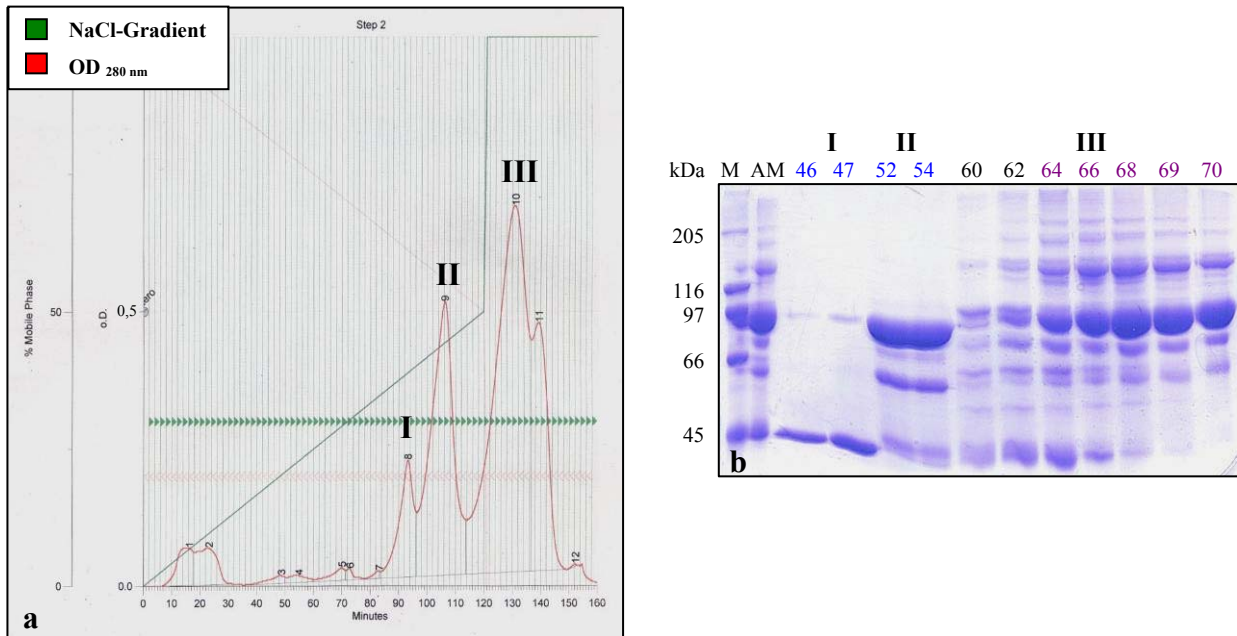


Abb. C14: Auftrennung der mit Trypsin sekundär gespaltenen großen Fragmente (-defg(h)) der V8-Spaltung der KLH2-UE (Abb. C10) über AEC.

a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. *Grün*: NaCl-Gradient; *Rot*: OD_{280nm}. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der drei Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C15). Violett gekennzeichnete Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung auf eine SEC-Säule aufgetragen (Abb. C16) *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der AEC (mit Trypsin gesplante Fragmente (-defg(h)) der V8 Spaltung der KLH2-UE); *I – III*: Elutionsgipfel.

Gemäß den Literaturangaben konnte durch die Trypsinbehandlung der Fragmente KLH2-defg(h) eine weitere Aufspaltung in hauptsächlich kleinere Didomänen-Fragmente mit einer molekularen Masse von knapp 100 kDa erzielt werden (Abb. C14 b, AM). Allerdings resultierte die AEC der Spaltprodukte auch in einer Elution von einzelnen FUs im Gipfel I sowie von Tridomänen-Fragmenten in Gipfel III (Abb. C12 b). Die größtenteils reinen Mono- bzw. Didomänen-Fragmente der Elutionsgipfel I und II wurden mittels *Crossed-line* IE weiter charakterisiert (Abb. C15).

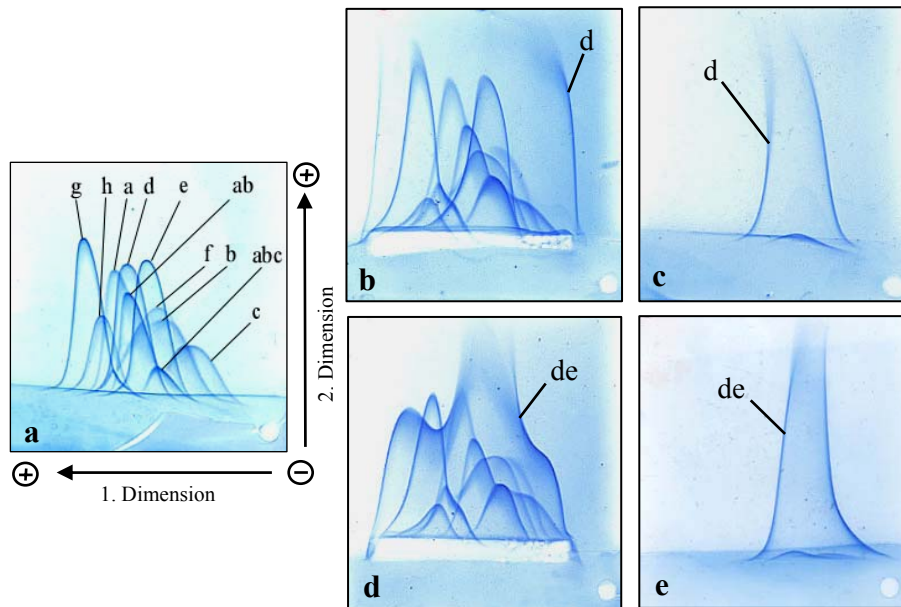


Abb. C15: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C14) mittels *Crossed-line IE*.

a) *Crossed IE* der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Kontrolle). b - c) *Crossed-* und *Crossed-line IE* der Fraktionen 45 - 47 der AEC. d - e) *Crossed-* und *Crossed-line IE* der Fraktionen 50 - 55 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Mit Hilfe der *Crossed-line IE* konnte das Monodomänen-Fragment des Elutionsgipfels I der AEC (Abb. C14) als KLH2-d identifiziert werden (Abb. C15 b). Die FU erwies sich in der *Crossed IE* zudem als sehr rein (Abb. C15 c), da das *Line*-Protein hierbei ausschließlich mit der FU-d der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Abb. C15 a) fusionierte. Eine vergleichbar hohe Reinheit zeigte das Didomänen-Fragment KLH2-de (Abb. C15 d), welches im Gipfel II der AEC eluierte. Auch hier waren nur geringfügige Kontaminationen mit anderen FUs der KLH2-UE feststellbar (Abb. C15 e), die vermutlich aus einem zusätzlichen Monodomänen-Fragment resultierten, dass sich in der SDS-PAGE als zusätzliche dünnere Proteinbande mit der molekularen Masse einer FU darstellte (Abb. C14 b). Die Ausbeute der isolierten FU KLH2-d betrug als Folge der Sekundärsplaltung und einem nachfolgenden weiteren Aufreinigungsschritt über AEC lediglich 360 µg (5 %). Gleiches gilt für das Didomänen-Fragment KLH2-de mit 2 mg (13 %), wobei sich die höhere Ausbeute aus den mit-einberechneten Verunreinigungen mit anderen Proteinfragmenten ergab.

Zur weiteren Aufreinigung der Fraktionen des Elutionsgipfels III der AEC, die in der SDS-PAGE (Abb. C14 b) neben Didomänen-Fragmenten noch weitere Bruchstücke enthielten, wurden die Fraktionen 64 - 72 (4 mg) vereinigt, aufkonzentriert und auf eine SEC-Säule (Biogel[®] P-60) aufgetragen. Das Elutionsprofil zeigte hierbei zwei Elutionsgipfel (Abb. C16 a), von denen jeweils ausgewählte Fraktionen zur Analyse von Fragmentgröße und Reinheitsgrad auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt wurden (Abb. C16 b).

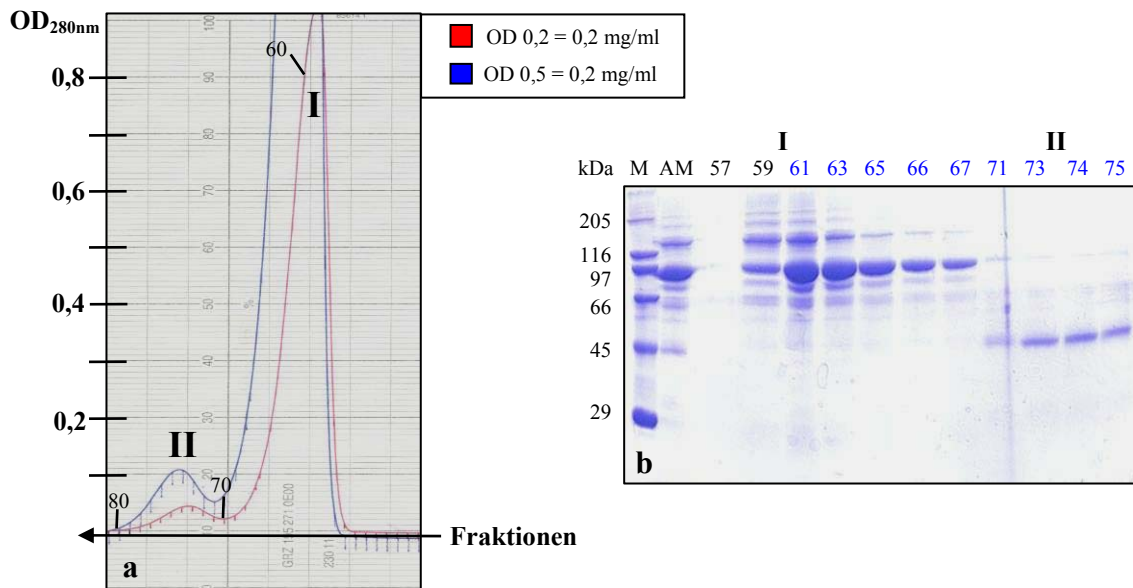


Abb. C16: Auftrennung der Fragmente des Gipfels III der AEC (Abb. C14) mittels SEC (Biogel® P-60).

a) Das Elutionsprofil der SEC zeigte zwei Elutionsgipfel, was auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Die Elution erfolgte mittels Glycin-Puffer pH 9,6. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 0,2 einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der zwei Elutionsgipfel der SEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C17). *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der SEC (Fraktionen 64 – 72 der AEC); *I – II*: Elutionsgipfel.

Die SEC der Fraktionen des Elutionsgipfels III der AEC (Abb. C14) lieferte eine erfolgreiche Abtrennung der Didomänen-Fragmente im Gipfel I, gefolgt von einzelnen FUs mit ~ 45 kDa im Gipfel II (Abb. C16 b). Während letztere in der SDS-PAGE sehr rein erschienen und nur eine Proteinbande zu erkennen war, enthielten die Fraktionen des ersten Elutionsgipfels noch geringfügige Kontaminationen mit anderen Fragmenten. Um die Proteine beider Elutionsgipfel bestimmten FUs zuordnen zu können sowie deren Reinheit weiter zu überprüfen, kam erneut die Methode der *Crossed-* sowie *Crossed-line* IE zum Einsatz (Abb. C17). Hierfür wurden jeweils die Fraktionen 61 – 66 des ersten Gipfels und die Fraktionen 71 – 75 des zweiten Gipfels vereinigt.

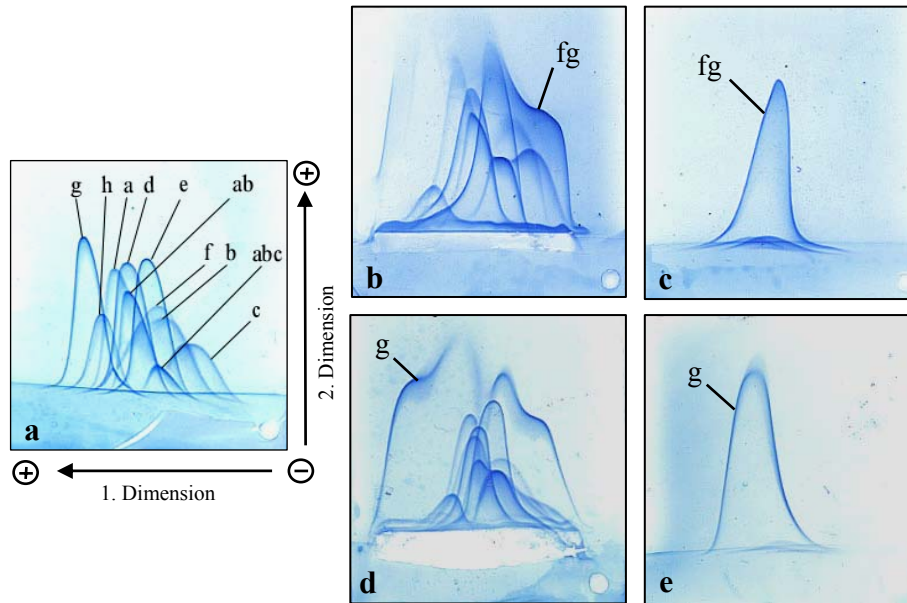


Abb. C17: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C16) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH2-UE (Kontrolle). b - c) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktionen 61 - 66 der SEC. d - e) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktionen 71 - 75 der SEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Das Didomänen-Fragment des ersten Elutionsgipfels der SEC (Abb. C16) fusionierte in der *Crossed-line* IE mit den FUs KLH2-f und -g (Abb. C17 b) der Elastasespaltung der KLH2-UE (Abb. C17 a). Wie bereits in der SDS-PAGE zu erkennen war (Abb. C16 b), zeigte sich auch in der *Crossed* IE eine geringfügige Verunreinigung mit anderen Proteinfragmenten, die allerdings keinen größeren Einfluss auf die weiteren Studien haben sollten (Abb. C17 c). Das Monodomänen-Fragment im Elutionsgipfel II der SEC wies eine immunologische Verwandtschaft mit der FU-g auf (Abb. C17 d). Zudem waren die Fraktionen dieses Gipfel absolut rein an dieser FU (Abb. C17 e). Die Ausbeuten der Aufreinigung des Mono- bzw. Didomänen-Fragments betragen, aufgrund der komplizierteren Isolierung mittels Sekundärsplattungen und mehreren AEC- und SEC-Läufen, lediglich 930 µg (7 %) für FUs KLH2-fg und 150 µg (2,5 %) für die FU KLH2-g.

5 Übersicht der KLH2-Splattungen und der Aufreinigungen der Splattprodukte

Die einzelnen Splattungen der KLH2-UE sowie die Aufreinigung der verschiedenen Splattprodukte sind zur besseren Übersichtlichkeit in Abb. C18 schematisch dargestellt. Die jeweiligen Proteinausbeuten der reinsten Fragmente und FUs sind ebenfalls angegeben. Die Prozentangaben zur jeweiligen Ausbeute einer FU beziehen sich auf die Ausgangsmenge an gespaltenen KLH2-UE, die auf die AEC-Säule aufgetragen wurden, geteilt durch acht FUs je Untereinheit (z.B. 50 mg/8 FUs = 6,25 mg einer FU = 100 %). Mit den einzelnen Fragmenten erfolgten nachfolgend die enzymkinetischen (Kap. C13) sowie thermodynamischen Studien (Kap. C14).

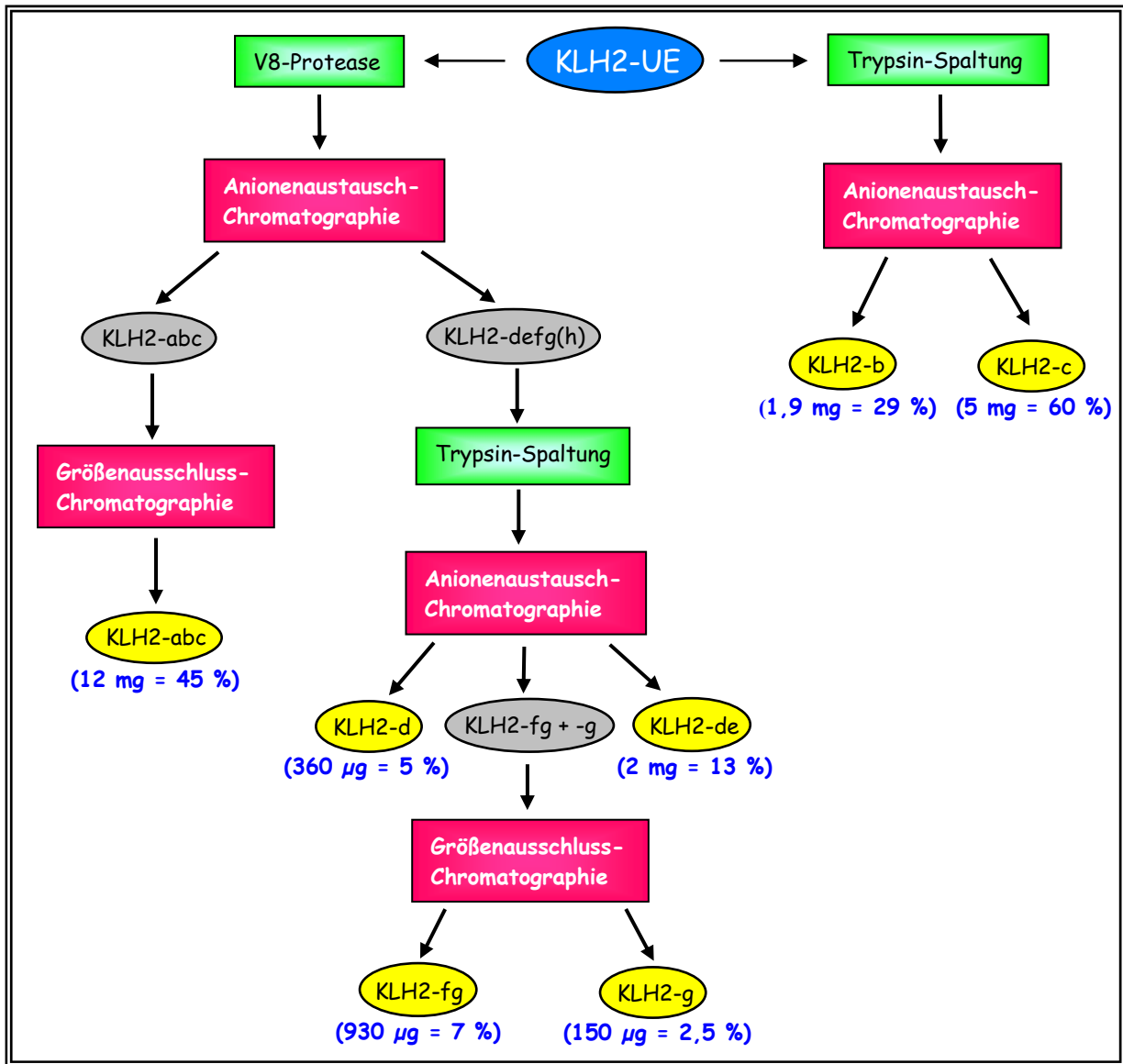


Abb. C18: Übersicht der Proteasespaltungen der KLH2-UE sowie der Aufreinigungen der Spaltprodukte. Die nach proteolytischen Spaltungen (grüne Kästen) der KLH2-UE (blaues Oval) in reiner Form isolierten FUs sind gelb markiert. Grau unterlegte Spaltprodukte waren noch stark mit anderen Proteinfragmenten verunreinigt und bedurften einer weiteren Aufreinigung über AEC und/oder SEC (rote Kästen). Die jeweiligen Proteinausbeuten sind in Klammern unter den entsprechenden reinen Spaltprodukten in mg bzw. µg und Prozent angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für das Fragment KLH2-abc sowie für die FU KLH2-c mit 12 mg bzw. 5 mg die höchsten Ausbeuten erzielt werden konnten. Im Gegensatz dazu lagen die Mengen an isoliertem Protein bei den Fragmenten KLH2-fg und -de sowie den FUs KLH2-d und -g, mit 150 µg (FU-g) bis maximal 2 mg (FUs-de) deutlich darunter. Die Gründe hierfür sind sicherlich in den gewählten Strategien zu suchen, da Sekundärsplaltungen gefolgt von zusätzlichen Aufreinigungsschritten über AEC und/oder SEC, in zunehmenden Verlusten der gewünschten Fragmente resultierten. Eine Ausnahme bildete hier die FU-KLH2-b, von der unter den bereits etablierten Strategien mit nur einem AEC-Lauf nach tryptischer Spaltung nur 340 µg (4%) isoliert werden konnten. Allerdings war es durch Variation der Bedingungen (Kap. C4.1) möglich, die Ausbeute dieser FU auf 1,9 mg (29%)

zu erhöhen, auch wenn es unter diesen Bedingungen zu keiner reinen Elution der FU KLH2-c in den nachfolgenden Fraktionen des gleichen AEC-Laufs kam. Obwohl die Ausbeuten der einzelnen FUs KLH2-b, -g und -d nicht hoch genug waren, um anhand dieser größere thermodynamische oder spektroskopische Studien durchzuführen, so zeigten sie in der SDS-PAGE sowie der *Crossed* IE doch die höchste Reinheit. Somit wurden sie hauptsächlich für die qualitative enzymatische Charakterisierung mittels *Crossed* IE eingesetzt (Kap. C13.2). Prinzipiell ist es auch möglich, durch Sekundärspaltungen des Fragments KLH2-abc mit Trypsin, nach einem erneuten AEC-Lauf das Didomänen-Fragment KLH2-ab sowie die FUs -b und -c rein zu isolieren (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1999; Gebauer & Harris, 1999). Allerdings zeigte sich bereits während meiner Diplomarbeit (Büchler, 2004), dass die Verluste vor allem an KLH2-b und -c hierbei so groß waren, dass eine Aufreinigung dieser beiden FUs anhand einer direkter Trypsinspaltung (Abb. C18) einfacher und schneller war und in vergleichbaren Ausbeuten resultierte.

6 Isolierung von Mono- und Mehrdomänen-Fragmenten des KLH1

Um Aussagen über die enzymkinetischen (Kap. C13) und thermodynamischen (Kap. C14) Eigenschaften verschiedener Mono- und Mehrdomänenfragmente der KLH1-UE tätigen zu können, bedurfte es auch hier zunächst einer Aufreinigung derselben. Die Strategien waren bezüglich der proteolytischen Spaltungen der UE und der Auftrennung der Spaltprodukte über AEC und/oder SEC, vergleichbar mit denen der Isolierung verschiedener Fragmente und FUs der KLH2-UE (Kap. C4).

6.1 Spaltung der KLH1-Untereinheiten mit Trypsin

Da eine limitierte Trypsinspaltung der KLH2-UE in einer erfolgreichen Isolierung der FUs KLH2-b und -c resultierte (Kap. C4.1), wurde die gleiche Strategie zunächst auch für die KLH1-UE angewandt. Hierzu wurden 55 mg der UE mit insgesamt 4 % (w/w) Trypsin für vier Stunden bei 37 °C gespalten, wobei das Enzym anfänglich in einer Menge von 2 % hinzugegeben wurde, gefolgt von weiteren 2 % nach einer Stunde Inkubationszeit. Die Abtrennung der Spaltprodukte erfolgte mittels einer kleinen AEC-Säule (Q-Sepharose, 53 ml Bettvolumen) bei einem Gradienten von 0,16 – 0,4 M NaCl. Das Elutionsprofil zeigte sechs Gipfel (Abb. C19 a), wovon jeweils ausgewählte Fraktionen zur Analyse von Reinheit und Fragmentgröße auf einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetragen wurden (Abb. C19 b).

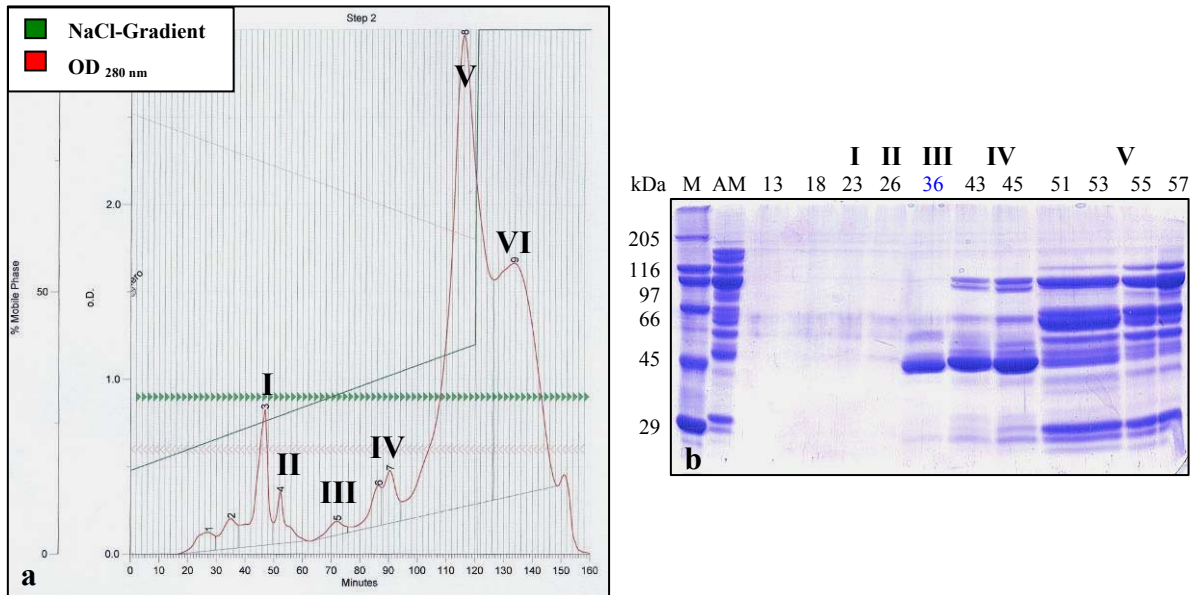


Abb. C19: Auftrennung der mit Trypsin limitiert gespaltenen KLH1-UE über AEC.

a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,16 - 0,4 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. Grün: NaCl-Gradient; Rot: OD_{280nm}. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der ersten fünf Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C20). M: Proteinmarker; AM: Ausgangsmaterial der AEC (mit Trypsin gesplante KLH1-UE); I – VI: Elutionsgipfel.

Die limitierte Spaltung der KLH1-UE mit Trypsin führte zu einer Vielzahl von Spaltprodukten zwischen 50 und 150 kDa (Abb. C19 b, AM), wobei die SDS-PAGE nur für die Fraktionen des Elutionsgipfels III der AEC eine saubere Elution eines Monodomänen-Fragments mit einer molekularen Masse von ~ 50 kDa anzeigte. Die einzelne FU war auch noch im Gipfel IV zu erkennen, allerdings nahm hier der Grad der Verunreinigung mit größeren Fragmenten zu. In den Gipfeln I und II waren im Gel keine Proteinbanden sichtbar, so dass man hier von einem Artefakt des Photometers oder Verunreinigungen ausgehen kann, die zu Beginn von der Säule eluierten. Innerhalb der Fraktionen des größten Elutionsgipfels V waren nahezu alle Proteinfragmente vorzufinden, so dass es hier zu keiner sauberen Abtrennung von einzelnen Fragmenten oder FUs kam. Zur immunologischen Charakterisierung des Monodomänen-Fragments des Elutionsgipfels III, wurde mit ausgewählten Fraktionen eine *Crossed-line* IE durchgeführt (Abb. C20).

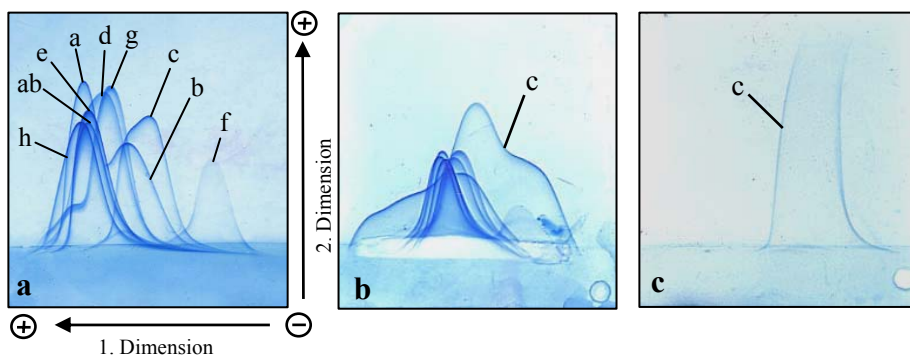


Abb. C20: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C19) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH1-UE (Kontrolle). b) *Crossed-line* IE der Fraktionen 35 – 37 der AEC. c) *Crossed* IE der Fraktionen 35 - 37 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Der Vergleich mit der Elastasespaltung der KLH1-UE (Abb. C20 a) konnte in der *Crossed-line* IE eine eindeutige Verwandtschaft des *Line*-Proteins mit der FU KLH1-c aufzeigen (Abb. C20 b). Die bereits in der SDS-PAGE sichtbare Reinheit dieser Gipfelfraktionen ergab sich auch in der *Crossed* IE, da hier keine weiteren Kontaminationen mit anderen KLH-Fragmenten nachgewiesen werden konnten (Abb. C20 c). Die Ausbeute des reinen Monodomänen-Fragments KLH1-c in den Fraktionen 35 – 37 der AEC belief sich auf 250 µg (4 %).

6.2 Spaltung der KLH1-Untereinheiten mit V8-Protease

Nach Söhngen *et al.* (1997) und Gebauer & Harris (1999) resultiert die fünfstündige Inkubation der KLH1-UE mit insgesamt 2 % (w/w) V8-Protease u.a. in einer Spaltung in Mono-, Tri-, Tetra- und Pentamerdomänen-Fragmente, die sich mittels AEC abtrennen lassen. Mittels *Crossed-line* IE konnten diese Fragmenten eindeutig als KLH1-abc sowie -defgh nachgewiesen werden, wobei letztere zusätzlich in eine Mixtur kleinerer Bruchstücke wie KLH1-defg, -def und die einzelnen FUs KLH1-g und -h zerlegt werden. Die Menge der einzelnen FUs KLH1-g und -h lässt sich durch höhere Enzymkonzentrationen (jede Stunden 2 % (w/w) = 10 % V8-Protease) steigern, wobei das Fragment KLH1-defgh unter diesen Bedingungen nach fünf Stunden Proteolyse nicht mehr mittels SDS-PAGE nachweisbar ist. Nach zahlreichen Vorversuchen mit verschiedenen Elutionsgradienten und Säulenmatrizes, zur Erzielung möglichst hoher Ausbeuten an reiner FU KLH1-h (Kap. C8), wurden 100 mg der KLH1-UE mit insgesamt 4 % (w/w) V8-Protease für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Hierbei erfolgte anfänglich eine Zugabe von 2 % des Enzyms, gefolgt von weiteren 2 % nach einer Stunde Inkubationszeit. Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte mittels einer großen AEC-Säule (Q-Sepharose, 210 ml Bettvolumen) und einem linearen Elutionsgradienten von 0,16 – 0,4 M NaCl (Abb. C 21 a). Ausgewählte Fraktionen der vier Elutionsgipfel wurden mittels einer 10 %-igen SDS-PAGE näher charakterisiert (Abb. C21 b, c).

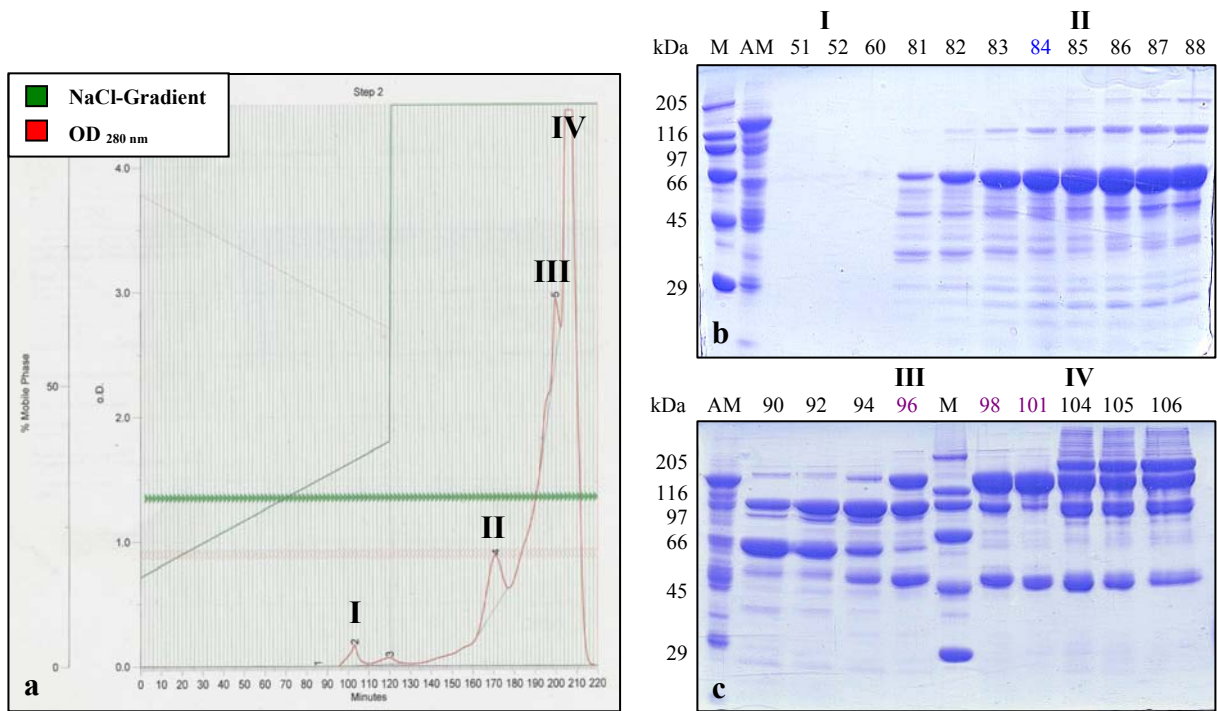


Abb. C21: Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH1-UE über AEC.

a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,16 - 0,4 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. *Grün*: NaCl-Gradient; *Rot*: OD_{280nm}. b - c) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der vier Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C22). Violett gekennzeichnete Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung auf eine SEC-Säule aufgetragen (Abb. C23) *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der AEC (mit V8-Protease gesplante KLH1-UE); *I - IV*: Elutionsgipfel.

Die Inkubation der KLH1-UE mit insgesamt 4 % (w/w) V8-Protease für vier Stunden, resultierte in zahlreichen Spaltprodukten mit molekularen Massen zwischen 45 – 150 kDa (Abb. C21 b, AM). Im ersten kleinen Elutionsgipfel waren keine Proteine in der SDS-PAGE zu erkennen, so dass es sich um ein Artefakt des Photometers oder Verunreinigungen handelte, die als erstes von der Säule eluierten. Im zweiten Elutionsgipfel eluierte ein Proteinfragment mit ~ 60 kDa, was bereits auf die FU-h schließen ließ, da diese als einzige der acht FUs eine solch hohe molekulare Masse besitzt. Im Elutionsgipfel III und IV eluierten schließlich zusätzlich zu Monodomänen-Fragmenten die größeren Spaltstücke wie Di- und Tridomänen-Fragmente (Abb. C21 c). Um die einzelne FU des Gipfels II eindeutig der FU-h zuzuordnen, wurde Fraktion 84 exemplarisch mittels *Crossed-line* IE immunologisch charakterisiert (Abb. C22).

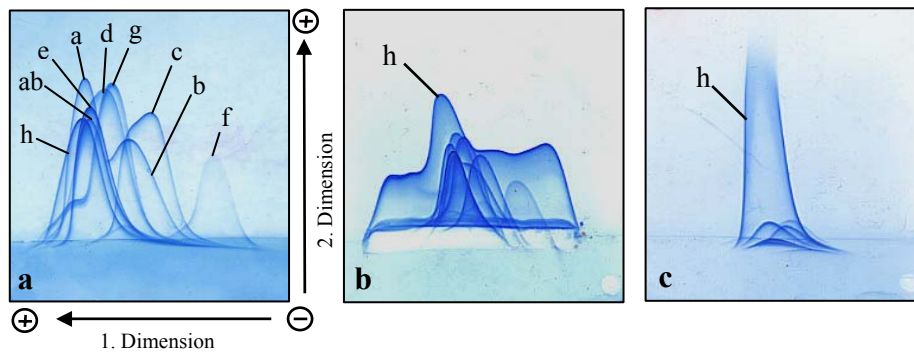


Abb. C22: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C21) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH1-UE (Kontrolle). b) *Crossed-line* IE der Fraktion 84 der AEC. c) *Crossed* IE der Fraktion 84 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Wie aufgrund der molekularen Masse von ~ 60 kDa zu erwarten war, konnte das Monodomänen-Fragment im Elutionsgipfel II der AEC (Abb. C21 b) mittels *Crossed-line* IE eindeutig der FU KLH1-h zugeordnet werden (Abb. C22 b), da nur diese FU der Elastasespaltung der KLH1-UE mit dem *Line*-Protein fusionierte (Abb. C22 a) Insgesamt war die Ausbeute an dieser FU nach Zugabe von 4 % (w/w) V8-Protease sowie einer nur vierstündigen Spaltung mit 8,8 mg (65 %) ausreichend hoch, so dass auf höhere Enzymkonzentrationen verzichtet werden konnte. Vielmehr resultierte die gewählte Menge an V8-Protease bereits in einer fortgeschrittenen Proteolyse, welche sich in der SDS-PAGE bei den entsprechenden Fraktionen des zweiten Elutionsgipfels anhand vieler kleiner proteolytischer Abbauprodukte (Abb. C21 b) zeigte. Entsprechend waren diese Bruchstücke auch in der *Crossed* IE sichtbar (Abb. C22 b).

Zur Abtrennung der übrigen einzelnen FUs von den größeren Di- und Tridomänen-Fragmente des Elutionsgipfels III der AEC wurden die Fraktionen 96 – 101 vereinigt (22 mg), aufkonzentriert und auf eine SEC-Säule (Biogel[®] P-100) aufgetragen. Das Elutionsprofil zeigte zwei scharf getrennte Elutionsgipfel (Abb. C23 a), von denen jeweils ausgewählte Fraktionen zur Analyse von Fragmentgröße und Reinheitsgrad auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetragen wurden (Abb. C23 b, c).

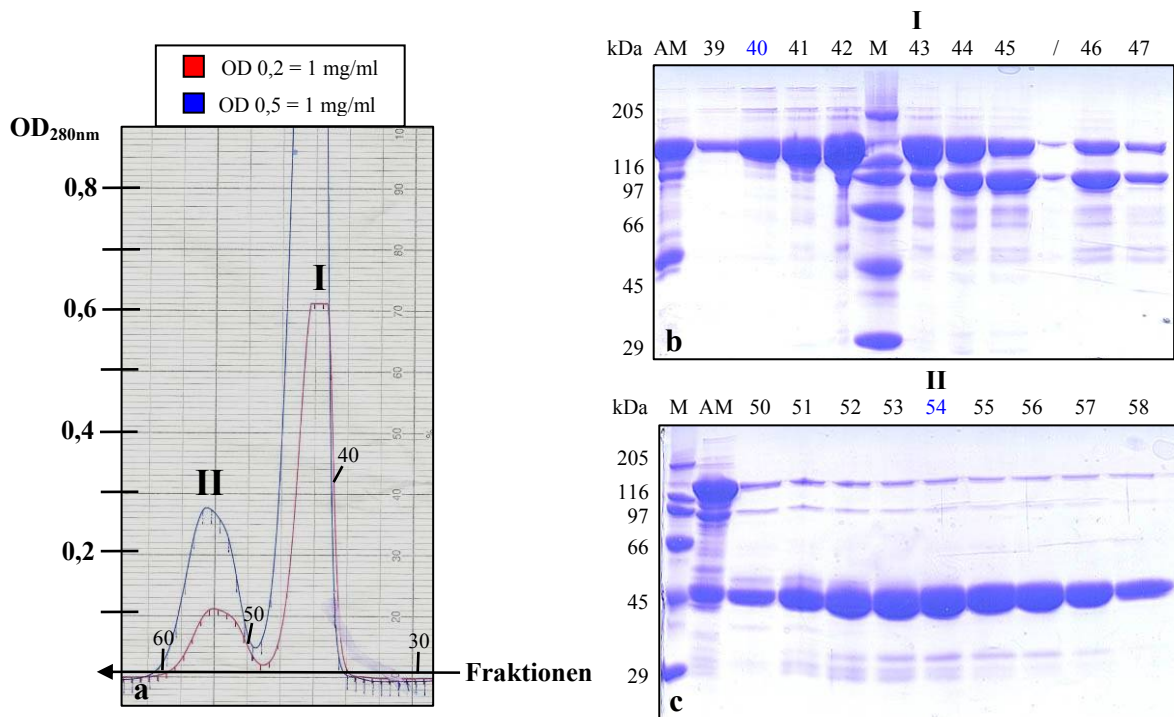


Abb. C23: Auftrennung der Fragmente des Gipfels III der AEC (Abb. C21) mittels SEC (Biogel® P-100).
 a) Das Elutionsprofil der SEC zeigte zwei Elutionsgipfel, was auf eine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Proteine schließen ließ. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Die Elution erfolgte mittels Glycin-Puffer pH 9,6. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 1,0 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der zwei Elutionsgipfel der SEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C24). *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der SEC (Fraktionen 96 – 101 der AEC); *I* – *II*: Elutionsgipfel.

Mit Hilfe der SEC konnte eine sehr gute Abtrennung der Di- und Tridomänen-Fragmente von einzelnen FUs mit ~ 45 kDa erzielt werden. Letztere eluierten hierbei sehr rein im Elutionsgipfel II (Abb. C23 c), während die größeren Fragmente nur in den ersten Fraktionen des Gipfels I sauber von der Säule kamen. Ab Fraktion 43 zeigte sich im Gel eine zunehmende Verunreinigung mit Didomänen-Fragmenten (Abb. C23 b). Um den immunologischen Nachweis zu erbringen, welche Fragmente mittels der SEC abgetrennt werden konnten, wurden ausgewählte Fraktionen einer *Crossed-* sowie *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C24).

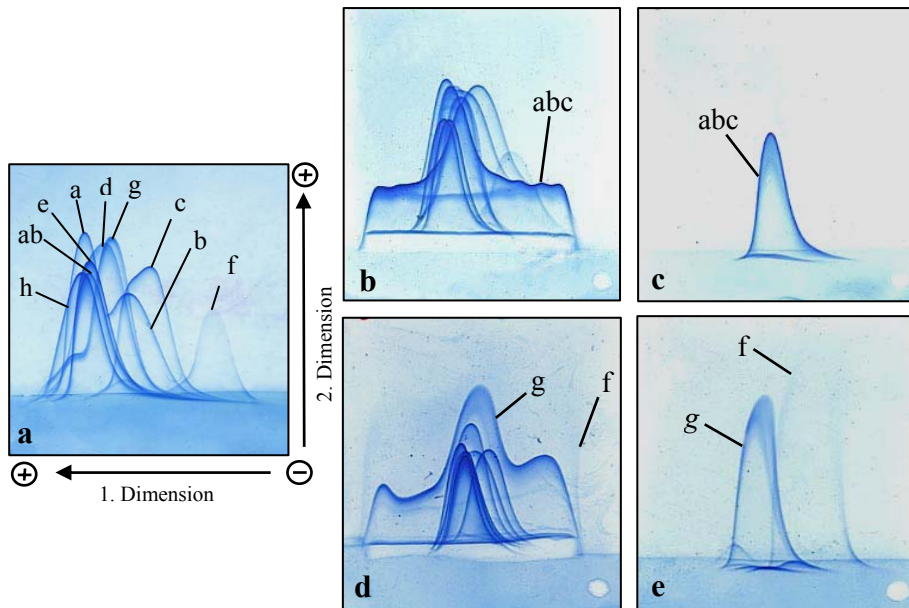


Abb. C24: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C23) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH1-UE (Kontrolle). b - c) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktion 40 der SEC. d - e) *Crossed*- und *Crossed-line* IE der Fraktion 54 der SEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Bei den durch die SEC abgetrennten Tridomänen-Fragmenten der ersten Fraktionen des Elutionsgipfels I handelte es sich um das Fragment KLH1-abc (Abb. C24 b). Dies steht bezüglich der V8-Spaltprodukte somit im Einklang mit den Literaturangaben (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer & Harris, 1999). KLH1-abc ließ sich durch die zusätzliche Gelfiltration nach der AEC sehr rein isolieren, und in der *Crossed* IE zeigte sich keine Kontamination mit anderen Fragmenten (Abb. C24 c). Neben der bereits erwähnten FU-h (Abb. C21 – 22), resultierte die V8-Spaltung auch in einer Abspaltung größerer Mengen der FUs KLH1-f sowie KLH1-g, die sich mittels *Crossed-line* IE eindeutig identifizieren ließen (Abb. C24 d). Auch wenn eine Abtrennung dieser Monodomänen-Fragmente vom Fragment KLH1-abc mittels SEC sehr effizient war (Abb. C24 e), kamen beide FUs mit gleicher molekularer Masse von ~ 45 kDa zusammen in den Fraktionen des Elutionsgipfels II der SEC vor. Eine Isolierung von KLH1-g und -g war anhand der hier beschriebenen Methoden mittels Ladungstrennung (AEC) sowie Größenfraktionierung (SEC) nicht möglich. Eine Abtrennung mittels präparativem (nativem) Schneidegel wurde nicht in Betracht gezogen, da die Verluste der Proteine zu groß gewesen wären, um weitere Analysen mit den Proben durchführen zu können. Die Ausbeute der FUs KLH1-f und -g in den Fraktionen 50 – 58 der SEC (Abb. C23) belief sich jeweils auf 3 mg (12 %). Vom Tridomänen-Fragment KLH1-abc in den Fraktion 39 – 42 konnten 3,1 mg (25 %) in reiner Form isoliert werden.

7 Übersicht der KLH1-Spaltungen und der Aufreinigungen der Spaltprodukte

Die durchgeführten Spaltungen sowie die Aufreinigung der verschiedenen Spaltprodukte der KLH1-UE sind schematisch in Abb. C25 zusammengefasst. Die jeweiligen Ausbeuten der reinsten Fragmente und FUs wurden gemäß den Angaben in Kap. C5 berechnet. Anhand der isolierten Mono- und Mehrdomänen-Fragmente erfolgten die enzymkinetischen (Kap. C13) und thermodynamischen (Kap. C14) Studien. Zudem wurden ~ 20 mg der in mehreren Durchläufen aufgereinigten FU KLH1-h (Kap. C8) zur Bestimmung von Kristallisationsbedingungen an das *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* gesendet (Kap. C9).

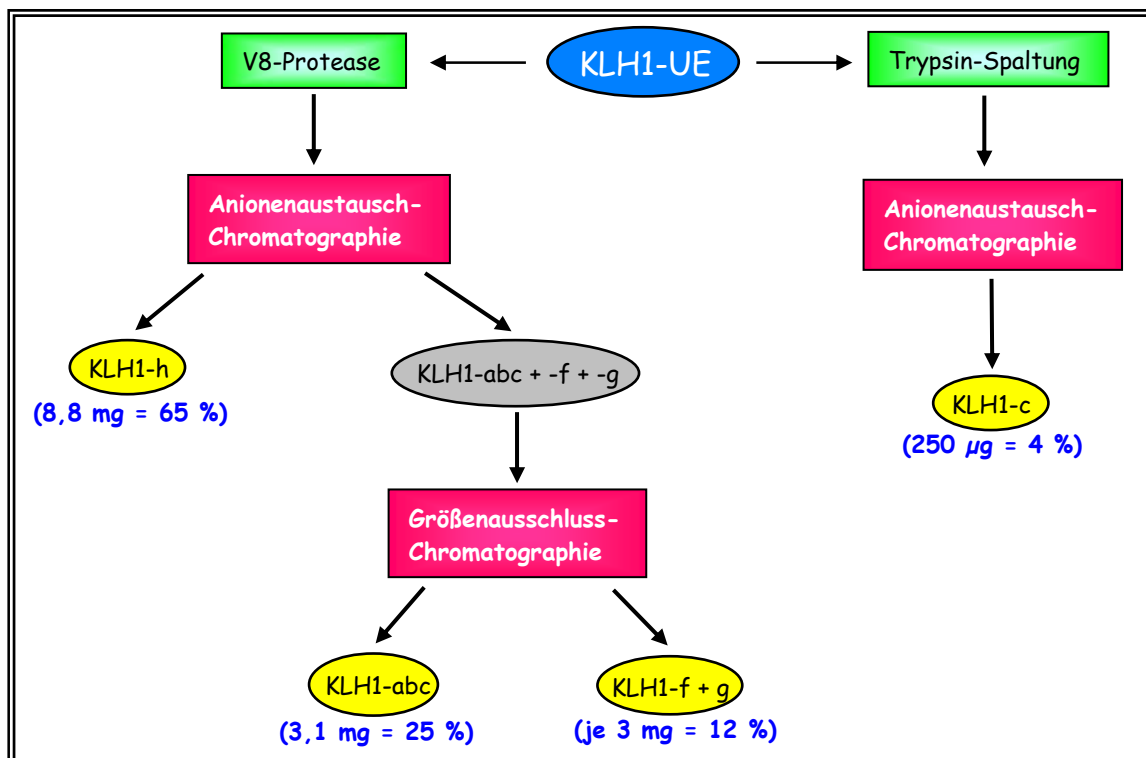


Abb. C25: Übersicht der Proteasespaltungen der KLH1-UE sowie der Aufreinigungen der Spaltprodukte. Die nach proteolytischen Spaltungen (grüne Kästen) der KLH1-UE (blaues Oval) in reiner Form isolierten FUs sind gelb markiert. Grau unterlegte Spaltprodukte waren noch stark mit anderen Proteinfragmenten verunreinigt und bedurften einer weiteren Aufreinigung über SEC (rote Kästen). Die jeweiligen Proteinausbeuten sind in Klammern unter den entsprechenden reinen Spaltprodukten in mg bzw. µg und Prozent angegeben.

Im Gegensatz zu den Aufreinigungen der Spaltprodukte der KLH2-UE (Kap. C2.4) konnten, trotz ähnlicher Strategien, nur wenige Mono- und Mehrdomänenfragmente der KLH1-UE in reiner Form isoliert werden. Auch der Einsatz anderer Proteasen als Trypsin oder V8, führte nach Abtrennung über AEC und/oder SEC zu keiner Elution zusätzlicher reiner Fragmente (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz konnten im Laufe dieser Arbeit Strategien entwickelt werden, die in einer sehr hohen und reinen Ausbeute von bis zu 9 mg (65 %) der FU KLH1-h je Aufreinigungsschritt resultierten (Kap. C8). Durch mehrmalige Wiederholungen der Aufreinigungsprozedur, konnten anhand von ~ 20 mg der so isolierten FU-h die nachfolgenden Kristallisationsbesingungen getestet werden (Kap. C9).

Zusätzlich konnte das Fragment KLH1-abc sowie die FU KLH1-c in sehr reiner Form aufgereinigt werden, wobei letztere allerdings nach dem AEC-Lauf nur in einer Menge von 250 µg vorlag. Auch hier wurde, wie bereits bei Fragment KLH2-abc (Kap. C5), auf eine Sekundärsplaltung des Fragments KLH1-abc mit Trypsin zur Gewinnung der FU-c verzichtet, da die Verluste nach einem erneuten AEC-Lauf zu groß gewesen wären.

8 Strategien zur Isolierung großer und reiner Mengen der FU KLH1-h

Das Hauptprojekt dieser Arbeit bestand in der Ermittlung der Röntgenstruktur der kragenbildenden FU-h des KLH1. Da sich diese FU durch Spaltung der isolierten KLH1-Untereinheiten mit V8-Protease wesentlich leichter mittels AEC isolieren ließ als die FU-h des KLH2, wurden verschiedene Strategien entwickelt, um möglichst hohe Ausbeuten an reinem Protein zu gewinnen. Da der Reinheitsgrad entscheidend für eine erfolgreiche Kristallisation ist, wurden verschiedene Anionenaustauschermatrizes, Elutionsgradienten, sowie unterschiedliche Mengen und Inkubationsdauern an V8-Protease ausgetestet. Um möglichst große Mengen an reiner FU KLH1-h zu gewinnen, wurde zudem auf AEC-Säulen mit hohem Säulenbettvolumen (210 ml) zurückgegriffen, auf der über 100 mg der Spaltprodukte aufgetragen werden konnten. Die verschiedenen Bedingungen, die in einer bis dahin bestmöglichen, reinen Elution der FU-h resultierten, sind mit den entsprechenden Ausbeuten in Tabelle C1 zusammengefasst. Die Prozentangaben zur jeweiligen Ausbeute einer FU beziehen sich hierbei jeweils auf die Ausgangsmenge an gespaltenen KLH1-UE, die auf die AEC-Säule aufgetragen wurden. Teilt man diese durch die Anzahl der FUs je Untereinheit (= acht beim KLH), erhält man die Menge in mg, die einer 100 %-igen Ausbeute einer FU entspräche (z.B. 50 mg/8 FUs = 6,25 mg einer FU = 100 %).

Nr.	AEC-Matrix	Bettvolumen	Auftragsmenge	NaCl-Gradient	Enzymmenge (w/w)	Spaltdauer (37 °C)	Ausbeute KLH1-h
a)	Q-Seph.	53 ml	20 mg	0,16 – 0,5 M	1x 2 %	4 Std.	~ 20 %
b)	Q-Seph.	53 ml	50 mg	0,16 – 0,4 M	1x 2 %	5 Std.	~ 50 %
c)	Q-Seph.	53 ml	50 mg	0,16 – 0,4 M	2x 2 %	4 Std.	~ 50 %
d)	Q-Seph.	210 ml	100 mg	0,16 – 0,4 M	2x 2 %	4 Std.	~ 65 %
e)	DEAE-Seph.	210 ml	100 mg	0,16 – 0,5 M	2x 2 %	4 Std.	~ 40 %
f)	DEAE-Seph.	210 ml	100 mg	0,16 – 0,4 M	2x 2 %	4 Std.	~ 65 %

Tab. C1: Strategien zur Isolierung möglichst großer und reiner Mengen der FU KLH1-h.

Die höchsten Ausbeuten ergaben sich bei der Nutzung von AEC-Säulen mit höherem Bettvolumen bei linearen Elutionsgradienten von 0,16 – 0,4 M NaCl und Spaltungen mit insgesamt 4 % (w/w) V8-Protease (d und f, blau dargestellt). Bezüglich der Reinheit ergaben sich bei der Verwendung großer Säulen geringe Vorteile für den schwächeren Anionenaustauscher DEAE-Sepharose. Den besten Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute stellte die Nutzung kleiner Q-Sepharose-Säulen dar (b und c).

Durch lineare Gradienten von 0,16 - 0,5 M NaCl kam es, bei Nutzung von kleinen Q-Sepharose-Säulen (53 ml Bettvolumen), zu einer Co-Elution der FU-h mit weiteren Spaltprodukten (Abb. C26 a), die u.a. als FU-ab und –e identifiziert werden konnten (Daten nicht

gezeigt). Eine Abflachung des Elutionsgradienten auf 0,16 - 0,4 M NaCl in der gleichen Laufzeit, resultierte schließlich in einer höheren und vor allem reineren Ausbeute der FU KLH1-h, sowohl bei Verwendung kleiner, als auch großer Säulen (Tab. C1 und Abb. C26 b - d, f). Letztere (210 ml Bettvolumen) lieferten unter diesen Bedingungen einen zusätzlichen Gewinn an der FU-h von bis zu 15 % (Tab. C1 d). Im Vergleich zur Q-Sepharose resultierte die Verwendung des schwächeren Anionenaustauschers DEAE-Sepharose, in einer reineren Abtrennung der FU-h von größeren Spaltprodukten (Abb. C26 e, f). Die Verunreinigung mit zahlreichen kleineren Bruchstücken (~ 30 – 50 kDa) blieb jedoch unverändert. Ein Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute konnte durch den Einsatz der kleineren Q-Sepharose-Säule, in Verbindung mit einer Reduzierung der eingesetzten Menge an V8-Protease auf insgesamt 2 % (w/w), bei gleichzeitiger Verlängerung der Spaltdauer auf fünf Stunden erzielt werden. Hierbei nahm die Ausbeute im Vergleich zur größeren Säule zwar um 10 % ab, dafür konnte durch den geringeren proteolytischen Abbau eine höhere Reinheit der entsprechenden Fraktionen mit der FU-h erzielt werden (Tab. C1 und Abb. C26 b). Eine weitere Reduzierung der Enzymmenge auf 1% (w/w) V8-Protease lieferte auch bei noch längeren Inkubationszeiten, ebenso wie bei der Verwendung von Stufengradienten, nur sehr verunreinigte FU-h-Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

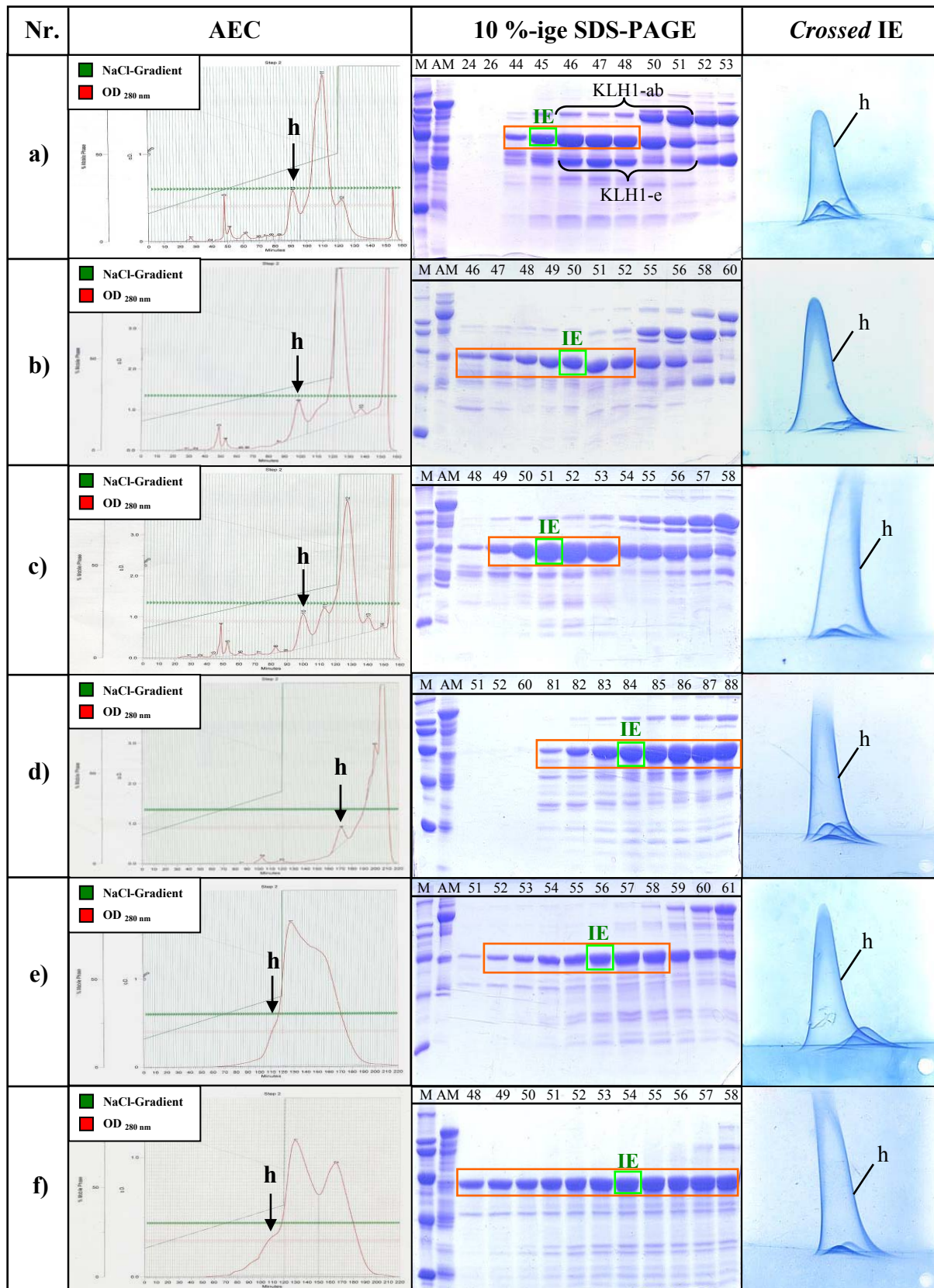


Abb. C26: Strategien zur Isolierung möglichst großer und reiner Mengen der FU KLH1-h (s. Tab. C1).
a - f) AEC-Läufe, SDS-Gele und *Crossed* IE der in Tab. C1 dargestellten Aufreinigungsstrategien. Die höchsten Ausbeuten ergaben sich bei der Nutzung von AEC-Säulen mit großem Bettvolumen und flachen Elutionsgradienten (d, f). Den besten Kompromiss zwischen Ausbeute und Reinheitsgrad stellte die Verwendung kleiner Q-Sepharose-Säulen und flachen Gradienten dar (b, c). Klammern im SDS-Gel der Abb. a) deuten auf Verunreinigungen der FU-h-Fractionen mit den FUs KLH1-ab und -e. Orangefarbene Kästen markieren die jeweils reinsten Fraktionen der FU-h. Grüne Kästen zeigen Fraktionen, die mittels *Crossed* IE näher charakterisiert wurden (rechte Spalte). *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der AEC (mit V8-Protease gespaltene KLH1-UE); *IE*: Immunelektrophorese.

Nachdem verschiedene Strategien ausgetestet wurden, um mit möglichst geringem Aufwand möglichst hohe Ausbeuten an reiner FU KLH1-h zu erzielen, wurden die reinsten Fraktionen der verschiedenen Aufreinigungen vereinigt, gegen 10 mM Tris pH 8,0 dialysiert und auf 20 mg/ml aufkonzentriert. Bevor insgesamt 20 mg dieser Probe zur Ermittlung von Kristallisationsbedingungen ans *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* geschickt wurden, erfolgte eine abschließende Überprüfung der Probe mittels 10%-iger SDS-PAGE sowie *Crossed-* und *Crossed-line* IE (Abb. C27).

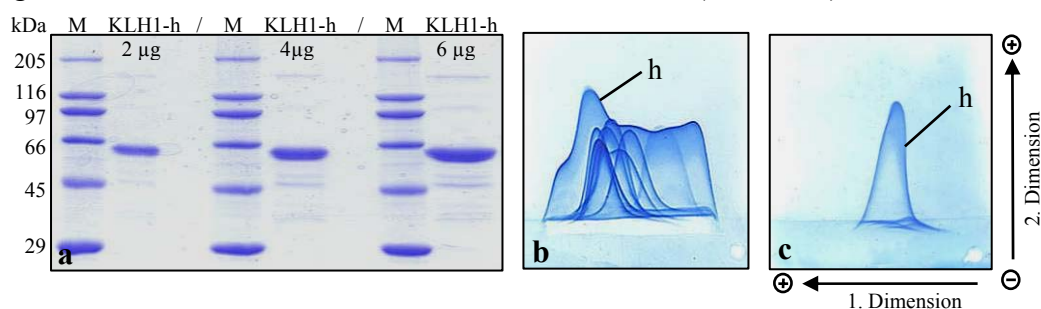


Abb. C27: Reinheitsprüfung der zur Kristallisation bestimmten vereinigten Fraktionen der FU KLH1-h.
 a) 10%-ige SDS-PAGE der vereinigten, reinsten KLH1-h-Fraktionen der verschiedenen Aufreinigungen (Abb. C26). Auftragsmenge von links nach rechts: 2, 4, 6 µg. b - c) *Crossed-line* und *Crossed* IE der Probe. Die vereinigten Fraktionen der FU KLH1-h zeigten nur minimale Verunreinigungen und wurden zur Kristallisation ans *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* geschickt. M: Proteinmarker.

Sowohl mittels SDS-PAGE als auch *Crossed*-IE konnte eine hohe Reinheit der zur Kristallisation bestimmten Probe der FU-h nachgewiesen werden (Abb. C27 a, c). Im SDS-Gel waren nur minimale Verunreinigungen mit anderen Proteinfragmenten in Form von schwachen Proteinbanden sichtbar. Die Bruchstücke waren hierbei größtenteils < 60 kDa. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der *Crossed* IE, wo das Hauptprotein durch die Anti-KLH-Antikörper in Form eines prägnanten Präzipitationsgipfels neben kaum sichtbaren und sehr kleinen Gipfeln präzipitiert wurde (Abb. C27 c). Mittels *Crossed-line* IE wurde die Hauptbande des Gels sowie des Präzipitationsgipfels der *Crossed* IE eindeutig als KLH1-h identifiziert (Abb. C27 b). Somit war die Probe in einem einwandfreien Zustand und konnte zur Bestimmung von Kristallisationsbedingungen herangezogen werden (Kap. C9).

9 Kristallisation der FU KLH1-h

Während des Kristallisations-Screenings des *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* wurden im *Microbatch*-Verfahren unter Öl etwa 1600 verschiedene Kristallisationsbedingungen der FU KLH1-h getestet und direkt nach Ansatz sowie nach jeder Woche Fotos der Ansätze gemacht. Insgesamt war die Dauer der Versuche auf vier Wochen beschränkt. Die Auswertung erfolgte jede Woche manuell am PC, anhand einfacher Durchsicht aller Fotos der jeweiligen Bedingungen. Nach zwei Wochen konnte die Bildung hexagonaler, farbloser Kristalle unter folgenden Kristallisationsbedingungen beobachtet werden (Abb. C28):

0,1 M K₂HPO₄, 0,1 M Natrium-Citrat (pH 4,0), 20 % (w/v) PEG 1000

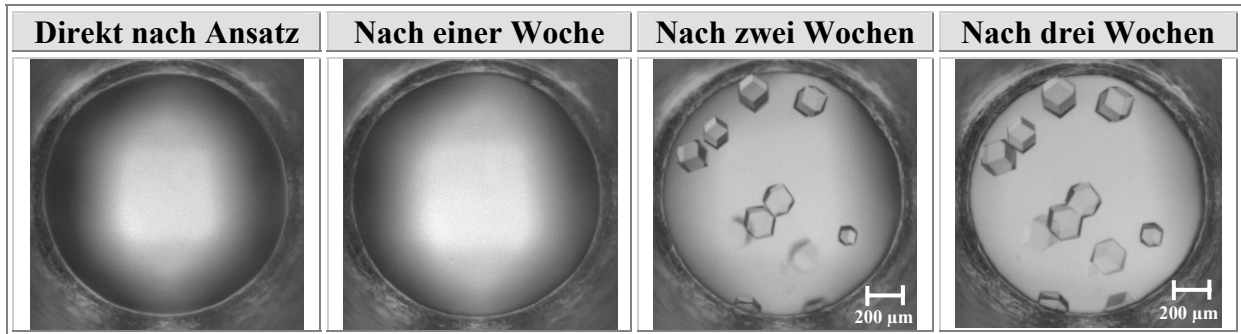


Abb. C28: Kristallisation der aufgereinigten FU KLH1-h (Abb. C27) am Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA).

Im *Microbatch*-Verfahren unter Öl bildeten sich in 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M Natrium-Citrat (pH 4,0), 20 % (w/v) PEG 1000 nach zwei Wochen hexagonale, farblose Kristalle. Nach drei Wochen betrug der Durchmesser der Kristalle ungefähr 200µm.

Die Größe der Kristalle nahm bis zur dritten Woche weiter zu und erreichte bei den größten Exemplaren Werte von ~ 200 µm. Die Farblosigkeit der Kristalle könnte das Resultat einer deoxygenierten FU-h sein, die als Folge der sauren Kristallisationsbedingungen bei pH 4,0 eintrat. Der endgültige Nachweis, ob es unter den genannten Bedingungen tatsächlich zu einer Kristallisation des Hämocyanins kam, bedurfte zunächst einer erneuten Aufreinigung von 20 mg der FU-h gemäß Kap. 2.7, um anschließend eine Kristallisation unter den nun bekannten Bedingungen am *Institut für molekulare Biophysik* (Mainz) zu wiederholen. Die Ansätze erfolgten hierbei jedoch nicht im *Microbatch-Assay under oil*, sondern im *Sitting drop*-Verfahren. Zu einer erfolgreichen Kristallisation kam es jedoch erst, nachdem die Konzentrationen der vom *HWI* ermittelten einzelnen Fällungsmittelkomponenten leicht variiert wurden (Abb. C29):

50 mM K_2HPO_4 , 50 mM Na-Citrat (pH 4,0), 8 % PEG 1000

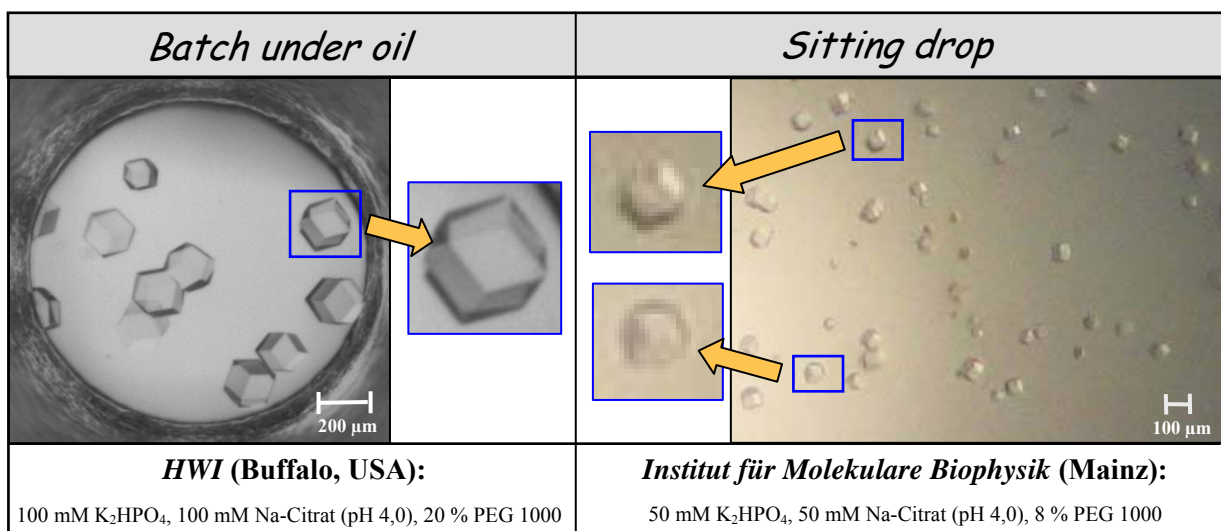


Abb. C29: Kristallisationen am HWI (Buffalo, USA) und am Institut für Molekulare Biophysik (Mainz).

Durch geringfügige Variation der einzelnen Fällungsmittelkonzentrationen konnte am *Institut für Molekulare Biophysik* nach drei Tagen eine Kristallisation erzielt werden. Die Kristalle (rechts) ähnelten hierbei sowohl in ihrer Form, als auch ihrer farblosen Erscheinung denen des *HWI* (links), allerdings waren sie zahlreicher und mit maximal 110 µm Durchmesser auch deutlich kleiner.

Im Gegensatz zu den Ansätzen des *HWI* mit zwei Wochen Wartezeit konnte am *Institut für Molekulare Biophysik* bereits nach drei Tagen eine Kristallisation beobachtet werden. Die Kristalle waren hierbei sowohl in ihrer hexameren bis würfelförmigen Form, als auch ihrer farblosen Erscheinung mit denen des *HWI* vergleichbar (Abb. C29). Der einzige Unterschied betraf die Zahl und Größe der Kristalle. Mit maximal $\sim 110 \mu\text{m}$ Durchmesser kam es zur Ausbildung deutlich kleinerer, aber auch zahlreicherer Kristalle. Die Ursachen hierfür könnten eventuell auch in der Wahl der unterschiedlichen Kristallisationsmethoden im *Sitting drop*- bzw. *Batch under oil*-Verfahren, in Verbindung mit einer geringfügig anderen Zusammensetzung der Fällungsmittellösung begründet liegen.

10 Aufnahme und Auswertung von Röntgenbeugungsdaten der Drehanode und des Synchrotrons

Nachdem die Kristallisation gemäß den Bedingungen des *HWI* reproduziert werden konnte (Abb. C29), musste als nächstes nachgewiesen werden, ob es sich tatsächlich um Proteinkristalle der FU KLH1-h handelte. Falls dies der Fall sein sollte, war die Bestimmung der maximal zu erzielenden Auflösung der Röntgenstruktur von entscheidender Bedeutung, wobei der nur geringe Durchmesser der nur $\sim 110 \mu\text{m}$ großen Kristalle ein limitierender Faktor diesbezüglich sein könnte. Die ersten Messungen wurden zunächst an einer *Rigaku 007HF-Drehanode* durchgeführt und ergaben nach Röntgenbestrahlung der Kristalle bei Raumtemperatur nur vereinzelte Braggreflexe. Nach dem Austesten einiger Cryobedingungen, zeigten sich mit 13 % (w/v) PEG und 30 % (w/v) Glycerin als Gefrierschutzmittel, schließlich proteintypische Braggreflexe. Die anhand der gemessenen Streudaten abgelesene maximale Auflösung betrug allerdings nur 8 \AA (Daten nicht gezeigt), was für eine detaillierte Röntgenstrukturanalyse zu gering war. Um die Position jedes einzelnen Atoms in einem Protein zu bestimmen, muss eine Auflösung von mindestens $1,5 \text{ \AA}$ erzielt werden. Dies gelingt jedoch nur selten, und die meisten bestimmten Strukturen liegen in der Auflösung zwischen $1,5 - 3 \text{ \AA}$. Bis etwa 3 \AA können Aminosäurereste unterschieden und der Verlauf der Polypeptidkette (z. B. Windungen einer α -Helix) verfolgt werden. Bis etwa 6 \AA Auflösung kann man Helices als stabförmige Gebilde erkennen. Da eine für Salzkristalle wesentlich intensivere Streuung nicht beobachtet wurde, konnte mittels der Drehanode zumindest der Nachweis erbracht werden, dass es unter den Bedingungen des *HWI* zu einer Kristallisation der FU KLH1-h gekommen war. Da die Größe der Kristalle unter Umständen limitierend für die max. zu erreichende Auflösung sein kann, wurden mit den gleichen Kristallen am Synchrotron der *Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz)* weitere Röntgenbeugungsdaten aufgenommen, um die Auflösung so eventuell weiter erhöhen zu können (Abb. C30). Der Vorteil des Synchrotrons gegenüber einer Röntgenröhre besteht in einer bis zu einer millionenfach intensiveren Strahlung, die zudem stark gebündelt und stabiler ist. Dies ermöglicht daher auch die Röntgenstrukturanalyse von sehr kleinen Kristallen.

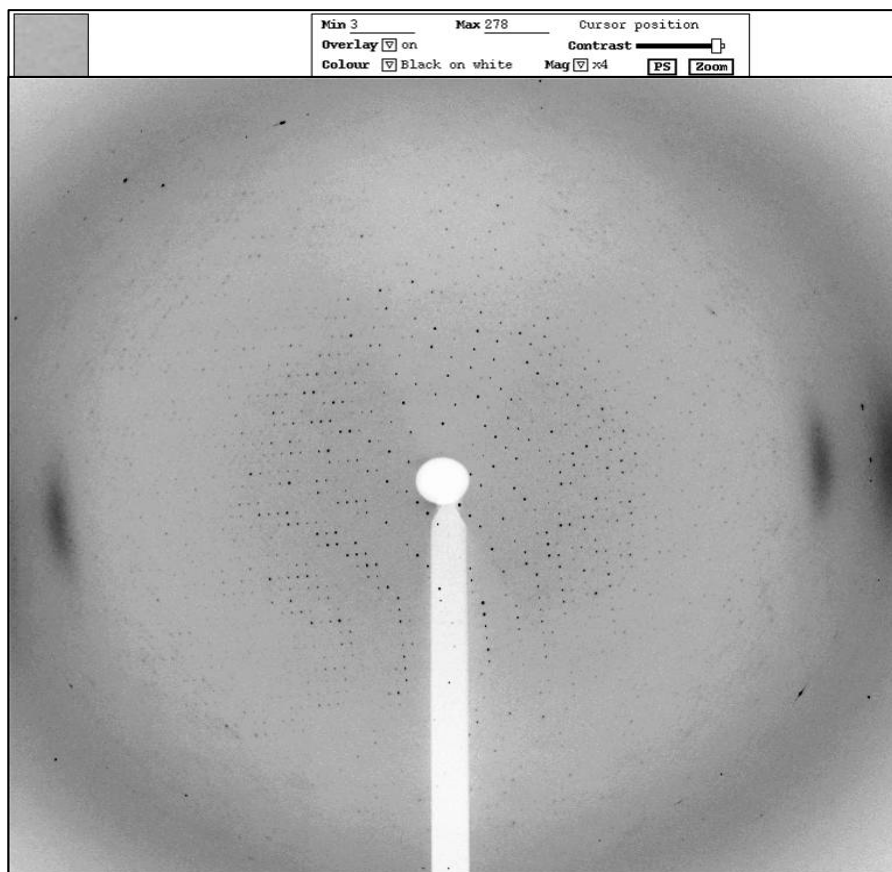


Abb. C30: Röntgenbeugungsbild der KLH1-h-Kristalle, aufgenommen am Synchrotron der *Swiss Light Source* (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz).

Nachdem an der Drehanode anhand der proteintypischen Braggreflexe zwar der eindeutige Nachweis der Kristallisation der FU KLH1-h erbracht werden konnte, die Daten aber nur eine Auflösung von 8 Å ergaben, lieferten die gleichen Kristalle am Synchrotron eine deutliche Verbesserung der Auflösung. Die maximal erreichte Auflösung lag hier bei 4 Å, so dass der detaillierte Verlauf der Helices nach Auswertung der Daten sehr gut zu erkennen sein sollte. Der helle Kreis in der Mitte entsteht durch den Schattenwurf des Primärstrahlfängers. Der dunkle Ring am äußeren Detektorrand entsteht durch Streuung an Luft, Puffer sowie durch „inkohärente Streuung“ am Kristall. Da die vom Detektor aufgenommenen Braggreflexe die Kristallstruktur im inversen Raum wiedergeben, ist die zu erwartende Auflösung der Röntgenstruktur umso höher, je weiter außen die Reflexe am Detektor liegen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. [REDACTED] (AG Prof. [REDACTED], MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg) durchgeführt.

Durch Nutzung des Synchrotrons konnte mit den gleichen Kristallen eine erhebliche Verbesserung der Auflösung erzielt werden. So lieferte der Kristall 99,8 % komplette Daten bis zu einer Auflösung von 4 Å im Gegensatz zu den 8 Å der Drehanode. Somit sollte sich nun, nach Auswertung der Daten, der detaillierte Verlauf der Helices der FU KLH1-h darstellen lassen. Für die Kristalle ergab sich eine **Raumgruppe** von $I2(1)3$ mit **innen-zentriertem Kristallgitter**. Die $2(1)3$ deuteten auf eine kubische Rotationssymmetrie, wobei es sich bei der 2-Achse um eine $2(1)$ Schraubachse handelte. Aufgrund der kubischen Symmetrie waren die Längen der Kristallachsen alle gleich lang, mit einer Größe der **Einheitszelle** von $a = b = c = 251$ Å und den Winkeln $\alpha, \beta, \gamma = 90$ Grad. Die Strukturbestimmung erfolgte durch *Molecular Replacement* mit der bereits verfügbaren Röntgenstruktur der FU OdH-g (Cuff *et al.*, 1998), die eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie (~ 30 %) mit der kragenbildenden FU KLH1-h zeigt (Abb. C31).

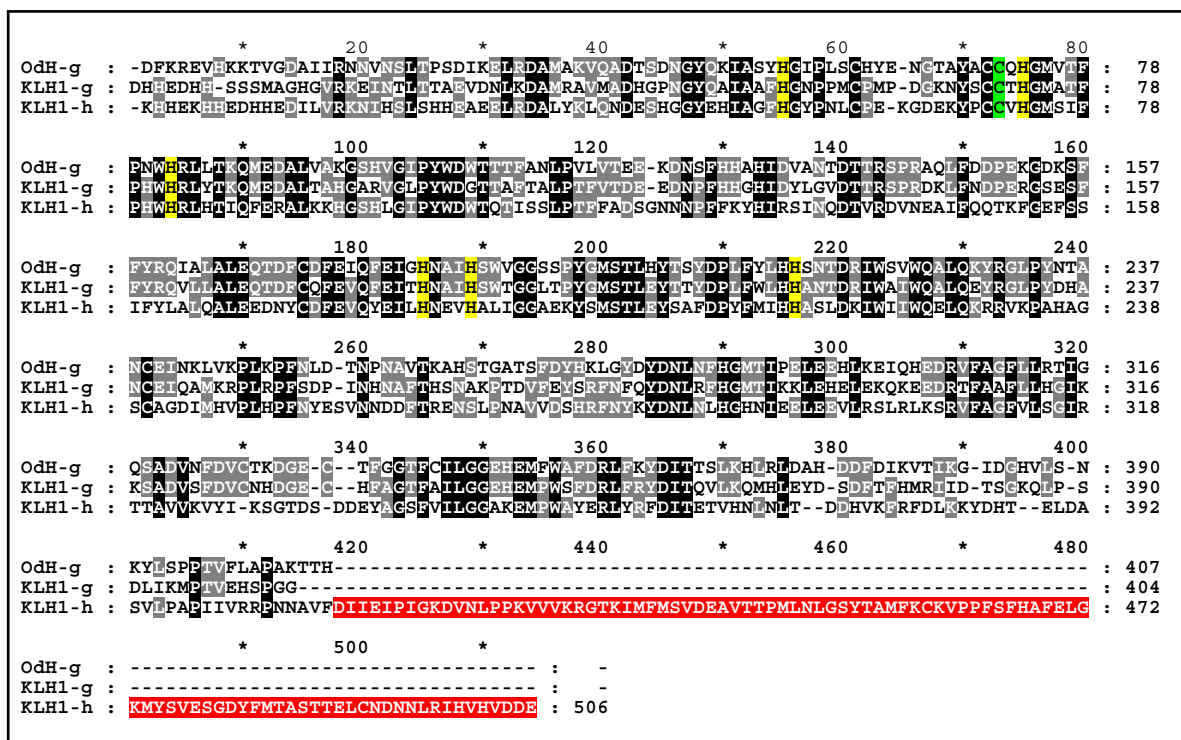


Abb. C31: Sequenzalignment der FUs KLH1-g und -h sowie der FU-g von *Octopus dofleini* (OdH-g). Aufgrund der hohen Sequenz- und Strukturhomologien kann die verfügbare Röntgenstruktur der OdH-g (Cuff *et al.*, 1998) zur Strukturaufklärung der KLH1-h mittels *Molecular Replacement* herangezogen werden. Allerdings besitzt die FU-h im Gegensatz zu allen anderen FUs eine C-terminale Verlängerung von knapp 100 Aminosäuren (rot). Generell zeigen gleiche FUs verschiedener Mollusken-Spezies eine höhere Sequenzidentität (KLH1-g vs. OdH-g = 55 %) als verschiedene FUs der gleichen Spezies (KLH1-g vs. KLH1-h = 30 %). *Schwarz*: 100 % identisch; *grau*: 80 % identisch; *rot*: verlängerter C-Terminus der FU-h; *gelb*: hoch konservierte und an der Kupferbindung des aktiven Zentrums beteiligte Histidine; *grün*: Cysteine der bei Mollusken vorkommenden Thioetherbrücke. Das Alignment erfolgte mit Hilfe des Programms *GENEDOC*.

Auch wenn die FU KLH1-h eine zusätzliche C-terminale Verlängerung von knapp 100 Aminosäuren besitzt, konnte mittels *Molecular Replacement* eine Struktur gefunden werden, die als **asymmetrische Einheit** ein Dimer zweier FUs zeigte (Abb. C32). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der mittels Cryo-EM-Aufnahmen erstellten 3D-Rekonstruktion, bei der fünf solcher FU-h-Dimere den Kragen eines Dekamers formen (Meissner *et al.*, 2000, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Durch weitere Modellierungen konnte der Verlauf der C_α-Kette inklusive der verlängerten C-terminalen Domäne in die Elektronendichtekarte der FU-h eingepasst werden (Abb. C32 f).

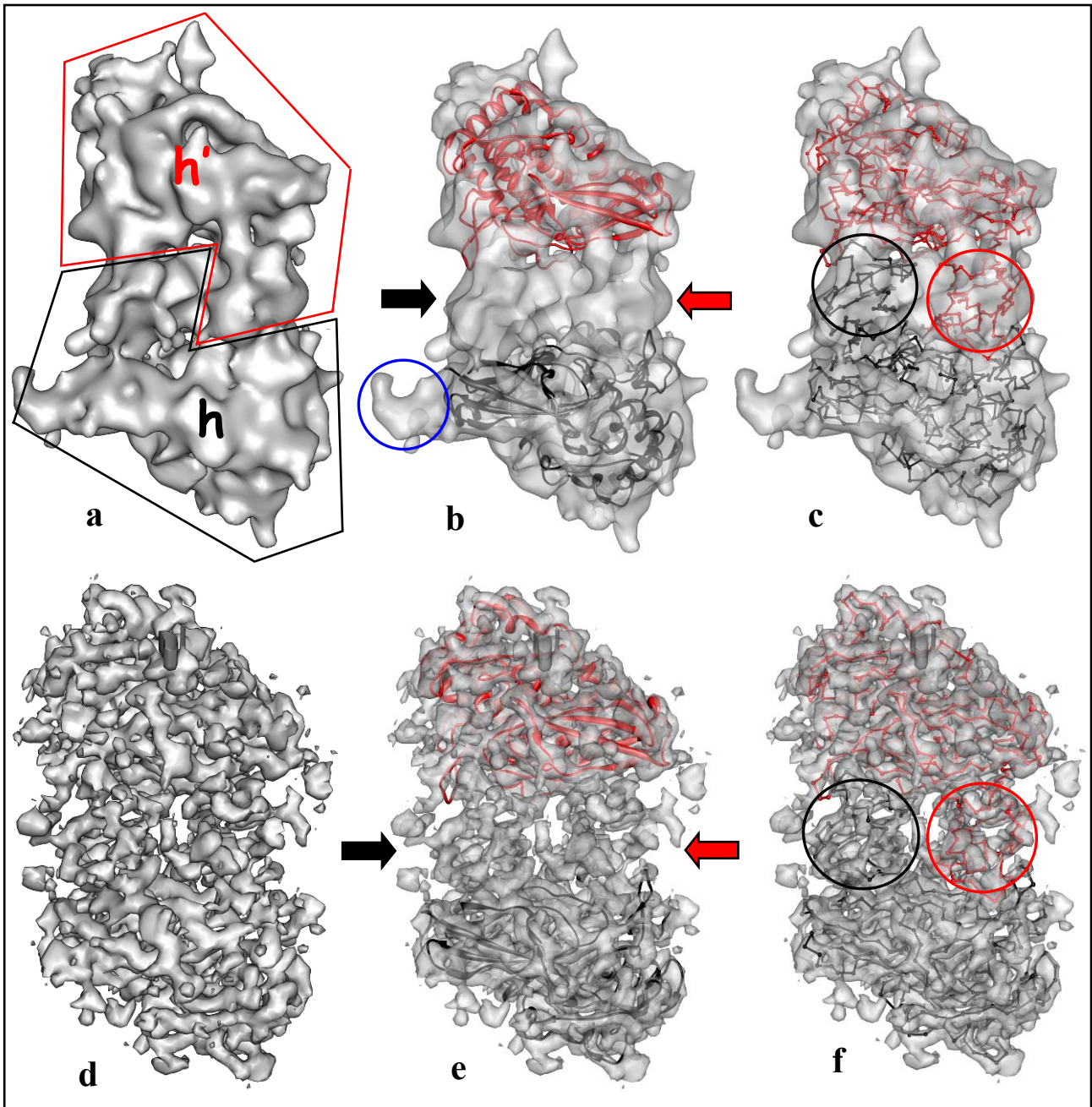


Abb. C32: 3D-Rekonstruktion (11 Å) und am Synchrotron ermittelte Röntgenstruktur (4 Å) eines kragenbildenden Dimers der FU KLH1-h.

a) 3D-Rekonstruktion des FU-h/h'-Dimers (11 Å). Fünf dieser Dimere bilden den Kragen eines KLH-Dekamers (s. Abb. A1). Jede einzelne FU ist rot/schwarz umrandet b) Fitting der bekannten Röntgenstruktur der OdH-g in die 3D-Rekonstruktion des Dimers. Bei der blau eingekreisten Struktur des 3D-Modells konnte kein Fitting mit Strukturen der OdH-g erzielt werden. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich jedoch mit der Aminosäureabfolge „NLT“ eine potenzielle N-glykosidische Zuckerbindungsstelle. c) Fitting der C_α-Kette der Röntgenstruktur des FU-h/h'-Dimers in das 3D-Modell. Die C-terminalen Typ I-Kupferdomänen sind schwarz/rot eingekreist. d) Vollständige, am Synchrotron ermittelte Kristallstruktur des FU-h-Dimers (4 Å). e) Fitting der bekannten Röntgenstruktur der OdH-g in die Röntgenstruktur des Dimers. f) Verlauf der C_α-Kette innerhalb der Kristallstruktur des Dimers mit den C-terminalen Typ I-Kupferdomänen (schwarz/rot eingekreist). Die schwarzen/roten Pfeile in b) und e) deuten auf „leere“ Bereiche innerhalb des 3D-Modells sowie der FU-h-Kristallstruktur, in die keine Sekundärstrukturelemente der OdH-g gefittet werden konnten. Die Strukturen jeder FU eines Dimers sind rot bzw. schwarz dargestellt. 3D-Rekonstruktionen und Fitting wurden von [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], Institut für Zoologie, Uni Mainz) basierend auf Cryo-TEM-Daten erstellt (unveröffentlichte Daten). Die Auswertung der Synchrotron-Daten zur Ermittlung der Kristallstruktur der FU-h erfolgte durch Dr. [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg). Röntgenstruktur der OdH-g nach Cuff *et al.*, 1998, PDB-ID-Code: 1js8.

Die Sekundärstrukturelemente der bereits verfügbaren Röntgenstruktur der OdH-g ließen sich sehr gut in die 3D-Rekonstruktion des FU-h-Dimers (Abb. C32 a, b) einfügen. Dies spricht somit für die korrekt berechnete 3D-Struktur des Modells auf Basis von Cryo-EM-Daten (angefertigt von [REDACTED], AG Prof. [REDACTED], *Institut für Zoologie, Uni Mainz*). Allerdings zeigten sich beim 3D-Modell des Dimers im Übergangsbereich beider FUs „leere“ Bereiche, in die C-terminal keine Strukturen der OdH-g gefittet werden konnten (Pfeile in Abb. C32 b). Ein ähnliches Bild ergab sich beim Fitting der OdH-g-Strukturelemente in die am Synchrotron ermittelte Kristallstruktur des FU-h-Dimers (Abb. C32 d, e). In Abb. C32 b ist noch eine zusätzliche Struktur gekennzeichnet (blauer Kreis), innerhalb der es keine Übereinstimmung zwischen OdH-g-Struktur und 3D-Modell gab. Mit Hilfe von Sequenz-, Röntgenstruktur- und Cryo-TEM-Daten konnte mittlerweile bestätigt werden, dass sich innerhalb dieses Bereichs der FU-h mit dem Sequenzmotiv „NLT“ ein N-glykosidischer Zucker befindet (unveröffentlichte Daten von [REDACTED]). Die Einpassung des Verlaufs der C_α-Ketten der FUs (rot bzw. schwarz) in das 3D-Modell bzw. die Röntgenstruktur des Dimers resultierte ebenfalls in einer sehr genauen Übereinstimmung von 3D-Rekonstruktion (11 Å) und Kristallstruktur (4 Å). Im Vergleich zum OdH-g-Fitting (Abb. C32b) lieferte die am Synchrotron ermittelte Struktur der KLH1-h jedoch auch Strukturelemente für die „leeren“ Bereiche der Übergangsbereiche beider FUs innerhalb des Dimers (Kreise in Abb. C32 c, f). Innerhalb dieser C-terminalen Areale befinden sich die jeweils zusätzlichen 100 Aminosäuren der kragenbildenden FUs-h, die bei allen anderen FUs fehlen (Abb. C31) und somit die strukturlosen Bereiche innerhalb des 3D-Modells nach Einpassung der OdH-g-Struktur erklären. Bei der Suche nach vergleichbaren Faltungsmotiven der C_α-Kette der C-terminalen Domäne der FU-h konnte eine Ähnlichkeit mit einer **Typ I-Kupferproteinfaltung**, wie sie z.B. in **Cupredoxinen** vorkommt, nachgewiesen werden. Daher wurde die FU-h anhand des Verlaufs der C_α-Kette der ermittelten Röntgenstruktur, der verfügbaren Sequenz und der Kristallstruktur der OdH-g modelliert. Die Bestimmung eines möglichen Faltungsmotivs der Peptidketten der Zusatzdomäne und der Orientierung der Aminosäuren durch Einfügen der entsprechenden Sequenz, ergab eine viersträngige β-Sandwichstruktur (Abb. C33) mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu Cupredoxinen von 25 %. Ob innerhalb des Typ I-Kupferzentrums der C-terminalen Domäne der FU-h ein zusätzliches Kupferatom gebunden ist, bleibt vorerst allerdings ebenso offen wie die Frage nach der Funktion desselbigen und bedarf einer höheren Auflösung der Röntgenstruktur der FU-h. Zudem ist das Ergebnis der Modellierung bezüglich exakter Anzahl, Lage und Ausdehnung der Sekundärstrukturelemente aufgrund einer großen Fehleranfälligkeit der Methode vorerst als hypothetisch anzusehen.

Die Messung und Auswertung der Röntgenbeugungsdaten erfolgte freundlicherweise von Dr. [REDACTED] (AG Prof. Dr. [REDACTED], *MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg*).

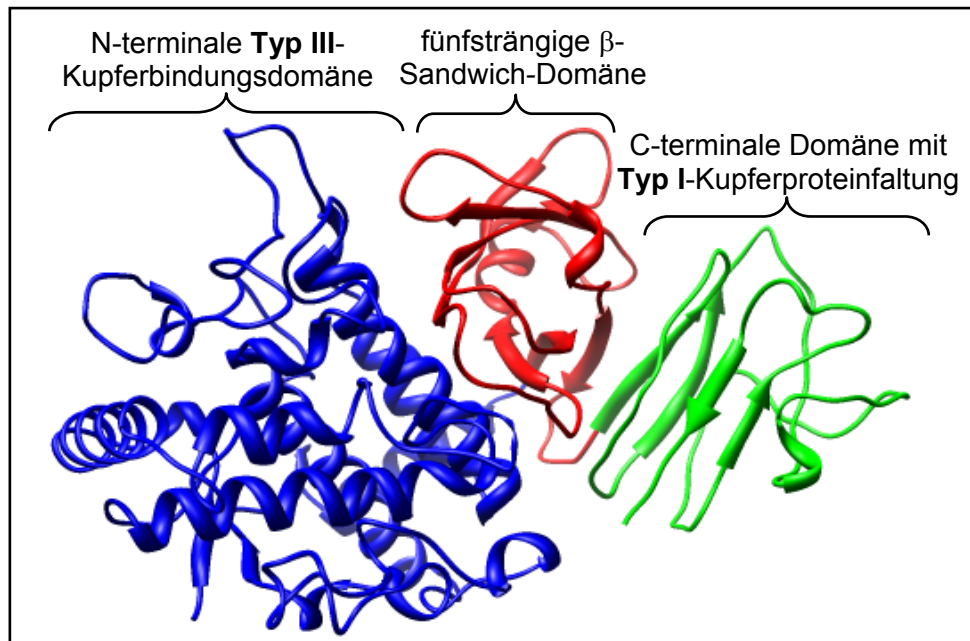


Abb. C33: Modellierte Bänderstruktur der drei Domänen der FU KLH1-h.

Neben der Hämocyanin-typischen α -helikalen Typ III-Kupferbindungsdomäne (blau) sowie der fünfsträngigen β -Sandwich-Domäne (rot) besitzt die FU-h C-terminal eine zusätzliche viersträngige β -Sandwich-Domäne mit einer Typ I-Kupferproteinfaltung (grün). Auch wenn diese bezüglich der Faltung große Ähnlichkeiten mit Cupredoxinen zeigt, ist die Funktion im nativen Molekül ebenso unbekannt wie die etwaige Bindung eines zusätzlichen Kupferatoms und bedarf einer höheren Auflösung der Röntgenstruktur. Die Modellierung der FU KLH1-h erfolgte auf Basis des Verlaufs der C_α -Kette der ermittelten Röntgenstruktur, der verfügbaren Sequenzdaten und der Kristallstruktur von OdH-g mit Hilfe des Programms *MODELLER 9.2* (durchgeführt von [REDACTED], AG Prof. [REDACTED], Uni Mainz). Für die Reste -DNNLRIHVHVDDE- am C-Terminus der Zusatzdomäne konnte aufgrund der fehlenden Referenz keine Faltung modelliert werden, so dass auf deren Darstellung verzichtet wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Flexibilität der drei Domänen der FU-h im Kristallgitter bestimmt (Abb. C34). Generell handelt es sich bei den an Einkristallen gewonnenen Röntgenstrukturdaten zwar um statische Strukturen einer bestimmten Konformation, allerdings schließt die Kristallstrukturanalyse dynamische Daten in Form der sogenannten kristallographischen **Temperaturfaktoren (B-Faktoren)** mit ein. Sie sind über die Beziehung $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$ mit der mittleren quadratischen Atombewegung u verbunden und eine wichtige Kenngröße bei der Beschreibung der Qualität der ermittelten Daten. So korreliert der B-Faktor mit der Beweglichkeit der Moleküle im Kristallgitter bzw. im umgebenden Lösungsmittel. Auf der anderen Seite werden keine großen konzentrierten Bewegungen, wie Domänenrotationen, im Kristall beobachtbar sein, da sich durch die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen des Kristallgitters Bewegungseinschränkungen ergeben. Im Allgemeinen ergeben dicht gepackte Kristalle eine hoch aufgelöste Röntgenstruktur mit kleinen B-Faktoren. Gleichzeitig geht allerdings auch die Information über das dynamische Verhalten der Moleküle verloren, da die starken Kristallkontakte die innere Beweglichkeit der Struktur einschränken. Hohe B-Faktoren erlauben es hingegen, das Verhalten des Moleküls in Lösung zu beschreiben, was jedoch mit einer schlechten Elektronendichte und nur ungenauen Aussagen über die Konformation von vielen Proteinseitenketten verbunden ist.

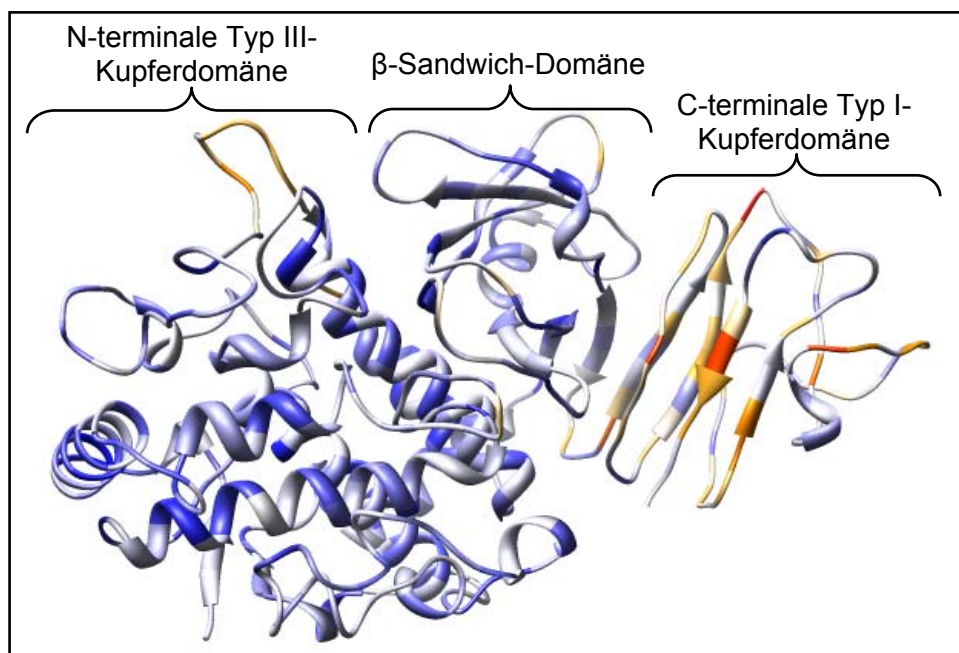


Abb. C34: Bänderstruktur der FU KLH1-h mit farblicher Darstellung der B-Faktoren.

Die entsprechenden Temperaturfaktoren der verschiedenen Domänen der FU-h sind die blau ($B = 20 \text{ \AA}^2$), hellblau ($B = 100 \text{ \AA}^2$), weiß ($B = 200 \text{ \AA}^2$), orange ($B = 300 \text{ \AA}^2$) und rot ($B = 370 \text{ \AA}^2$) dargestellt. Niedrige B-Werte stehen hierbei für eine hohe Auflösung und strukturelle Ordnung innerhalb des Kristallgitters. Hohe B-Faktoren deuten hingegen auf eine schlechtere Elektronendichte, die jedoch Einblicke in das dynamische Verhalten und die Flexibilität der Moleküle ermöglichen. Letzteres konnte für die FU-h vor allem bei der C-terminalen Typ I-Kupferdomäne beobachtet werden mit teilweise sehr hohen B-Werten bis 370 \AA^2 . Die farbliche Darstellung der B-Faktoren erfolgte mit Hilfe des Programms *CHIMERA*.

Aufgrund der schlechten Elektronendichte in Verbindung mit der niedrigen Auflösung von 4 \AA ergaben sich insgesamt sehr hohe Werte für die B-Faktoren der FU-h. Dies ermöglichte jedoch, das dynamische Verhalten des Moleküls in Lösung zu beschreiben. So zeigten sich für Proteinstrukturen normal zu erwartende Temperaturfaktoren ($\sim 30 \text{ \AA}^2$) größtenteils in den Helixregionen der N-terminalen Typ III-Kupferdomäne. Dies spricht für zahlreiche intermolekulare Kontakte innerhalb dieses Bereiches, die zur Aufrechterhaltung der Konformation des aktiven Zentrums und somit zur Funktion des Gesamtproteins essenziell sind. Die Elektronendichtekarte der C-terminalen Typ I-Kupferdomäne war hingegen nur schwach und vor allem für das viersträngige β -Sandwich innerhalb dieser Domäne schlecht definiert (Abb. C34). Hier lagen die Temperaturfaktoren mit Werten von $300 - 370 \text{ \AA}^2$ am höchsten, während die fünfsträngige β -Sandwich-Domäne mit B-Faktoren von $20 - 200 \text{ \AA}^2$ eine deutlich geringere Flexibilität zeigte. Dass die eigentlich starren Sekundärstrukturelemente der Typ I-Kupferdomäne schlecht definiert sind, könnte auf eine Rotation der gesamten Domäne innerhalb des Kristalls und eventuell auch im nativen Molekül schließen lassen.

Eine Überlagerung der Röntgenstrukturen von OdH-g und KLH1-h mit dem Programm *CHIMERA*, ergab für die C_α -Atome einen mittleren RMS-Wert (*Root Mean Square* = mittlere quadratische Standardabweichung) von $0,4 \text{ \AA}$ (Abb. C35). Dies spricht, mit Ausnahme der C-terminalen Zusatzdomäne der FU KLH1-h, für eine nahezu identische Hauptkettenkonformation beider Proteine und lässt sich auf die hohe Sequenzhomologie beider FUs

zurückführen (Abb. C31). Die N-terminale Domäne und die β -Sandwich-Domäne zeigen folglich auch bei der FU-h eine hohe Strukturhomologie zu den übrigen wandformenden FUs der Mollusken-Hämocyanine und lediglich die C-terminale Zusatzdomäne der kragenbildenden FU-h besitzt ein außergewöhnliches Cupredoxin-Faltungsmotiv, welches bei den übrigen FUs fehlt.

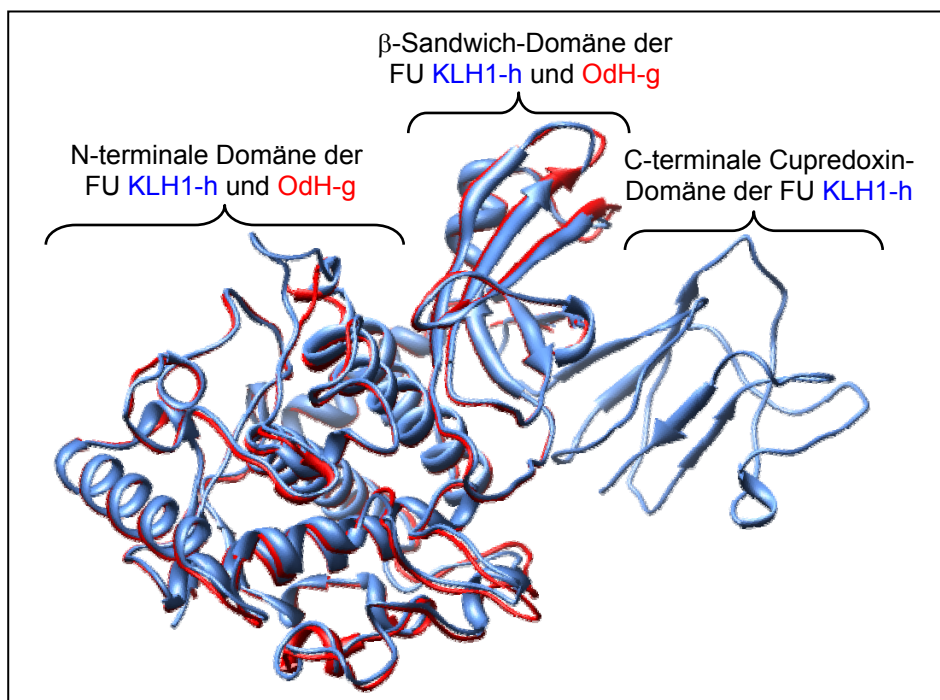


Abb. C35: Überlagerung der Röntgenstrukturen der FUs OdH-g und KLH1-h.

Das Fitting der Kristallstrukturen der FUs OdH-g (rot) und KLH1-h (blau) ergab für die C_{α} -Atome einen mittleren RMS-Wert von 0,4 Å. Diese geringe Abweichung deutete auf eine nahezu identische Hauptkettenkonformation als Folge der hohen Sequenzhomologie beider Proteine hin (Abb. C31). Die FU-h teilt somit bezüglich der N-terminalen Domäne und der β -Sandwich-Domäne eine hohe Strukturhomologie mit den übrigen FUs der Mollusken-Hämocyanine. Lediglich die C-terminale Zusatzdomäne der kragenbildenden FU-h zeigt ein außergewöhnliches Cupredoxin-Faltungsmotiv, welches bei den übrigen FUs fehlt. Die überlagerte Darstellung sowie die Berechnung des RMS-Wertes erfolgten mit Hilfe des Programms *CHIMERA*.

11 Strategien zur Erzielung einer höheren Auflösung der Röntgenstruktur

Die Proteinkristallisation unterliegt einer Vielzahl von Prozessparametern wie Ionenstärke, Pufferkonzentration, Temperatur und Übersättigungsbedingungen. Umso wichtiger ist es für eine erfolgreiche Kristallisation, das Protein in hoher Reinheit (~ 95 %) und ohne störende Einflüsse von Verunreinigungen vorliegen zu haben. Bereits während der Versuche, eine Kristallisation gemäß den Bedingungen des *Hauptman-Woodward Medical Research Institute* (Kap. C9) am *Institut für molekulare Biophysik* zu wiederholen, gab es immer wieder Probleme mit der Stabilität der aufgereinigten Probe der FU KLH1-h. Zum einen fiel auf, dass die Kristalle meistens über Nacht nach einer vorangegangenen Niederschlagsbildung in den Ansätzen wuchsen, sich allerdings häufig nach einigen Tagen ebenso plötzlich wieder auflösten. Zum anderen resultierte eine Lagerungszeit der aufkonzentrierten Probe von mehr als 3 - 4 Wochen bei 4 °C nur noch in den seltensten Fällen in einer erfolgreichen Kristallisation

der FU-h. Diese Beobachtungen ließen daher nur den Schluss zu, dass es innerhalb der aufgereinigten Probe der FU-h mit der Zeit zu einer zunehmenden Verunreinigung kommt, die eine Kristallisation unterbindet. Da bereits gewachsene Kristalle sich nach einigen Tagen wieder auflösten, konnte man davon ausgehen, dass diese Verunreinigungen das Ergebnis eines proteolytischen Abbaus der Proteinprobe sein könnten. Dies würde auch erklären, warum es außerhalb des Temperaturoptimums der Protease (4 °C) einige Wochen dauert, bis die Probe soweit degradiert ist, dass eine Kristallisation nicht mehr möglich ist. Da die KLH1-UE zur Isolierung der FU-h mit nicht unbedeutenden Mengen an V8-Protease inkubiert wurden (1 – 2 mg Protease für 50 mg KLH, Kap. C8), lag der Verdacht nahe, dass die Serinprotease trotz Abtrennung der Spaltprodukte über AEC und Zugabe von irreversiblen Inhibitor, für die proteolytische Aktivität verantwortlich war. Die V8-Protease besitzt zudem zwei Temperaturoptima bei pH 4,0 und 7,8 (Drapeau *et al.*, 1972) in denen sie besonders effizient spaltet. Da sowohl die Kristallisation (Natrium-Citrat, pH 4,0), als auch die Lagerung der Probe (Tris, pH 8,0) unter entsprechenden Bedingungen stattfand, wurde die Stabilität einer frischen Aufreinigung der FU-h über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht. Hierbei wurden Aliquots nach unterschiedlich langer Lagerzeit bei 4 °C eingefroren, um einen weiteren proteolytischen Abbau zu verhindern. Nach insgesamt sechs Monaten erfolgte eine 10 %-ige SDS-PAGE aller Proben (Abb. C36).

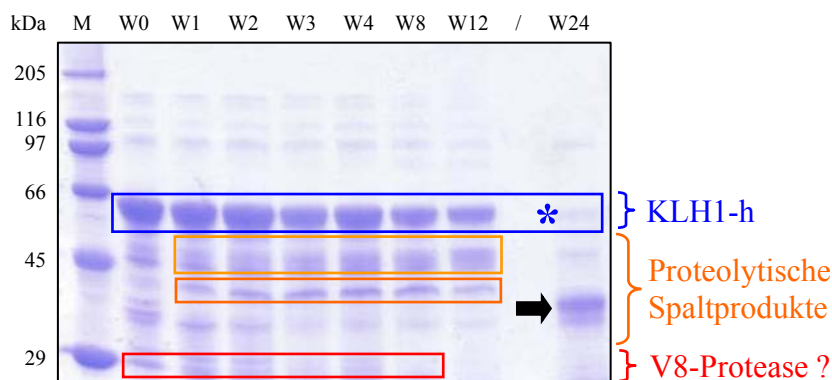


Abb. C36: Langzeituntersuchung zur Stabilität der aufgereinigten Probe der FU KLH1-h.

Bereits nach einer Woche zeigte sich im 10 %-igen SDS-Gel eine Zunahme der proteolytischen Spaltprodukte in der Probe der FU KLH1-h. Besonders auffallend war das Auftreten zusätzlicher Abbaubanden mit einer molekularen Masse von ~ 45 kDa sowie eines zusätzlichen kleineren Fragments mit ~ 40 kDa (orangefarbene Kästen). Die Menge dieser Fragmente nahm bis zur 12. Woche weiter zu, bei gleichzeitiger Abnahme der FU-h-Bande (blauer Kasten, ~ 60 kDa). Nach 6 Monaten (W24) war die FU-h nicht mehr im Gel nachweisbar (blauer Stern), und die Abbauprodukte hatten alle eine vergleichbare molekulare Masse von ~ 35 kDa (Pfeil). Bei den Proteinbanden < 29 kDa könnte es sich eventuell um die V8-Protease mit einer molekularen Masse von 27 kDa handeln. *M*: Proteinmarker; *W0* - *W24*: Lagerungszeit der Proben bei 4 °C, angegeben in Wochen.

Die frische Aufreinigung der FU KLH1-h (*W0*) zeigte im SDS-Gel, neben der dicken Hauptbande der zu kristallisierenden FU, bereits zahlreiche kleinere, proteolytische Fragmente, die sich jedoch mittels AEC nicht weiter abtrennen ließen (Abb. C36). Bei den kleinsten Proteinen < 29 kDa könnte es sich eventuell auch um die V8-Protease mit einer molekularen Masse von 27 kDa (Drapeau *et al.*, 1972) gehandelt haben. Eine Halbierung der eingesetzten Menge an V8-Protease brachte jedoch keine entscheidende Besserung der

Aufreinigung (s. Tab. C1 und Abb. C26, Kap. C8). Nichtsdestotrotz war die Reinheit der Probe wohl hoch genug, da eine Kristallisation der FU-h erzielt werden konnte (Kap. C9). Allerdings konnte im SDS-Gel, trotz des Einsatzes eines irreversiblen Serinproteasen-Inhibitors und der Lagerung der Probe bei 4 °C, ein mit jeder Woche zunehmender proteolytischer Abbau der FU-h beobachtet werden (Abb. C36). Gleichzeitig nahm die Zahl kleinerer Spaltprodukte mit einer molekularen Masse von 40 – 45 kDa weiter zu, bis die Verunreinigung der Probe nach 3 – 4 Wochen so weit fortgeschritten war, dass keine Kristallisation mehr möglich war. Nach 12 Wochen (W12) war die Proteinbande der FU-h nur noch schwach im SDS-Gel zu erkennen, und nach weiteren drei Monaten (W24) der Lagerung bei 4 °C, war das Protein schließlich vollständig degradiert. Im SDS-Gel war nach dieser Zeit keine 60 kDa-Bande mehr sichtbar und es konnten noch Bruchstücke einheitlicher Größe von ~ 35 kDa nachgewiesen werden.

Neben dem Nachweis des proteolytischen Abbaus der FU-h im SDS-Gel, wurde sowohl mit einer frischen, als auch einer mehrere Wochen alten Probe der FU-h, ein zusätzlicher Proteasenaktivitätstest mittels des Substrates Azocasein durchgeführt. Auch hier bestätigte sich die starke proteolytische Aktivität der Proben durch den Verdau des Azocaseins und einer starken Färbung des Überstandes nach Zentrifugation. Eine ähnlich hohe Aktivität war auch noch in der älteren Probe nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Eine proteolytische Aktivität in Verbindung mit den daraus resultierenden Verunreinigungen der Proteinprobe mit Spaltprodukten, kann erheblichen Einfluss auf die Regelmäßigkeit der Molekülanordnung innerhalb der Kristalle haben. Letztere wiederum ist ausschlaggebend für eine hohe Auflösung der Röntgenstruktur. Da die bisher erzielte Auflösung von 4 Å ihre Ursache vermutlich in einer ebensolchen Unregelmäßigkeit der Kristallstruktur hatte, bestand das nächste Ziel darin, die FU KLH1-h in größerer Reinheit und ohne Protease bzw. Proteasenaktivität zu isolieren.

11.1 Inhibition der V8-Proteasenaktivität

Die aufgereinigte Probe der FU KLH1-h zeigte trotz der Zugabe von 1 mM des irreversiblen Serinprotease-Inhibitors *Pefabloc*[®] SC nach wie vor eine starke proteolytische Aktivität (Kap. C11). Um zu testen, wie effektiv die Aktivität der V8-Protease durch den Inhibitor gehemmt werden kann, wurde eine Aktivitätsmessung nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an *Pefabloc*[®], mit Hilfe des Azocasein-Assays durchgeführt (Abb. C37). Eine Proteasenaktivität wird hierbei durch den proteolytischen Verdau des farbstoffgekoppelten Substrats Casein nachgewiesen, deren Spaltprodukte sich nach einer Zentrifugation im Überstand befinden. Während eine deutliche Rotfärbung des Überstandes bereits auf eine Proteasenaktivität schließen ließ, erfolgte die Quantifizierung durch Messung der Absorption des Überstandes bei 340 nm. Die eingesetzte Menge an Protease betrug 100 µg in 1 ml AEC-Puffer (pH 8,0). Als Vergleichsansatz diente die Aktivitätsmessung der Serinprotease Trypsin unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen. Zur Bestimmung der Restaktivität nach Inhibitorzugabe

wurde die gemessene OD_{340nm} der Ansätze mit gleicher Proteasenmenge, aber ohne Zugabe des Inhibitors, als 100 % gesetzt. Als Negativkontrolle diente AEC-Puffer ohne Protease und Inhibitor, wo entsprechend keine proteolytische Aktivität gemessen werden konnte.

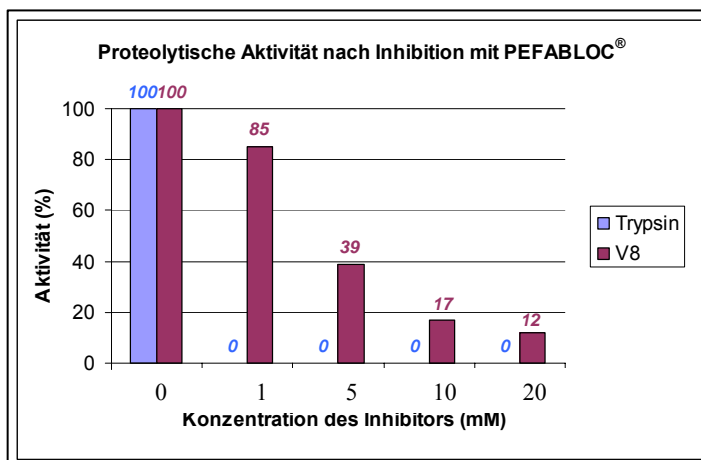


Abb. C37: Proteolytische Aktivität der Serinproteasen V8 und Trypsin nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des irreversiblen Inhibitors *Pefabloc*[®] SC.

Während sich die Protease Trypsin bereits durch Zugabe von 1 mM des irreversiblen Inhibitors *Pefabloc*[®] SC vollständig inhibieren ließ, zeigte die V8-Protease unter diesen Bedingungen noch eine proteolytische Aktivität von 85 %. Selbst 20 mM *Pefabloc*[®] reichten nicht zur vollständigen Inhibition aus und die V8-Protease hatte noch eine Restaktivität von 12 %. Die Aktivitätsmessung erfolgte mittels des Azocasein-Assays.

Anhand des Azocasein-Assays konnte nachgewiesen werden, dass sich die V8-Protease nur bedingt durch *Pefabloc*[®] inhibieren lässt (Abb.C37). Während beim Trypsin bereits 1 mM des irreversiblen Inhibitors ausreichte, um die Protease vollständig in seiner Aktivität zu hemmen, resultierte die gleiche Menge an Inhibitor bei der V8-Protease noch in einer Restaktivität von 85 %. Selbst nach Zugabe von 20 mM *Pefabloc*[®] konnte bei der V8-Protease keine vollständige Inhibition erreicht werden, so dass noch eine proteolytische Aktivität von 12 % ermittelt wurde. Zudem trat bei diesen hohen Mengen an Inhibitor eine Trübung der Proteinlösung auf, vermutlich hervorgerufen durch die Bildung von kovalenten Addukten (Patentanmeldung *Roche Molecul. Biochem.*). Moon *et al.* (2001) konnten bei Inhibitionsstudien an der V8-Protease ähnliche Beobachtungen machen. Nach Inkubation der Serinprotease mit 1mM *Pefabloc*[®] konnten sie noch eine Rest-aktivität von 50 % nachweisen. Eine fast vollständige Inhibition mit nur noch 3 % Restaktivität, erzielten sie durch den Einsatz von 0,1 mM des ebenfalls irreversiblen Inhibitors DFP (Diisopropylfluorophosphat). Da DFP jedoch auch die Acetylcholinesterase hemmt, wurde in dieser Arbeit von der Verwendung dieses hoch giftigen Neurotoxins abgesehen. Da die Möglichkeiten zur Inhibition der V8-Aktivität somit begrenzt waren, wurde als nächste Strategie die möglichst vollständige Entfernung der Serinprotease aus den reinen Fraktionen der FU KLH1-h bevorzugt.

11.2 Entfernung der V8-Protease aus den Fraktionen der FU KLH1-h

Das Ziel dieser Strategie sollte die vollständige Entfernung der V8-Protease aus der zur Kristallisation bestimmten Aufreinigung der FU KLH1-h sein. Um herauszufinden, inwieweit es bei der Aufreinigung der FU-h bereits zu einer Abtrennung der Protease vom

gewünschten Protein kam, musste zunächst ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt die V8-Protease von der AEC-Säule eluiert. Hierzu wurde, gemäß den Bedingungen der reinsten Isolierung der FU-h (Tab. C1b und Abb. C26 b, Kap. C8), insgesamt 1 mg der V8-Protease in 5 ml 20 mM Tris-Puffer pH 8,0 gelöst und anschließend auf eine kleine Q-Sepharose-Säule (53 ml Bettvolumen) aufgetragen. (Abb. C.38). Die Elution der Protease erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0,16 – 0,4 M NaCl. In Abb. C37 sind die Elutionsprofile der KLH1-h-Aufreinigung (s. Abb. C26 b) sowie des AEC-Laufs der V8-Protease vergleichend dargestellt.

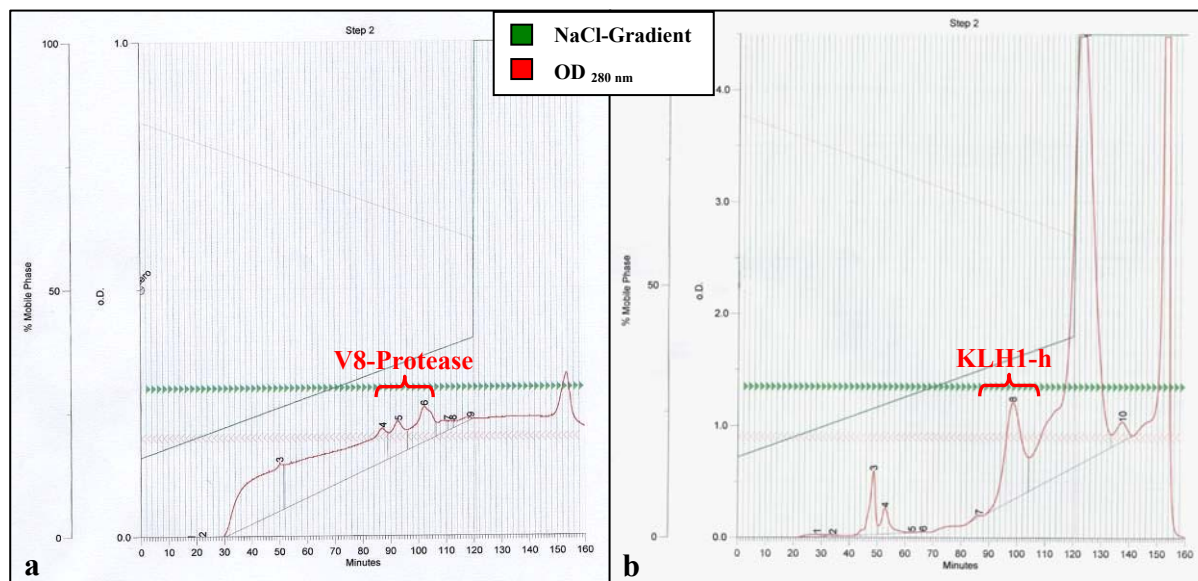


Abb. C38: Vergleichende Elutionsprofile nach Auftrag der V8-Protease bzw. der mit V8 gespaltenen KLH1-UE (s. Abb. C26 b) auf eine AEC-Säule.

Die AEC-Läufe fanden unter Verwendung eines linearen Elutionsgradienten von 0,16 - 0,4 M NaCl statt. Stationäre Phase: Q-Sepharose. *Grün*: NaCl-Gradient; *Rot*: OD_{280nm}. Anhand des Azocasein-Assays (Abb. C39) konnte eine Co-Elution von V8-Protease (a) und FU KLH1-h (b) nach etwa 85 – 110 Minuten (rote Klammern) nachgewiesen werden.

Nach Auftrag der V8-Protease auf die AEC-Säule zeigte das Elutionsprofil einen stetigen Anstieg der OD_{280 nm} ab Minute 30 bis zum Ende des Laufs. Zusätzlich waren drei kleinere Elutionsgipfel zwischen Minute 85 – 110 zu erkennen und ein Größerer bei Minute 150 (Abb. C38 a). Der AEC-Lauf der mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE resultierte in einer größtenteils reinen Elution der FU-h im ersten großen Elutionsgipfel, etwa von Minute 90 – 102 (Abb. C26 b und C38 b). Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität ausgewählter Fraktionen des AEC-Laufs der V8-Protease, wurde ein Azocasein-Assay durchgeführt (Abb. C39). Hierbei dienten Aktivitäten, die nach Einsatz von 1 mg der V8 (eingesetzte Menge zur Spaltung von 50 mg der KLH1-UE) in 1 ml (AEC-Fraktionsvolumen) des AEC-Puffers (pH 8,0) in Form der OD_{340nm} gemessen wurden, als Positivkontrolle (= 100 % Aktivität). Für die Negativkontrolle wurde AEC-Puffer ohne Protease verwendet, wo sich entsprechend keine Aktivität nachweisen ließ.

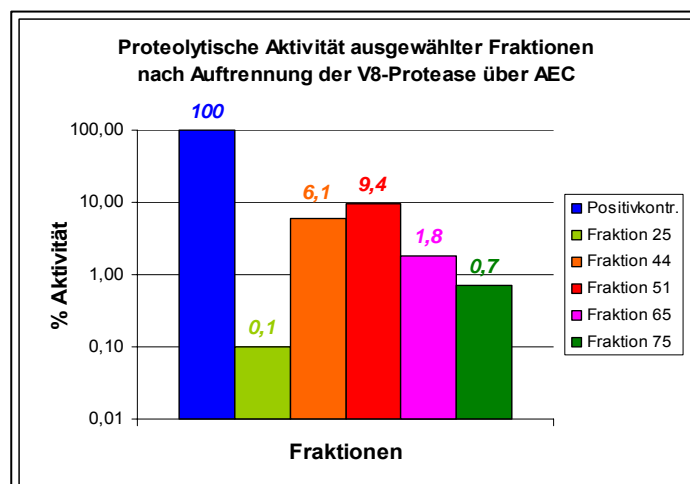


Abb. C39: Proteasenaktivität ausgewählter Fraktionen nach Auftrennung der V8 über AEC (Abb. C38 a). Nach dem AEC-Lauf der V8-Protease zeigte sich die größte proteolytische Aktivität innerhalb der Fraktionen 44 und 55 (Min. 88 – 110) der AEC. Bei ansonsten gleichen Laufbedingungen kam es beim AEC-Lauf der mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE innerhalb dieser Fraktionen zur Elution der FU-h (Abb. C38 b). Somit konnte die Co-Elution von V8-Protease und FU-h als Ursache für die große proteolytische Aktivität innerhalb der zur Kristallisation bestimmten Probe sowie deren Instabilität bestätigt werden. Die Aktivitätsmessung erfolgte mittels des Azocasein-Assays. Das Diagramm ist aufgrund der Positivkontrolle halblogarithmisch dargestellt.

Mit Hilfe des Proteasenaktivitätstests konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der V8-Protease innerhalb der drei kleineren Elutionsgipfel von Minute 88 – 110 von der Säule eluierte. In den Fraktionen der ersten beiden Gipfel betrug die Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle jeweils 6,1 %. Beim dritten Gipfel ab Minute 100 wurde mit knapp 9,4 % das Aktivitätsmaximum gemessen (Abb. C39). In den darauffolgenden Fraktionen nahm die proteolytische Aktivität rapide ab und betrug nach 130 Minuten Elutionszeit nur noch 1,8 %. Beim letzten Elutionsgipfel bei Minute 150 wurde zwar die höchste OD_{280nm} gemessen (Abb. C38 a), die Aktivität innerhalb dieser Fraktionen war mit 0,7 % jedoch nur noch minimal. Somit ist dieses Elutionsmaximum nicht auf die V8-Protease zurückzuführen, sondern liegt vermutlich in einem Artefakt des Geräts oder sonstigen Proteinrückständen der Säule begründet. Innerhalb der früheren Fraktionen, wo es nach etwa 50 Minuten erstmals zu einem größeren Anstieg der OD_{280nm} kam, konnte mit 0,1 % kaum eine Proteasenaktivität nachgewiesen werden. Der Vergleich der AEC-Läufe von V8-Protease einerseits und mit V8 gespaltenen KLH1-UE andererseits verdeutlicht somit, dass die gewählte Aufreinigungsstrategie zwar in einer optimalen Ausbeute bei bestmöglicher Reinheit der FU KLH1-h resultierte (Tab. C1 b, Kap. C8), jedoch auch eine Co-Elution von Protease und FU-h zur Folge hatte. Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Instabilität der zur Kristallisation bestimmten Probe das Ergebnis einer anhaltenden proteolytischen Aktivität war und diese wiederum aus der V8-Spaltung der KLH1-UE resultierte, wurde folglich damit belegt, dass sich die Aktivität der V8 zum einen nicht mittels *Pefabloc*[®] inhibieren ließ und zum anderen keine Abtrennung der Protease während des AEC-Laufs stattfand.

Da auch durch Variation der Elutionsgradienten keine Verschiebung der Elutionszeitpunkte von V8-Protease und FU-h festzustellen war und die Reinheit der Probe teilweise sogar schlechter wurde (Daten nicht gezeigt), bestand das nächste Ziel darin, die 27 kDa große V8-

Protease mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) von der mit ~ 60 kDa doppelt so großen FU-h abzutrennen. Hierbei wurden die etablierten Bedingungen der Aufreinigung der FU-h insofern modifiziert, dass die Spaltungen der KLH1-UE nicht wie bisher in Glycin-Puffer pH 9,6, sondern pH 8,0 durchgeführt wurden. Durch diese Erniedrigung des pH-Wertes in Richtung des pH-Optimums der V8-Protease sollte die Effizienz der Spaltung trotz Halbierung der eingesetzten Enzymmenge (1 x 2 %, w/w) verbessert werden, um so eine annähernd gleich hohe Ausbeute zu garantieren (Tab. C1 b, c). Des Weiteren erfolgte die Größenfraktionierung der Spaltprodukte bereits vor der eigentlichen AEC-Aufreinigung der FU-h, um die Protease nach der Spaltung der KLH1-UE schnellstmöglich aus der Probe zu entfernen und somit einen fortlaufenden proteolytischen Verdau zu unterbinden. Nach fünf-stündiger Inkubation der KLH1-UE mit der V8-Protease, wurde die Probe auf insgesamt 1 ml Volumen aufkonzentriert und anschließend ~ 50 mg der Spaltprodukte auf eine SEC-Säule (Biogel[®] P-60) aufgetragen. Um die Proteasenaktivität bereits während der Gelfiltration abzuschwächen, wurde der pH-Wert des Elutions-Puffers (Glycin-Puffer) auf 9,6 eingestellt. Das Elutionsprofil des SEC-Laufs zeigte nur einen großen Elutionsgipfel, was zunächst auf keine erfolgreiche Abtrennung unterschiedlich großer Fragmente schließen ließ (Abb. C40 a). Allerdings resultierte die hohe Proteinmenge auf der Säule auch in der Elution von Fraktionen, die beim Absorptionsmaximum eine Proteinkonzentration von weit über 3 mg/ml aufwiesen. Eine photometrische Aufzeichnung der OD_{280nm} ist jedoch bei so hoch konzentrierten Proteinlösungen nicht möglich. Um eine eventuell dennoch erfolgreiche Größenfraktionierung der Fragmente innerhalb der Fraktionen des Elutionsgipfels nachzuweisen, wurde mit ihnen eine 10 %-ige SDS-PAGE durchgeführt (Abb. C40 b).

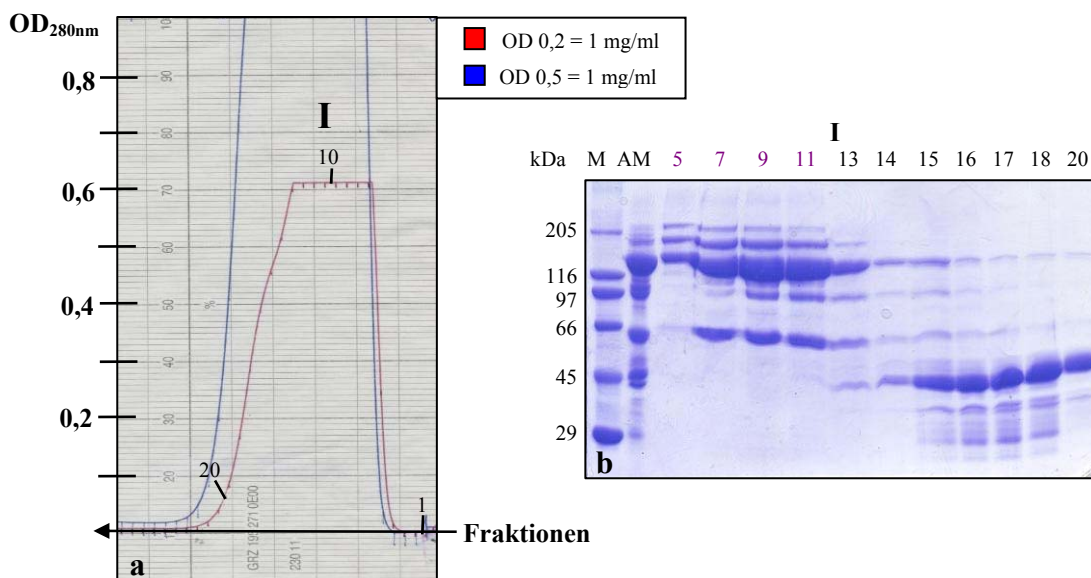


Abb. C40: Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH1-UE über SEC (Biogel[®] P-60).

a) Das Elutionsprofil der SEC zeigte nur einen großen Elutionsgipfel. Die Elution erfolgte mittels Glycin-Puffer pH 9,6. Die Fraktionsnummern sind angegeben. Bei der roten/blauen Elutionslinie entspricht eine OD von 0,2/0,5 aufgrund der Schreibereinstellung von 50/20 mV und einer Empfindlichkeit von 1,0 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen des Elutionsgipfels der SEC. Violett gekennzeichnete Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung auf eine AEC-Säule aufgetragen (Abb. C42). M: Proteinmarker; AM: Ausgangsmaterial der SEC (mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE); I: Elutionsgipfel.

Anhand der SDS-PAGE konnte schließlich nachgewiesen werden, dass die Gelfiltration in einer effizienten Abtrennung größerer Fragmente, in den Fraktionen der ersten Hälfte des Elutionsgipfels, von zahlreichen kleineren Bruchstücken und einem Monodomänen-Fragment mit 45 kDa in der zweiten Hälfte des Gipfels resultierte (Abb. C40 b). In den Fraktionen 7 – 11 war neben den größeren Di-, Tri- und Tetradomänen-Fragmenten auch ein Spaltprodukt mit einer molekularen Masse von ~60 kDa zu erkennen. Da es sich hierbei aufgrund der Größe um die FU-h handeln sollte, wurde vor der weiteren Aufreinigung des Proteins mittels AEC ein Proteasenaktivitätstest durchgeführt, um eine proteolytische Aktivität innerhalb dieser Fraktionen auszuschließen (Abb. C41). Aufgrund der molekularen Masse von nur 27 kDa, sollte die V8-Protease bei erfolgreicher Größenfraktionierung gegen Ende des Laufs von der Säule eluieren. Proteine entsprechender molekularer Masse waren im SDS-Gel größtenteils auch nur innerhalb der letzten Fraktionen des Elutionsgipfels sichtbar und sollten entsprechend die höchste proteolytische Aktivität besitzen. Bei der Durchführung des Azocasein-Assays dienten Aktivitäten, die nach Einsatz von 1 mg der V8 (eingesetzte Menge zur Spaltung von 50 mg der KLH1-UE) in 650 µl (SEC-Fraktionsvolumen) des SEC-Puffers (pH 9,6), in Form der OD_{340nm} gemessen wurden, als Positivkontrolle (= 100 % Aktivität). Für die Negativkontrolle wurde SEC-Puffer ohne Protease verwendet, wo sich entsprechend keine Aktivität nachweisen ließ.

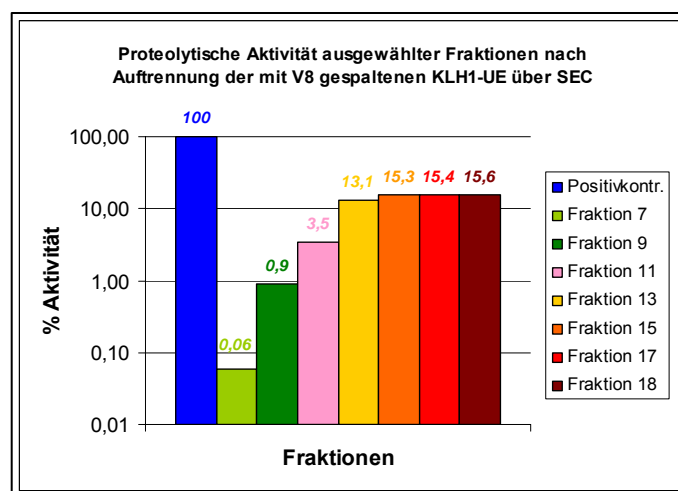


Abb. C41: Proteolytische Aktivität ausgewählter Fraktionen nach Auftrennung der mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE über SEC (Abb. C40).

Innerhalb der Fraktionen 7 – 11 der ersten Hälfte des Elutionsgipfels der SEC konnte mit 0,06 – 3,5 % nur eine sehr geringe proteolytische Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Fraktionen 13 – 18 der zweiten Hälfte des Elutionsgipfels mit jeweils ~ 15 % eine bedeutend höhere Proteasenaktivität. Die SEC resultierte somit in einer nahezu vollständigen Abtrennung der V8-Protease von den Fraktionen mit dem 60 kDa-Fragment, welches in den Fraktionen 7 - 11 von der Säule eluierte und folglich im nächsten Schritt mittels AEC weiter aufgereinigt werden konnte (Abb. C42). Die Aktivitätsmessung erfolgte mittels des Azocasein-Assays. Das Diagramm ist aufgrund der Positivkontrolle halblogarithmisch dargestellt.

Der Proteasenaktivitätstests bestätigte das Ergebnis der SDS-PAGE (Abb. C40 b), das bereits auf eine erfolgreiche Abtrennung der kleineren Protease und Spaltstücken von dem 60 kDa-Fragment mittels Gelfiltration schließen ließ. So konnten innerhalb der Fraktionen 7 -11 der ersten Hälfte des Elutionsgipfels nur noch eine proteolytische Aktivität von 0,06 – 3,5 %

gemessen werden, während sie in den letzten Fraktionen 13- 18 des SEC-Laufs mit jeweils ~ 15 % deutlich höher lag (Abb. C41). Die Strategie der Größenfraktionierung war folglich richtig gewählt, um die V8-Protease aus den Fraktionen des 60 kDa-Proteins zu entfernen. Um letzteres weiter aufzureinigen, wurden die Fraktionen 6 – 12 der SEC vereinigt (30 mg) und auf eine kleine AEC-Säule (Q-Sepharose, 53 ml Bettvolumen) aufgetragen (Abb. C42 a). Die Elution der Fragmente erfolgte mittels des bereits etablierten Gradienten von 0,16 – 0,4 M NaCl. Ausgewählte Fraktionen der vier Elutionsgipfel wurden mittels 10 %-iger SDS-PAGE auf Reinheit überprüft (Abb. C42 b).

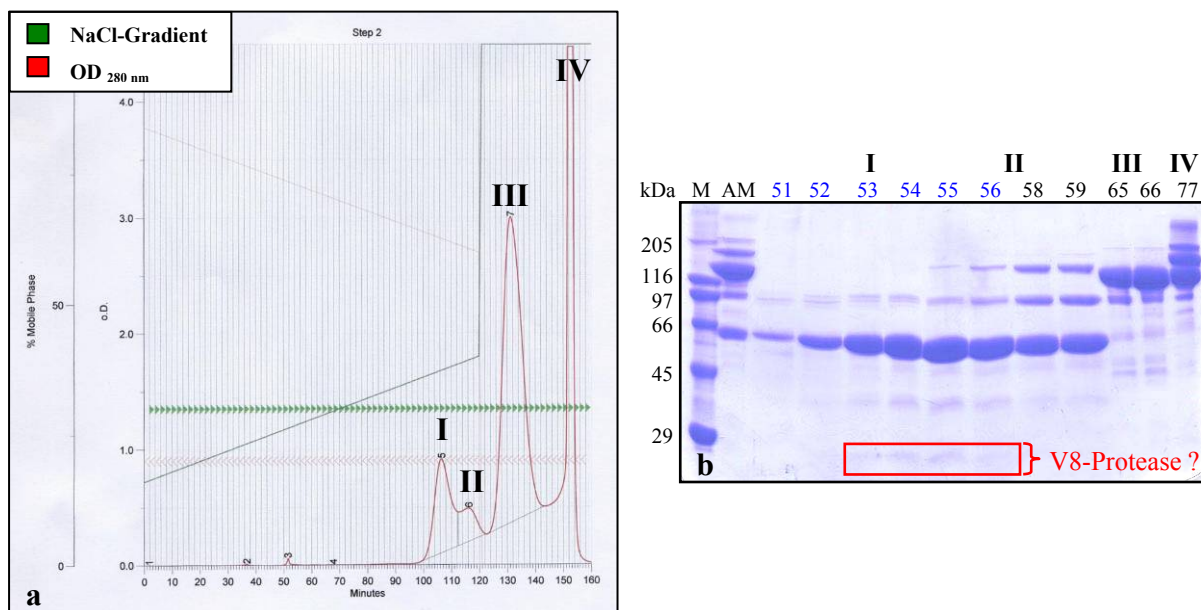


Abb. C42: Weiterführende Aufreinigung der Fraktionen 6 - 12 der SEC (Abb.C40) mittels AEC.

a) Elutionsprofil der AEC unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,16 - 0,4 M NaCl. Stationäre Phase: Q-Sepharose. Grün: NaCl-Gradient; Rot: OD_{280nm}. b) 10%-ige SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der vier Elutionsgipfel der AEC. Blau markierte Fraktionen wurden zur weiteren Charakterisierung einer *Crossed-line* IE unterzogen (Abb. C43). Der rote Kasten umrandet Proteinbanden < 29 kDa, bei denen es sich eventuell um letzte Reste der V8-Protease handeln könnte. M: Proteinmarker; AM: Ausgangsmaterial der AEC (Fraktionen 6 – 12 der SEC); I – IV: Elutionsgipfel.

Die weiterführende Aufreinigung der frühen Gipfel fraktionen 6 – 12 der SEC (Abb. C40) mittels AEC, resultierte in einer mehr als 95 % reinen Elution des 60 kDa großen Fragments im Elutionsgipfel I (Abb. C42 b). Die zahlreichen kleineren proteolytischen Bruchstücke der früheren Aufreinigungsstrategie (Abb. C26, Kap. C8) waren innerhalb dieser Fraktionen im SDS-Gel nicht mehr nachweisbar, da sie bereits beim vorherigen SEC-Lauf größtenteils abgetrennt wurden (Abb. C40). Allerdings waren noch einige sehr dünne Banden mit einer molekularen Masse von unter 29 kDa in den Fraktionen zu erkennen, wobei es sich um Reste der 27 kDa großen V8-Protease handeln könnte (Abb. C42 b). Ab Elutionsgipfel II nahm die Verunreinigung des 60 kDa-Fragments mit größeren Bruchstücken wie Di- und Tridomänen-Fragmenten zu, so dass diese Fraktionen nicht für die nachfolgenden Studien herangezogen wurden. Innerhalb der Fraktionen der Gipfel III und IV eluierten schließlich nur noch die größten Fragmente der mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE von der Säule. Der immunologische Nachweis, ob es sich bei dem 60 kDa großen Protein innerhalb der reinsten

Fractionen 51 – 56 tatsächlich um das Monodomänen-Fragment der FU KLH1-h handelte, erfolgte mittels *Crossed-line* IE (Abb. C43).

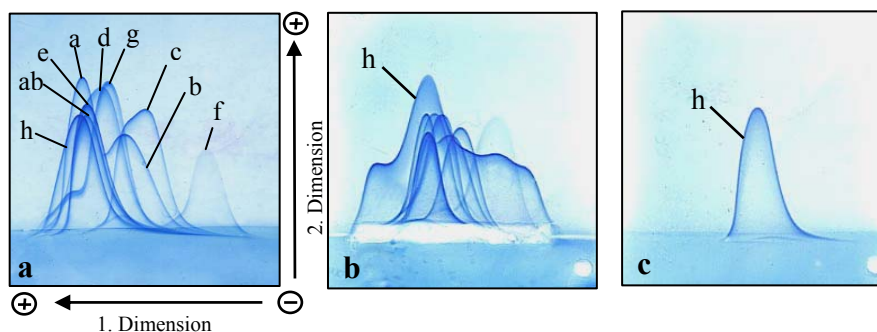


Abb. C43: Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C42) mittels *Crossed-line* IE.

a) *Crossed* IE der mit Elastase gespaltenen KLH1-UE (Kontrolle). b) *Crossed-line* IE der Fraktionen 51 - 56 der AEC. c) *Crossed* IE der Fraktionen 51 - 56 der AEC. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Mit Hilfe der *Crossed-line* IE der vereinigten Fraktionen 51 – 56 der AEC (Abb. C42) konnte der eindeutige Nachweis erbracht werden, dass es sich bei dem Fragment mit einer molekularen Masse von ~ 60 kDa um die FU-h des KLH1 handelte. Das *Line*-Protein fusionierte hierbei ausschließlich mit der FU-h der Elastasespaltung der KLH1-UE (Abb. C43 a), was in einem erhöhten Präzipitationsgipfel resultierte (Abb. C43 b). Im Gegensatz zu den früheren Aufreinigungen dieser FU (Abb. C26, Kap. C8), zeigten sich auch in der *Crossed* IE der Fraktionen keine zusätzlichen Präzipitate, so dass eine Kontamination mit anderen KLH-Fragmenten ausgeschlossen werden konnte. Dies stand wiederum im Einklang mit der im SDS-Gel sichtbaren hohen Reinheit der FU-h-Aufreinigung, wo nur eine prägnante 60 kDa-Proteinbande zu erkennen war (Abb. C42 b). Die Gesamtausbeute an reiner FU-h war bei dieser Strategie mit 2,5 mg (40 %) zwar etwas geringer als bei der früheren Aufreinigungsstrategie (50 %), allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass dort auch die Verunreinigungen der kleineren proteolytischen Spaltprodukte in die Berechnung der Ausbeute miteinbezogen wurden. Um für neue Kristallisationsansätze ~ 10 mg an reinem Protein zur Verfügung zu haben, wurde die Aufreinigungsprozedur dieses Kapitels entsprechend mehrfach wiederholt. Die reinsten FU-h-Fractionen aller Aufreinigungen wurden schließlich vereinigt und auf ein Probenvolumen von 1 ml aufkonzentriert. Da bei den Fraktionen der FU-h teilweise noch sehr dünne Proteinbanden im SDS-Gel zu erkennen waren, wobei es sich bezüglich der molekularen Masse durchaus um Reste der V8-Protease (27 kDa) handeln könnte (Abb. C42 b), wurde eine abschließende Bestimmung der proteolytischen Aktivität der aufkonzentrierten Probe mittels Azocasein-Assay durchgeführt. Hierbei konnte in Glycin-Puffer pH 9,6 noch eine Proteasenaktivität von 10 % ermittelt werden, was auf das Vorkommen von noch geringen Mengen der V8-Protease in der zur Kristallisation bestimmten Probe schließen ließ. Um auch die letzten Reste der Protease zu entfernen, wurde die aufkonzentrierte Probe der FU-h erneut einer Größenfraktionierung mittels Gelfiltration unterzogen (Bedingungen gemäß Abb. C40). Der SEC-Lauf resultierte in

nur einem großen Elutionsgipfel (Daten nicht gezeigt) bei einem Proteinverlust von insgesamt 3 mg (22 %). Nach erneuter Einengung der proteinhaltigen SEC-Fractionen auf ein Volumen von 1 ml zeigte sich jedoch, dass die proteolytische Aktivität der noch immer in Glycin-Puffer pH 9,6 befindlichen Probe auf 0,3 % reduziert werden konnte. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die V8-Protease im Elutions-Puffer mit einem pH von 9,6 nicht ihre volle Aktivität besitzt, da ihr pH-Optimum bei pH 7,8 liegt. Da die Probe der aufgereinigten FU-h zur Kristallisation jedoch in Tris-Puffer überführt wurde, der einen pH-Wert von 8,0 besaß, sollte die gemessene Aktivität der Protease entsprechend höher sein. Um auch die letzte Restaktivität der V8-Protease zu unterbinden, wurden der Probe zusätzlich 2 mM des Proteaseninhibitors *Pefabloc*[®] hinzugefügt. Des Weiteren wurden Aliquots der Probe in dünnwandigen (~ 1 mm) PCR-Tubes nach der Methode von Deng *et al.* (2003) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Vorteil besteht darin, dass die Proteinprobe in den Tubes schneller gefriert, als durch direktes Einfrieren eines Probentropfens in flüssigem Stickstoff oder in dickwandigeren Eppendorf-Tubes. Generell kann ein Einfrieren zur Denaturierung und Aggregation der Proteine führen, da es zu Änderungen des pH-Werts oder zu Wassereiskristall induzierten Protein- und Lösungsmittelkonzentrierung kommen kann (Franks, 1985). Sehr schnelles Einfrieren wie im Falle der dünnwandigen (~ 1mm) PCR-Tubes, kann diese Effekte minimieren und verhindert ein Ausfallen des Proteins nach dem Auftauen. Vor dem Einfrieren erfolgte eine abschließende Qualitätssicherung der Probe mittels SDS-PAGE und Absorptionsspektroskopie, um eine durch die vielen Aufreinigungsschritte induzierte Degradation des Proteins auszuschließen und die nach wie vor intakte Funktion der FU-h als Sauerstofftransporter nachzuweisen (Abb. C44). Für letzteres wurde ein Vergleichsspektrum unbehandelter KLH1-UE gemessen und das 340/280 nm-Verhältnis beider Proben bestimmt. Bei nativen und voll oxygenierten Hämocyaninen liegt dieses bei ~ 0,21 (Salvato & Beltrami, 1990). Das 280/250 nm-Verhältnis gab zusätzlich Aufschluss über den Grad der Streuung, die bei einem degradierten Protein in einer Zunahme der Absorption bei 250 nm resultiert.

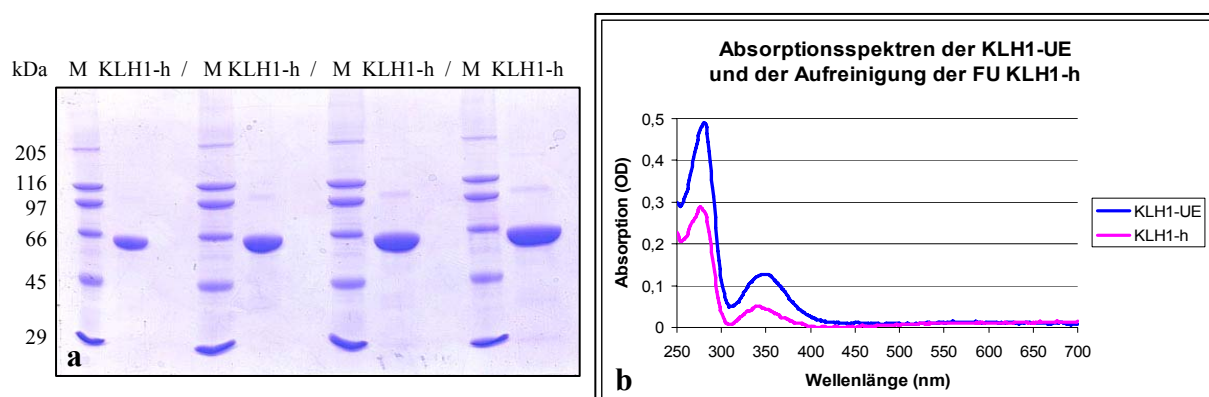


Abb. C44: Qualitätssicherung der zur Kristallisation bestimmten Probe der FU KLH1-h.

a) 10%-ige SDS-PAGE der aufgereinigten und vereinigten Fraktionen der FU KLH1-h (Abb. C42). Auftragsmenge von links nach rechts: 2, 4, 6, 8 µg. b) Absorptionsspektren der aufgereinigten und vereinigten Fraktionen der FU KLH1-h und der KLH1-UE von 270 – 700 nm. Die FU-h zeigte im Gel trotz der zahlreichen Aufreinigungsschritte keine Degradation und auch das Spektrum lieferte aufgrund der für Hämocyanine typischen Absorptionsmaxima bei 280 nm und 340 nm keinen Hinweis auf den Verlust der Sauerstofftransportfunktion. Das 340/280 nm-Verhältnis der FU-h lag mit 0,18 nur geringfügig unter dem der KLH1-UE mit 0,25.

Die SDS-PAGE der zur Kristallisation bestimmten Probe zeigte nur eine charakteristische Proteinbande der FU-h bei ~ 60 kDa. Hinweise auf eine Degradation des Proteins in Form von Abbaubanden waren nicht zu erkennen (Abb. C44 a). Die Messung eines Absorptionsspektrums lieferte die für Hämocyanine typischen Absorptionsmaxima bei 280 nm und 340 nm (Abb. C44 b). Das 340/280 nm-Verhältnis lag mit 0,18 nur unerheblich unter dem des Vergleichsspektrums der unbehandelten KLH1-UE mit einem Wert von 0,25. Dies ließ neben der Abnahme des 280/250 nm-Verhältnisses von 1,5 auf 1,2 auf eine geringfügige Beeinträchtigung der Proteinstruktur, in Verbindung mit einer leichten Deoxygenierung der FU-h schließen und resultierte vermutlich aus den zahlreichen Aufreinigungsschritten dieser FU. Nichtsdestotrotz deuteten diese Werte zusammen mit dem Absorptionsmaximum bei 340 nm auf eine nach wie vor intakte Sauerstofftransportfunktion der FU. Die in diesem Kapitel beschriebene Aufreinigungsstrategie zur Isolierung der FU KLH1-h bei gleichzeitiger Entfernung der V8-Protease ist nachfolgend in Abb. C45 zusammenfassend dargestellt.

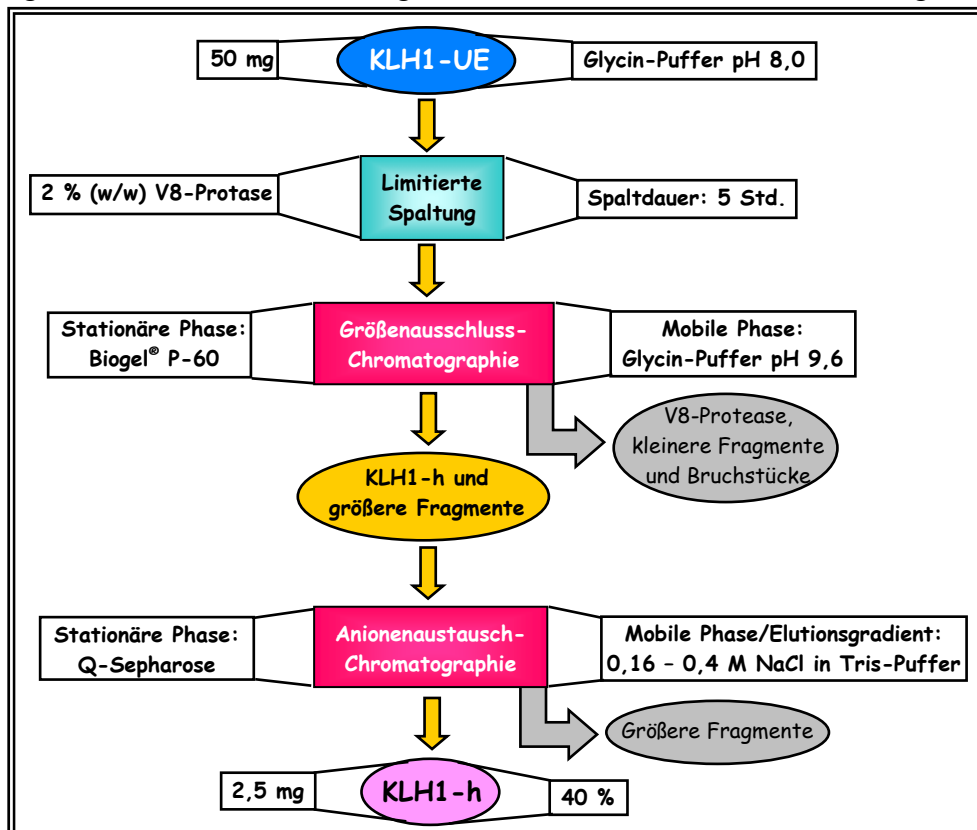


Abb. C45: Strategie zur Isolierung der FU KLH1-h bei gleichzeitiger Entfernung der V8-Protease.

Die isolierten KLH1-UE (Kap. C2) wurden in Glycin-Puffer pH 8,0 (pH-Optimum der V8-Protease) überführt und nach einmaliger Zugabe von 2 % (w/w) der V8-Protease für 5 Stunden gespalten. Die proteolytischen Spaltprodukte wurden anschließend auf eine SEC-Säule (Biogel® P-60) aufgetragen und mit Glycin-Puffer pH 9,6 eluiert. Durch die Größenfraktionierung erfolgte eine Abtrennung der 60 kDa großen FU-h zusammen mit größeren Fragmenten von kleineren proteolytischen Fragmenten und der V8-Protease (Abb. C40 und C41). Fraktionen mit der FU-h sowie den größeren Fragmenten wurden zur weiteren Aufreinigung einer Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose unterzogen. Der Elutionsgradient betrug hierbei 0,16 - 0,4 M NaCl in 20 mM Tris-Puffer. Der AEC-Lauf resultierte in einer sauberen Elution der FU KLH1 innerhalb des ersten Elutionsgipfels, gefolgt von den größeren Fragmenten im Gipfel II – IV (Abb. C42). Die Ausbeute an reiner FU KLH1-h betrug je Aufreinigungsdurchgang $\sim 2,5$ mg (40 %). Nach mehreren Durchläufen wurden 10 mg der FU-h erneut auf eine SEC-Säule aufgetragen um letzte Reste der V8-Protease zu entfernen. Die proteolytische Aktivität konnte hierbei von 10 % auf 0,3 % verringert werden, bei einem Proteinverlust von ~ 3 mg (22 %).

11.2.1 Charakteristische Absorptionsspektren und Farbgebung der FU KLH1-h

Bei allen Aufreinigungsprozeduren (Kap. C8 und C11) konnte nach Aufkonzentrierung der Fraktionen der FU KLH1-h auf eine Proteinkonzentration zwischen 10 – 20 mg/ml, eine im Vergleich zum blauen, nativen Hämocyanin charakteristische, rötlich-violette Färbung der Probe beobachtet werden (Abb. C46 c). Zur Bestimmung der hierfür verantwortlichen absorbierenden Wellenlänge, wurde mit der unverdünnten und hoch konzentrierten Probe ein Absorptionsspektrum im *NanoDrop*[®]-Spektralphotometer ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen und mit dem Spektrum der KLH1-UE verglichen (Abb. C46 a, b). Mit jeder Probe wurden zwei Spektren mit den Weglängen von 1,0 sowie 0,2 mm gemessen. Letztere gaben das Absorptionsmaximum bei 280 nm gut wieder, waren aber bei 345 nm sowie dem Maximum um 550 - 580 nm sehr schwach. Die 1 mm Spektren hingegen waren bei 280 nm bereits in der Sättigung, gaben aber die anderen beiden Maxima gut wieder. Zur besseren Veranschaulichung der Spektren wurden sie anhand der Absorption bei 343 nm aufeinander normiert und zusammengefügt. Zusätzlich erfolgte eine Multiplikation mit dem Faktor 10, um eine Absorption zu erhalten, wie sie bei einer Weglänge von 1 cm gemessen worden wäre. Die normierten Absorptionswerte der KLH1-UE wurden aufgrund einer geringeren Proteinkonzentration der Probe zudem mit dem Faktor 3,5 multipliziert, um sie besser mit dem normierten Spektrum der FU-h vergleichen zu können.

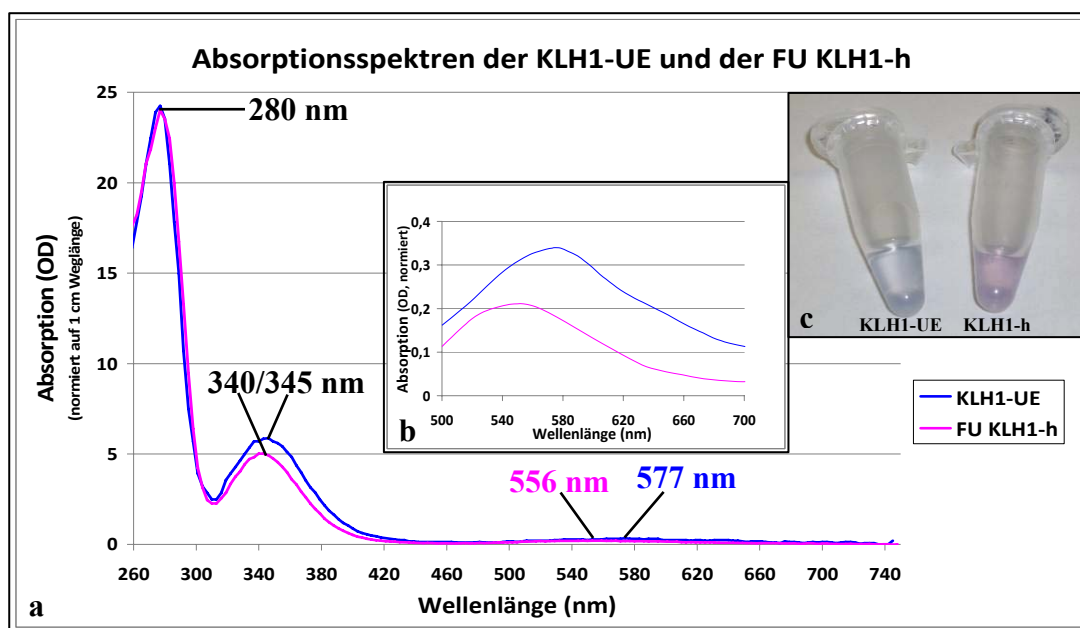


Abb. C46: Charakteristische Absorptionsspektren und Farbgebung der KLH1-UE sowie der FU KLH1-h. a) Vergleichende Absorptionsspektren der KLH1-UE sowie der FU KLH1-h, mit den für Hämocyanine typischen Absorptionsmaxima bei 280 nm und 340 nm (Fu-h) bzw. 345 nm (UE). b) Die KLH1-UE zeigte zusätzlich eine schwache Absorption bei 577 nm (blaue Linie), während die FU-h sich durch ein Absorptionsmaximum bei 556 nm (rot-violette Linie) auszeichnete. c) Foto des in UE dissoziierten bläulichen KLH1 (links) und der zur Kristallisation bestimmten rötlich-violetten Aufreinigung der FU-h (rechts). Die Messungen der unverdünnten Proben erfolgten in 20 mM Tris pH 8,0 (Fu-h) und Glycin-Puffer pH 9,6 (KLH1-UE) im *NanoDrop*[®]-Spektralphotometer. Mit jeder Probe wurden zwei Spektren mit den Weglängen von 1,0 sowie 0,2 mm gemessen und diese anhand der Absorption bei 343 nm aufeinander normiert und zusammengefügt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10 wurden Absorptionswerte bei einer Weglänge von 1 cm erhalten. Die Absorptionswerte der KLH1-UE wurden aufgrund einer geringeren Proteinkonzentration der Probe zusätzlich mit dem Faktor 3,5 multipliziert.

Die Absorptionsspektren lieferten sowohl für die UE des KLH1, als auch für die isolierte FU KLH1-h zwei prägnante Maxima. Zum einen der für alle Proteine typische Gipfel bei 280 nm, da in diesem Wellenlängenbereich die aromatischen Aminosäuren Tyr, Phe und vor allem Trp absorbieren. Des Weiteren zeigte sich eine Absorption bei der für kupferhaltige, oxygenierte Hämocyanine typischen Wellenlänge von 340 nm bei der FU-h bzw. 345 nm bei der KLH1-UE. Zusätzlich konnte in den Spektren eine schwache Absorption zwischen 550 – 600 nm beobachtet werden (Abb. C46 a). Durch Vergrößerung des Spektrums innerhalb dieses Wellenlängenbereichs konnte die unterschiedliche Farbgebung der beiden Proben (Abb. C46 c) auch anhand der Absorptionsspektren nachgewiesen werden. So ergab sich für die rötlich-violette FU-h ein drittes Absorptionsmaximum bei 556 nm, während die blaue Farbe der KLH1-UE aus einem Absorptionsmaximum bei 577 nm resultiert (Abb. C46 b).

12 Kristallisation der proteasenfremen FU KLH1-h

Nachdem durch Anwendung der neuen Strategie (Abb. C45, Kap. C11) 10 mg an nahezu proteasenfrem FU KLH1-h mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml aufgereinigt vorlagen, wurden am *Institut für molekulare Biophysik* (Mainz) in Zusammenarbeit mit Jun.-Prof. Dr. [REDACTED] und [REDACTED] erneut Kristallisationsansätze durchgeführt. Hierbei kamen die bereits erfolgreichen Kristallisationsbedingungen der früheren Aufreinigung (Abb. C29, Kap. C9) zur Anwendung. Das Ziel bestand darin, durch die nun sehr viel geringere proteolytische Aktivität der Probe, stabilere und beständigere Kristalle zu bekommen, die aufgrund der höheren Reinheit und Homogenität der Aufreinigung am Synchrotron zudem eine höhere Auflösung von mindestens 3 Å erzielen sollten. Allerdings bildeten sich auch nach zahlreichen Variationen der einzelnen Fällungsmittelkonzentrationen keine Kristalle, sondern stattdessen in allen Ansätzen stets nur ein diffuser Niederschlag (s. Diplomarbeit Anja Rabenhorst). Somit waren die Bedingungen des Kristallisations-Screening (Abb. C28 und C29, Kap. C9) des *Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI)* nur für die Aufreinigung der FU-h mit V8-Protease anwendbar. Da diese allerdings der limitierende Faktor für die nur unzureichende Auflösung zu sein schien, wurde die proteasenfrem Aufreinigung der FU-h (Kap. C11) erneut für ein Kristallisations-Screening ans *HWI* nach Buffalo (USA) geschickt. Das Screening erfolgte erneut im *Microbatch*-Verfahren unter Öl und lieferte für die proteasenfrem Probe der FU KLH1-h nach zwei Wochen unter einer Bedingung Kristalle (Abb. C47). Diese waren, bis auf einen leicht höheren pH-Wert, einer anderen PEG-Konzentration und der Abwesenheit von K_2HPO_4 , den Bedingungen des ersten Screenings sehr ähnlich:

0,1 M Zitronensäure (pH 5,0), 5 % (w/v) PEG 6000

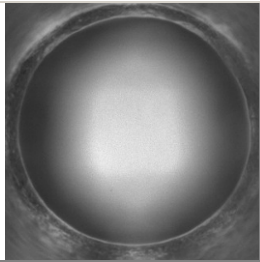
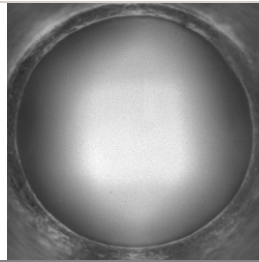
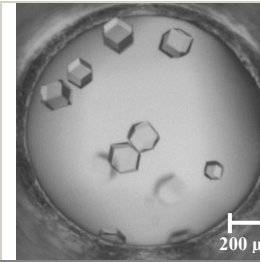
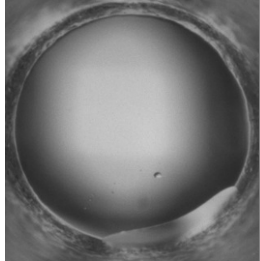
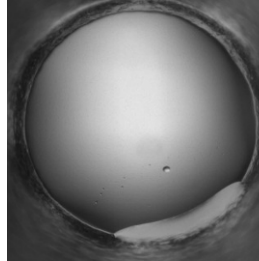
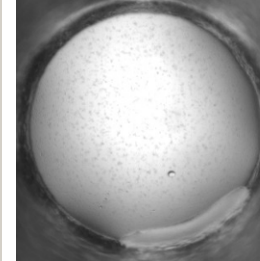
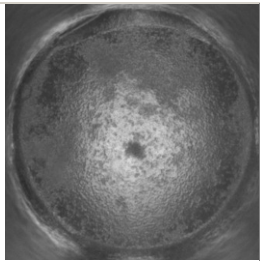
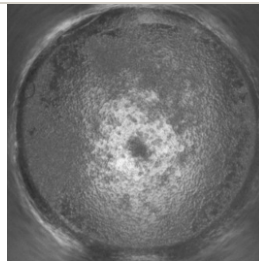
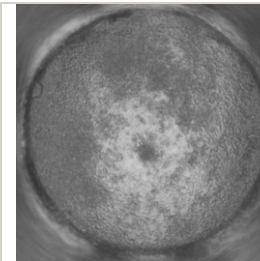
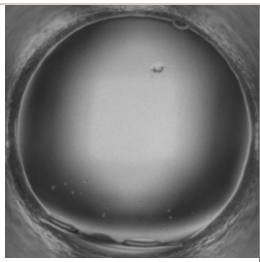
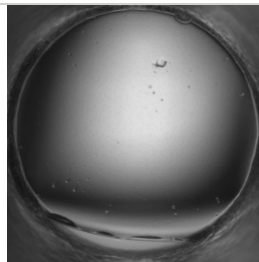
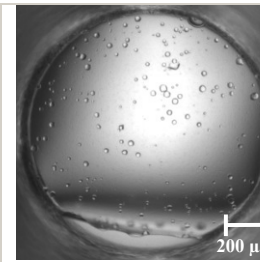
Aufreinigung	Bedingungen	Direkt nach Ansatz	Nach einer Woche	Nach zwei Wochen
a) FU-h mit V8-Protease (Abb. C28)	<u>Screening 1:</u> - 0,1 M K_2HPO_4 - 0,1 M Na-Citrat (pH 4) - 20 % (w/v) PEG 1000			
b) FU-h ohne V8-Protease	<u>Screening 2:</u> - 0,1 M K_2HPO_4 - 0,1 M Na-Citrat (pH 4) - 20 % (w/v) PEG 1000			
c) FU-h mit V8-Protease	<u>Screening 1:</u> - 0,1 M Zitronensäure (pH 5) - 5 % (w/v) PEG 6000			
d) FU-h ohne V8-Protease	<u>Screening 2:</u> - 0,1 M Zitronensäure (pH 5) - 5 % (w/v) PEG 6000			

Abb. C47: Vergleich der Kristallisationsbedingungen der aufgereinigten FU KLH1-h mit und ohne V8-Protease (durchgeführt am *Hauptman-Woodward Medical Research Institute*, Buffalo, USA).

a) Beim ersten *Screening* der proteasehaltigen Aufreinigung der FU-h zeigte sich in 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M Natrium-Citrat (pH 4), 20 % (w/v) PEG 1000 nach 2 Wochen eine Bildung von ~ 200 µm großen und hexagonalen Kristallen. b) Unter den gleichen Bedingungen kam es beim zweiten *Screening* der proteasefreien Aufreinigung, nach der gleichen Zeit, nur zu einer diffusen Niederschlagsbildung. c) Das erste *Screening* der proteasehaltigen FU-h resultierte in 0,1 M Zitronensäure (pH5), 5 % (w/v) PEG 6000 bereits unmittelbar nach dem Ansatz in einer starken Niederschlagsbildung. d) Die gleichen Bedingungen führten bei der proteasefreien Probe nach zwei Wochen hingegen zu einem Wachstum von Kristallen, die allerdings sehr klein und zahlreich waren. Bedingungen einer erfolgreichen Kristallisation sind blau markiert.

Wie bereits am *Institut für molekulare Biophysik* festgestellt, kam es auch am *HWI* unter den Bedingungen, die beim ersten *Screening* mit proteasehaltiger FU-h in einem Kristallwachstum resultierten (Abb. C47 a), bei der proteasefreien Aufreinigung des zweiten *Screenings*, nach zwei Wochen nur zu einer diffusen Niederschlagsbildung (Abb. C47 b). Allerdings zeigte sich unter geringfügig anderen Bedingungen, ebenfalls nach zwei Wochen, ein Kristallwachstum der FU-h-Probe ohne V8-Protease (Abb. C47 d). Bei der Probe mit proteolytischer Aktivität konnte unter diesen Bedingungen nur eine Präzipitation des Proteins beobachtet werden, die schon unmittelbar nach dem Ansatz eintrat (Abb. C47 c). Im Gegensatz zu den Kristallen der

proteasehaltigen Probe, waren die unter den neuen Bedingungen gewachsenen Kristalle jedoch sehr klein und zahlreich. Eine Größenzunahme konnte bis zur vierten Wochen ebenfalls nicht festgestellt werden, obwohl sie bezüglich ihrer Form den hexagonalen Kristallen der proteasehaltigen Probe ähnelten. Auch das farblose Erscheinungsbild war unter den immer noch sehr sauren und deoxygenierenden Bedingungen nach wie vor vorhanden. (Abb. C48).

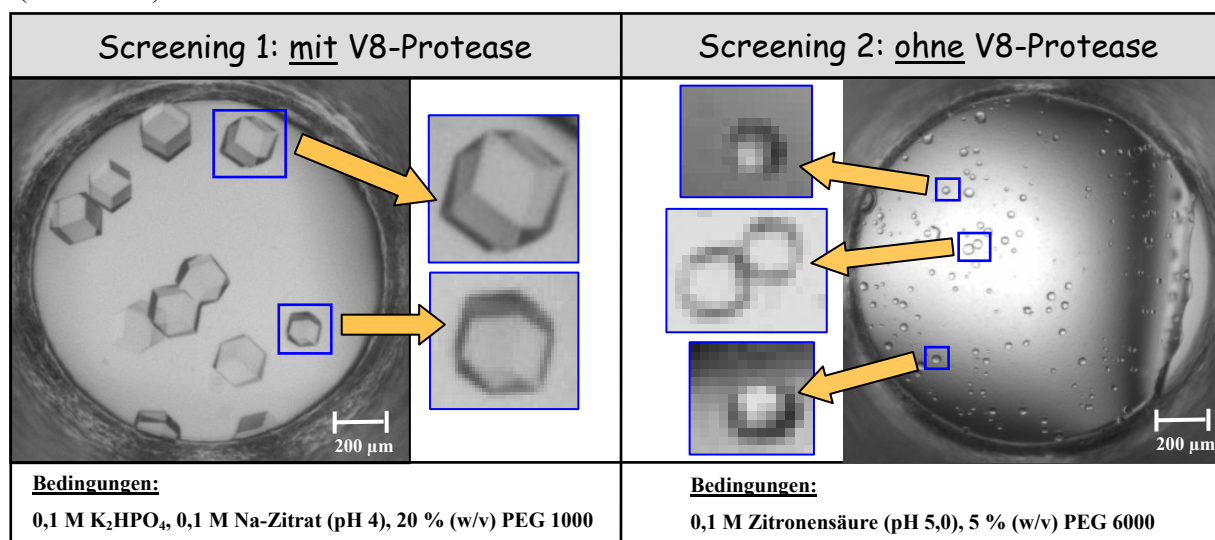


Abb. C48: Kristallisationen der FU-h mit und ohne V8-Protease (durchgeführt am *Hauptman-Woodward Medical Research Institute, Buffalo, USA*).

Sowohl das *Screening* der FU-h mit als auch ohne V8-Protease resultierte in einer Kristallisation des Proteins, allerdings unter verschiedenen Bedingungen. Auch wenn die Kristalle in beiden Ansätzen farblos waren und eine vergleichbare hexagonale Form aufwiesen, so kam es beim *Screening* der Probe ohne proteolytische Aktivität zu einem Wachstum von sehr vielen und sehr kleinen Kristallen. Ein weiteres Wachstum der Kristalle bis zur vierten Woche konnte im Gegensatz zum ersten *Screening* ebenfalls nicht beobachtet werden. Die ließ bereits auf ungeordnete Proteinstrukturen innerhalb des Kristalls schließen, die eine hohe Auflösung der Röntgenstruktur verhindern können.

Obwohl die Kristalle nur sehr klein waren, wurde mit einer neuen proteasenfremen Aufreinigung der FU-h, zunächst unter den bekannten Bedingungen des zweiten *Screenings* des *HWI*, eine Kristallisation am *Institut für molekulare Biophysik* wiederholt. Anschließend wurde durch Zugabe verschiedener Salze in geringer Konzentration (*Additiv ScreenTM*, Hampton Research, Journey, USA) versucht, eine Intensivierung der Proteinkontakte zu erzielen, um eventuell ein weiteres Wachstum der unter dem Binokular kaum sichtbaren Mikrokristalle zu erreichen. Dies gelang bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit jedoch ebenso wenig, wie durch weitere Variation der Kristallisationsbedingungen. Generell lässt die Ausbildung zahlreicher, kleiner Kristalle, die nicht weiter an Größe zunehmen, jedoch auf ungeordnete Proteinstrukturen innerhalb des Kristalls schließen, die eine hohe Auflösung der Röntgenstruktur verhindern können.

13 Enzymkinetische Charakterisierungen des KLH

Ziel des zweiten Projektes der vorliegenden Arbeit war die enzymkinetische Charakterisierung des KLH. Hierbei sollte untersucht werden, ob das Hämocyanin der großen Schlüssellochschncke *Megathura crenulata*, nach entsprechender Aktivierung, **Catecholoxidase-** oder sogar **Tyrosinase-Aktivität** zeigen kann. Hierzu wurden verschiedene mono- und diphenolische Substrate getestet (Kap. C13.1, Abb. C49). Weitere Aspekte waren die Detektion einer etwaigen intrinsichen Aktivität ohne Aktivatoren, sowie von Effektoren, die einen Einfluss auf die enzymatischen Umsatzraten ausüben können. Spezielles Augenmerk sollte auch auf die Bestimmung der enzymatisch aktiven, bzw. aktivierbaren einzelnen funktionelle Einheiten (FUs) der Untereinheiten beider Isoformen gelegt werden. Bisher konnte in zahlreichen Studien bereits eine proteolytische Aktivierung einiger Arthropoden- und teilweise auch Mollusken-Hämocyanine mittels Trypsin, Chymotrypsin oder Subtilisin erzielt werden (Decker & Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2001; Pless *et al.*, 2003; Jaenicke & Decker, 2004a, b; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006; Lee *et al.*, 2004; Olianias *et al.*, 2005; Nillius, 2007). Beim KLH resultierte der Einsatz dieser Proteasen jedoch in keiner Induktion oder Verstärkung intrinsischer Phenoloxidase-Aktivitäten (Daten nicht gezeigt). Zur Aktivierung wurde daher ein SDS-Assay verwendet, wie er seit vielen Jahren zum Nachweis und der Aktivierung von Phenoloxidasen und Hämocyaninen eingesetzt wird (Moore & Flurkey, 1990; Chazarra *et al.*, 1996; Jiménez & Garcia-Carmona, 1996; Nellaiappan & Sugumaran, 1996; Zlateva *et al.*, 1996; Van Gelder *et al.*, 1997; Salvato *et al.*, 1998; Espin *et al.*, 1999; Broothaerts *et al.*, 2000; Laveda *et al.*, 2000; Pless *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Jaenicke & Decker, 2004b; Decker *et al.*, 2001, 2007a, b; Nillius, 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass eine optimale Aktivierung von Hämocyaninen, durch Zugabe von mizellaren SDS-Konzentrationen erfolgt (Baird *et al.*, 2007). Die Phenoloxidase-Aktivität wird hierbei durch Konformationsänderungen ausgelöst, die einen Zugang des Substrats zum aktiven Kupferzentrum ermöglichen, ohne eine Denaturierung des Proteins zu induzieren. Qualitative und quantitative Aussagen bezüglich einer Phenoloxidase-Aktivität des KLH, erfolgten in dieser Arbeit anhand des von Pifferi und Baldassari (1973) eingeführten und von Winder und Harris (1991) sowie Jaenicke (2002) weiter entwickelten MBTH-Assays. Bei vorhandener Phenoloxidase-Aktivität kommt es zur Bildung eines violetten Reaktionsprodukts, welches sich sowohl qualitativ mittels nativer PAGE und *Crossed* IE, als auch quantitativ durch photometrische Messung des Absorptionsmaximums (λ_{\max}) bei etwa 505 nm (Rodríguez-López *et al.*, 1994; Espin *et al.*, 1997) nachweisen lässt und somit zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wurde.

13.1 Qualitative Untersuchungen zur Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der *nativen PAGE*

Zunächst wurde mittels nativer PAGE eine qualitative Untersuchung zur Monophenolase- (Tyrosinase, TY) und Diphenolase-Aktivität (Catecholoxidase, CO) der KLH-Untereinheiten sowie des zu diesem Zeitpunkt bereits in größeren Mengen aufgereinigten Tridomänen-Fragments KLH1-abc durchgeführt (Abb. C50). Als Substrate der CO-Reaktion kamen die Diphenole Catechol (1,2-Dihydroxybenzol), Dopamin (3,4-Dihydroxyphenethylamin) und L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) zum Einsatz, während eine TY-Reaktion durch Zugabe der Monophenole Tyramin (4-Hydroxyphenethylamin), 4-Methylphenol (*p*-cresol) und 4-*tert*-Butylphenol getestet wurde (Abb. C49). Catechol ist als strukturell primitivstes Diphenol aus einem einfach diphenolischen Benzolring ohne Seitenkette aufgebaut. L-DOPA, entsteht durch Carboxylierung der Ethylaminseitenkette des 1,2-Dihydroxybenzolrings des Dopamins und geht bei echten Tyrosinasen aus der enzymatischen Hydroxylierungsreaktion des L-Tyrosins hervor. Letzteres dient als natürliches Substrat der Tyrosinasen und wurde für den Test auf Monophenolase-Aktivität durch das strukturell verwandte Tyramin ersetzt, da es eine deutlich bessere Löslichkeit besitzt und somit vor allem Vorteile bezüglich des wiederholten Einsatzes gleicher Konzentrationen im MBTH-Assay bietet. Da Tyramin keine Carboxyl-gruppe besitzt, ähnelt es mit seinem Ethylaminrest auch dem Dopamin, welches als Diphenol allerdings eine zweite Hydroxylierung am aromatischen Ringsystem aufweist. Als strukturell primitivstes Monophenol kam 4-Methylphenol (*p*-cresol) zum Einsatz, welches anstelle des Ethylaminrestes des Tyramins nur eine einfache Methylgruppe am Monophenolring trägt. 4-*tert*-Butylphenol trägt als strukturell komplexeres Monophenol anstelle des einfachen Methylrestes des *p*-cresols einen *tert*-Butylrest.

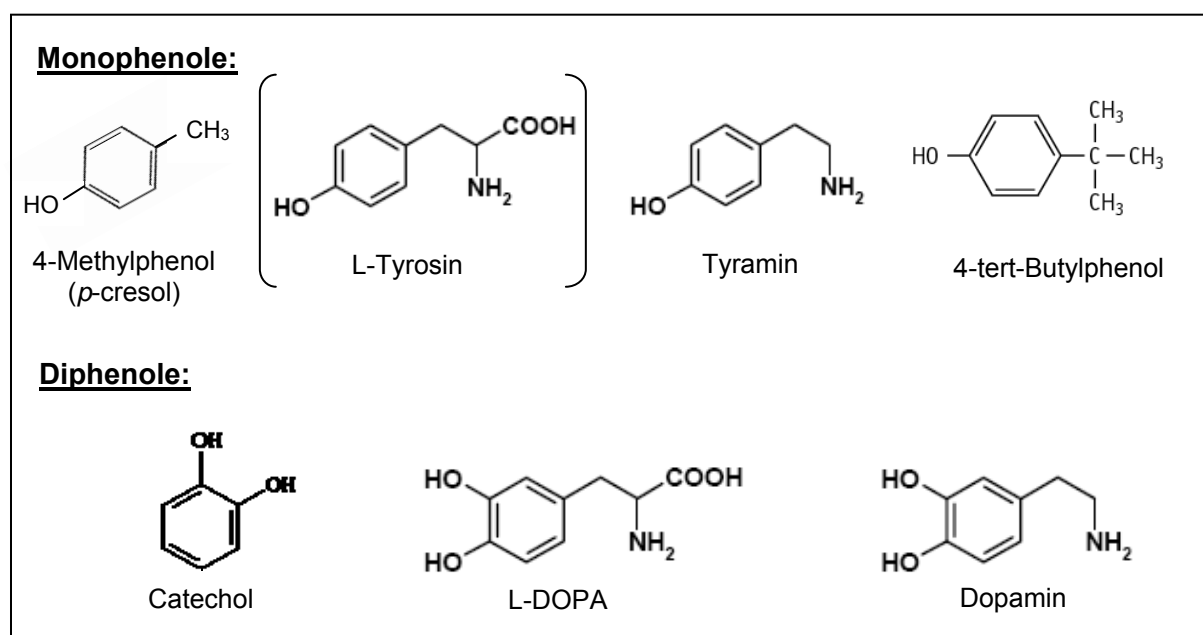


Abb. C49: Im MBTH-Assay eingesetzte mono- und diphenolische Substrate zum Nachweis etwaiger Mono- und Diphenolase-Aktivitäten des KLH.

Das in Klammern gesetzte L-Tyrosin wurde aus Löslichkeitsgründen für den Test auf Monophenolase-Aktivität durch das strukturell verwandte Tyramin ersetzt.

Der Nachweis einer eventuell vorhandenen Aktivität erfolgte nach SDS-Aktivierung der aufgetrennten Proteine im MBTH-Assay. Die Versuchsbedingungen sind in Tab. B5 (Kap. B4.8.3) und Tab. C2 zusammengefasst.

Substrat (3,2 mM)	Proteinmenge	Färbelösung	Inkubationszeit
Catechol	10 µg	- 62,5 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.
Dopamin	10 µg	- 62,5 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.
L-DOPA	10 µg	- 62,5 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.
4-Methylphenol	10 µg	- 62,5 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.
Tyramin	30 µg	- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	Ü.N.

Tab. C2: Versuchsbedingungen zur qualitativen Bestimmung der TY- und CO-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der nativen PAGE.

Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

Um einen Tyramin-Umsatz im nativen Gel nachzuweisen zu können, wurde die aufgetragene Proteinmenge auf 30 µg erhöht und die Gele über Nacht in der Aktivitäts-Färbelösung inkubiert. Zusätzlich kam zur Aktivitätssteigerung, anstelle des Phosphat-Puffers, ein Tris-Puffer mit MgCl₂ zum Einsatz, für den gezeigt werden konnte, dass dieser einen umsatzsteigernden Effekt hat (Kap. C13.6.1.) Beim 4-Methylphenol genügte eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 60 Minuten, um eine Färbung der Proteinbanden unter sonst regulären Versuchsbedingungen zu erzielen. Als Positivkontrolle diente eine echte Tyrosinase aus dem Champion *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Negativkontrollen erfolgten für jedes Substrat durch Zugabe von gleichen Volumina an *Aqua bidest.* anstelle des Aktivators. Coomassie-gefärbte Vergleichsgele ermöglichten die Zuordnung der enzymatischen Aktivitäten zu diskreten Proteinbanden.

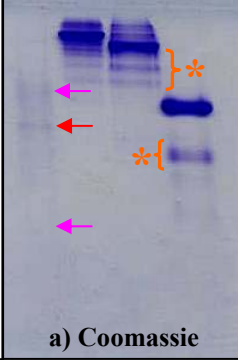
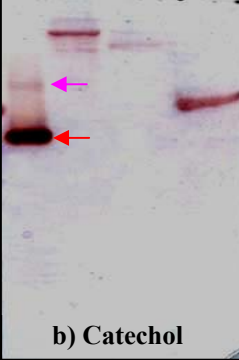
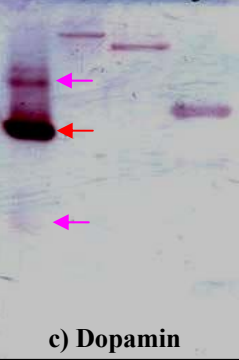
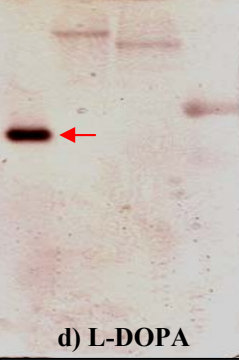
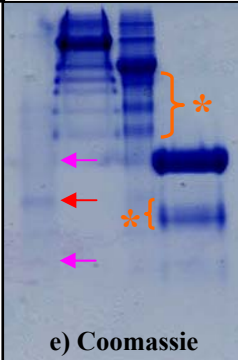
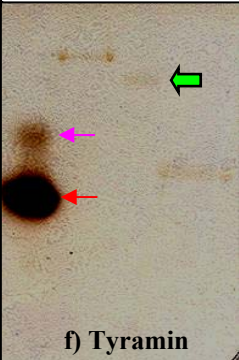
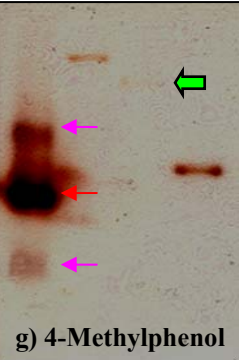
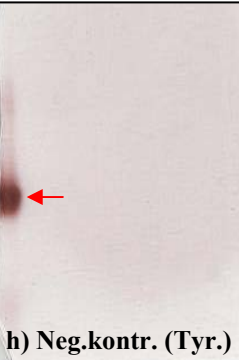
Protein	TY	UE1	UE2	K1-abc	TY	UE1	UE2	K1-abc	TY	UE1	UE2	K1-abc	TY	UE1	UE2	K1-abc
Aktivität	/	/	/	/	/	++++	++	++++	/	+++	+++	+++	/	++	++	++
Diphenolase (CO)																
	a) Coomassie				b) Catechol				c) Dopamin				d) L-DOPA			
	Protein				Protein				Protein				Protein			
	Aktivität				Aktivität				Aktivität				Aktivität			
Monophenolase (TY)																
	e) Coomassie				f) Tyramin				g) 4-Methylphenol				h) Neg.kontr. (Tyr.)			
	Protein				Protein				Protein				Protein			
	Aktivität				Aktivität				Aktivität				Aktivität			

Abb. C50: Qualitative Untersuchung zur CO- und TY-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der nativen PAGE.

Die Aktivitätsfärbung erfolgte mittels des MBTH-Assays nach Auftrennung von *A. bisporus*-Tyrosinase (TY, Positivkontrolle), KLH1-UE (UE1), KLH2-UE (UE2) und des Fragments KLH1-abc in der 7,5 %-igen nativen PAGE. Zur Untersuchung einer CO-Aktivität kamen die diphenolischen Substrate Catechol (b), Dopamin (c) und L-DOPA (d) zum Einsatz, während für den Test einer TY-Aktivität die monophenolischen Substrate Tyramin (f) und 4-Methylphenol (g) verwendet wurden. Die subjektive Intensität der Mono- und Diphenolase-Aktivitäten sind von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion der jeweiligen getesteten KLH-Proteine angegeben. Eine Coomassie-Färbung der Vergleichsgele (a, e) ermöglichte die Zuordnung enzymatischer Aktivitäten zu diskreten Proteinbanden. Die Negativkontrolle (h) mit *Aqua bidest.* anstelle des Aktivators SDS ist am Beispiel von Tyramin (Tyr.) für alle Substrate dargestellt. Hier zeigte erwartungsgemäß nur die echte Tyrosinase eine Reaktion. Rote Pfeile deuten auf eine diskrete Proteinbande, die bei allen Substraten Monophenolase- als auch Diphenolase-Aktivität zeigte, so dass es sich hierbei vermutlich um die heterotetramere Form des Enzyms (112 kDa) handelte. Eine Zuordnung der übrigen Banden (pinkfarbene Pfeile) zu bestimmten UE war nicht möglich. Grüne Pfeile in f) und g) weisen auf die schwach gefärbten Banden der KLH2-UE bei monophenolischen Substraten. Mit orangefarbenem Stern gekennzeichnete Banden deuten auf proteolytische Abbauprodukte. Bei f) und g) wurden die regulären Versuchsbedingungen abgeändert, um eine entsprechend positive Reaktion der KLH-Proteine im Gel zu erzielen (Tab. C2). Erläuterungen im Text.

Nach Durchführung des MBTH-Assays zeigte sich bei allen getesteten Substraten erwartungsgemäß bereits nach wenigen Minuten eine Färbung der Proteinbanden der heterotetrameren echten Tyrosinase aus dem Champion *Agaricus bisporus* (Positivkontrolle). In den Coomassie-gefärbten Vergleichsgelen war bei der Tyrosinase, aufgrund der geringen Auftragsmenge, nur eine diskrete (rote Pfeile) und zwei sehr schwache Banden (violette Pfeile) zu erkennen (Abb. C50 a, e). Frühere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass die Auftrennung der *A. bisporus*-Tyrosinase in der nativen PAGE bei entsprechender Auftragsmenge in vier diskreten Proteinbanden resultierte, von denen drei über Diphenolase- und nur

eine über Monophenolase-Aktivität verfügte (Dissertation Salzbrunn, 2007). Anhand der in dieser Arbeit nachgewiesenen Bandenfärbung konnte allerdings keine klare Zuweisung der verschiedenen Banden zu einer Mono- oder Diphenolase-Aktivität erfolgen. So färbten sich beim Catechol zwei, beim Dopamin zusätzlich eine sehr schwache dritte und beim L-DOPA hingegen nur eine Bande (Abb. C50 b – d). Beim Monophenol Tyramin zeigten ebenfalls zwei Banden eine positive Reaktion, während sich beim 4-Methylphenol auch die dritte schwache Bande anfärbte (C50 f, g). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei diesen Substraten eine deutlich längere Inkubationszeit vorlag, als bei den diphenolischen Substraten (Tab. C2), so dass die übrigen Banden dort bei ähnlich langen Einwirkzeiten vermutlich ebenfalls eine Reaktion angezeigt hätten. Allen Substraten gemeinsam war die starke Färbung einer diskreten Proteinbande (rote Pfeile in Abb. C50), wobei es sich vermutlich um die heterotetramere Form des Enzyms mit 112 kDa handelte (Strothkamp *et al.*, 1976). Eine Zuordnung der übrigen Proteinbanden zu diskreten Oligomerisierungszuständen oder Isoformen der Tyrosinase, war anhand dieser Daten nicht möglich. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass dieses Enzym oft gleichzeitig in aktiven und latenten Formen auftritt (Van Gelder *et al.*, 1997) und das verwendete Tyrosinasepräparat zudem inhomogen war. Auch für die in der nativen PAGE aufgetrennten KLH-UE und das Fragment KLH1-abc, lieferte der MBTH-Assay nach SDS-Aktivierung bereits nach 15 Minuten eine deutliche Farbreaktion der Proteinbanden mit dem Substrat Catechol, die bis zum Versuchsende nach 30 Minuten noch weiter voranschritt (Abb. C50 b). Die starke und schnelle enzymatische Umsetzung lässt sich darauf zurückführen, dass Catechol (1,2-Dihydroxybenzol), als strukturell primitivstes Diphenol, nur aus einem einfach diphenolischen Benzolring ohne Seitenkette aufgebaut ist. Das Substrat kann daher ohne sterische Hinderungen sehr einfach und schnell in das durch SDS-Aktivierung zugängliche aktive Zentrum eintreten und zum entsprechenden Dichinon umgewandelt werden. Am stärksten war die CO-Reaktion bei den KLH1-UE und dem Fragment KLH1-abc, während die Färbung der KLH2-UE etwas schwächer ausfiel (Abb. C50 b). Das diphenolische Substrat Dopamin lieferte nach 30 Minuten Inkubationszeit, bei allen getesteten Proben, eine vergleichbar intensive Färbung der entsprechenden Proteinbanden, wobei die Reaktion der KLH1-UE und des Fragments KLH1-abc insgesamt etwas schwächer war als beim Catechol (Abb. C50 c). Die letzte diphenolische Studie erfolgte anhand des dem Dopamin strukturell verwandten L-DOPA, welches jedoch eine zusätzliche Carboxylgruppe an der Ethylaminseitenkette des 1,2-Dihydroxybenzolrings trägt. Mit diesem Diphenol konnte die insgesamt schwächste CO-Reaktion beobachtet werden, wobei die Intensität der Bandenfärbung allerdings bei allen getesteten Proteinen einheitlich war (Abb. C50 d). Bei allen getesteten Diphenolen kam es nur zu einer Färbung der diskreten Proteinbanden und nicht der proteolytischen Abbauprodukte (orangefarbene Sterne in Abb. C50 a). Mit Tyramin konnte anhand des MBTH-Assays nach Inkubation über Nacht und in Tris-Puffer (Tab. C2) zwar nur eine schwache, aber dennoch deutlich sichtbare Färbung bei allen getesteten KLH-Proteinen beobachtet werden. Hierbei zeigten die KLH1-UE die stärkste und

die KLH2-UE die geringste Färbung (Abb. C50 f). Eine solche SDS-induzierte Monophenolase-Aktivität konnte bisher noch nicht für Gastropoden-Hämocyaninen nachgewiesen werden. Eine noch deutlich stärkere Monophenolase-Reaktion ergab sich bereits nach dreistündiger Inkubation in Phosphat-Puffer, mit dem strukturell primitiveren 4-Methylphenol. Hier reagierte das Fragment KLH1-abc sogar vergleichbar stark, wie bei diphenolischen Substraten. Die KLH1-UE lieferten eine etwas schwächere Farbreaktion, und bei den KLH2-UE war nur eine geringfügige, mit Tyramin vergleichbare Färbung zu erkennen (Abb. C50 g). Auch bei den getesteten Monophenolen war keine Reaktion der proteolytischen Abbauprodukte zu erkennen (Abb. C50 e). Das strukturell komplexer gebaute Monophenol 4-tert-Butylphenol wurde ebenfalls getestet, lieferte aber nach SDS-Aktivierung für keines der KLH-Proteine eine positive enzymatische Reaktion im nativen Gel (Daten nicht gezeigt). Um nachzuweisen, dass die sichtbaren Farbreaktionen des MBTH-Assays auf eine spezifische und SDS-induzierte Aktivierung der KLH-Proteine zurückzuführen war, wurde mit allen getesteten Substraten und Proteinen eine Negativkontrolle ohne Aktivator durchgeführt. Ein Substrat-Umsatz konnte hier entsprechend nur bei der echten Tyrosinase aus *A. bisporus* nachgewiesen werden (Abb. C50 h). Auch eine eventuell vorhandene Phenoloxidase-Aktivität anderer Hämolymphe-Proteine von *Megathura crenulata* konnte nach Durchführung des MBTH-Assays sowohl in der nativen PAGE, als auch mittels *Dot Blot* ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt), so dass die beobachteten Farbreaktionen alleine das Resultat der aktivierten KLH-Proteine war.

13.2 Qualitative Untersuchungen zur Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der *Crossed Immunelektrophorese*

Im Kap. C13.1 konnte bereits mittels nativer PAGE der qualitative Nachweis einer SDS-induzierten CO- und TY-Aktivität der KLH-UE sowie des Fragments KLH1-abc erbracht werden. Der nächste Schritt bestand darin, die für die enzymatischen Umsetzungen verantwortlich FUs beider Isoformen aufzuzeigen. Hierbei kam die *Crossed* Immunelektrophorese (IE) zum Einsatz, anhand derer sich die einzelnen FUs, nach limitierter proteolytischer Spaltung der UE mit Elastase, mittels isoformspezifischer Anti-KLH-Antikörper immunologisch darstellen lassen. Der enzymatische Nachweis erfolgte auch hier mittels des MBTH-Assays (Tab. B5, Kap. B4.8.3) nach 30-minütiger Inkubation mit verschiedenen mono- und diphenolischen Substraten, die hierfür bereits bei Decker & Rimke (1998) erfolgreich eingesetzt wurden. Da die Zugabe von Proteasen wie Trypsin oder Subtilisin im Gegensatz zu anderen Hämocyaninen (Decker & Rimke, 1998; Jaenicke & Decker, 2004a, b; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006) auch in der *Crossed* IE in keiner sichtbaren enzymatischen Aktivität der verschiedenen KLH-Proteine resultierte (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Aktivierung wie bereits bei der nativen PAGE ausschließlich mittels des Detergenz SDS. Bei monophenolischen Substraten wurde anstelle des Phosphat-Puffers teilweise Tris-Puffer mit $MgCl_2$ zur Aktivitätsverstärkung verwendet, und die Inkubation

erfolgte für 60 Minuten oder auch über Nacht bei 4 °C. Die verschiedenen Bedingungen sowie die Stärke der jeweiligen enzymatischen Reaktionen sind in den entsprechenden Abbildungen angegeben.

13.2.1 Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Catechol

Als erstes wurde die enzymatische Umsetzung des strukturell primitivsten Diphenols Catechol (1,2-Dihydroxybenzol) nach SDS-Aktivierung untersucht. Der MBTH-Assay (Tab. B5, Kap. B4.8.3) wurde hierzu u.a. anhand der immunologisch präzipitierten KLH-UE, den durch Elastase in einzelne FUs gespaltenen UE beider Isoformen und den aufgereinigten Fragmenten KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg durchgeführt (Abb. C51). Um die Aktivitäten bestimmten Proteinen zuordnen zu können, erfolgte parallel eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel.

Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	++++
b)	KLH2-UE			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	+++
c)	KLH1-Elastase			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	a: +++ b: - c: - d: - e: - f: - g: - h: -
d)	KLH2-Elastase			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	a: + b: - c: - d: - e: - f: ++ g: - h: -
e)	KLH1-abc			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	++++
f)	KLH2-abc			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	+++
g)	KLH2-fg			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min	+++

Abb. C51: Catechol-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der Crossed IE.

Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Diphenolase-Aktivitäten der KLH-UE (a, b), einzelner FUs (c, d) sowie der Fragmente KLH1-abc (e), KLH2-abc (f) und KLH2-fg (g) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Der MBTH-Assay erfolgte nach SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed IE*. Als diphenolisches Substrat diente Catechol. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Der MBTH-Assay lieferte, wie bereits in der nativen PAGE (Kap. C13.1), für das Diphenol Catechol schon nach 15 Min. eine stark positive Reaktion für die UE beider Isoformen (Abb. C51 a, b). Die präzipitierten FUs der Elastasespaltungen zeigten hingegen nur für die FUs KLH1-a und -ab sowie KLH2-a, -ab, -abc und -f eine Bildung des MBTH-Produkts an (Abb. C51, c, d). Die FU KLH2-a zeigte hierbei die schwächste Violettfärbung. Da die FU KLH1-b der KLH1-Elastasespaltung keine enzymatische Reaktion anzeigte, konnte nur die FU-a für die Bildung des MBTH-Produkts durch den Präzipitationsgipfel des Fragments KLH1-ab verantwortlich gewesen sein (Abb. C51c). Das Gleiche galt für die unterhalb der FU KLH2-f präzipitierten FUs KLH2-ab und -abc (Abb. C51 d). Dass sich die FUs-b und -c beider Isoformen nicht mittels SDS zu einer Umsetzung des Catechols aktivieren ließen, konnte zusätzlich durch einen MBTH-Assay der mittels *Crossed* IE immunologisch präzipitierten und aufgereinigten (Kap. C4.1 und C6.1) FUs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um die Ergebnisse der enzymatisch aktivierbaren FUs zusätzlich zu verifizieren, wurden die isolierten Fragmente KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg (Kap. C4.2, C4.3 und C6.2) ebenfalls mittels *Crossed* IE präzipitiert und im MBTH-Assay auf Catechol-Umsatz untersucht. Alle Fragmente lieferten auch hier eine positive Reaktion (Abb. C50 e - g), wobei entsprechend der positiven FUs der mit Elastase gespaltenen UE (Abb. C51 c, d) jeweils nur die FUs KLH1-a bzw. KLH2-a und -f an der katalytischen Umsetzung des Catechols beteiligt gewesen sein sollten. Eine Aktivität der FU-g konnte ebenfalls durch einen Test mit der isolierten FU (Kap. C4.3) ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Im Allgemeinen war die Intensität der Färbung bei den Proteinen des KLH2 etwas schwächer als bei denen des KLH1. Dies entsprach somit den Beobachtungen der nativen PAGE, wo bereits eine schwächere Umsetzung für die KLH2-UE beobachtet wurde (Abb. C50 b).

13.2.2 Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols *Dopamin*

Die Untersuchung zur SDS-induzierten Umsetzung des Diphenols Dopamin erfolgte ebenfalls im MBTH-Assay (Tab. B5, Kap. B4.8.3) u.a. anhand der mittels *Crossed* IE aufgetrennten KLH-UE, den FUs der Elastasespaltungen sowie den Fragmenten KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg (Abb. C52). Um die Aktivitäten bestimmten Proteinen zuordnen zu können, erfolgte parallel eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel.

Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	+++
b)	KLH2-UE			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	++
c)	KLH1-Elastase			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	a: +++ b: - c: - d: - e: ++ f: - g: - h: -
d)	KLH2-Elastase			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	a: +++ b: - c: - d: - e: - f: ++ g: - h: +
e)	KLH1-abc			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	+++
f)	KLH2-abc			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	+++
g)	KLH2-fg			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Dopamin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	++

Abb. C52: Dopamin-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der Crossed IE. Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Diphenolase-Aktivitäten der KLH-UE (a, b), einzelner FUs (c, d) sowie der Fragmente KLH1-abc (e), KLH2-abc (f) und KLH2-fg (g) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Grün markierte FUs in c) deuten auf scheinbar aktive Präzipitationsgipfel, deren Färbung aus einer Überlagerung aktiver FUs entstand. Der MBTH-Assay erfolgte nach SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed IE*. Als diphenolisches Substrat diente Dopamin. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Wie zuvor beim Catechol (Abb. C51), konnte anhand des MBTH-Assays auch für das diphenolische Dopamin eine positive Reaktion für die UE beider Isoformen nachgewiesen werden, wobei die Färbung der KLH1-UE etwas intensiver war (Abb. C52 a, b). Bei den mittels Elastase gespaltenen KLH1-UE zeigten die FUs-a, -e sowie das Fragment KLH1-ab eine enzymatische Umsetzung an (Abb. C52 c). Da sich für die FU KLH1-b sowohl im MBTH-Assay der Elastase-gespaltenen KLH1-UE, als auch mit der isolierten FU-b (Daten nicht gezeigt) keine Reaktion ergab, konnte die Färbung des ab-Fragments alleine auf die Aktivität der FU KLH1-a zurückgeführt werden. Eine weitere zunächst sichtbare enzymatische Aktivität der FUs KLH1-c, -f und -h (grüne Pfeile in Abb. C52 c), konnte zum Teil durch weitere Tests mit den isolierten FUs KLH1-c und -h (Kap. C6.1 und C6.2) ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Zudem waren bei diesen FUs nur die Schenkel unmittelbar unterhalb der enzymatisch aktiven FUs KLH1-a und -e gefärbt, so dass man hier von einer Überlagerung des gebildeten violetten Pigments der weiter oberhalb präzipitierten positiven Gipfel ausgehen konnte. Bei den Elastase-gespaltenen FUs der KLH2-UE kam es zu einer enzymatischen Umsetzung des Dopamins durch die FUs KLH2-a, -ab, -abc sowie KLH2-f und -h, wobei die stärkste Färbung bei der FU-a festgestellt wurde (Abb. C52 d). Da sowohl im MBTH-Assay der isolierten FUs KLH2-b und -c (Kap. C4.1), als auch bei den entsprechenden FUs der Elastasespaltung (Abb. C52 d) keine enzymatische Reaktion nachgewiesen werden konnte, war auch hier alleine die FU KLH2-a für die Catecholase-Aktivität der Fragmente KLH2-ab und -abc verantwortlich. Die Ergebnisse der enzymatisch aktivierbaren FUs wurden schließlich mittels der isolierten Fragmente KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg (Kap. C4.2, C4.3 und C6.2) weiter verifiziert. Alle Fragmente lieferten auch hier eine positive Reaktion im MBTH-Assay (Abb. C52 e - g), wobei gemäß der vorherigen Versuche jeweils nur die FUs KLH1-a bzw. KLH2-a und -f an der katalytischen Umsetzung des Dopamins beteiligt gewesen sein sollten. Eine Aktivität der FU-g konnte ebenfalls durch einen Test mit der isolierten FU (Kap. C4.3) ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Catechol, schien beim Dopamin die Aktivität der Proteine des KLH1 etwas stärker zu sein als bei den Proteinen des KLH2.

13.2.3 Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols *L-DOPA*

Die letzte qualitative, diphenolische Untersuchung erfolgte anhand des dem Dopamin strukturell verwandten *L-DOPA*. Dieses Substrat lässt sich durch Carboxylierung der Ethylaminseitenkette des 1,2-Dihydroxybenzolrings bilden und geht bei echten Tyrosinasen aus der enzymatischen Hydroxylierung des *L-Tyrosins* hervor. Auch hier wurden die mittels *Crossed IE* immunologisch präzipitierten KLH-UE, die FUs der Elastasespaltungen sowie die Fragmente KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg im MBTH-Assay (Tab. B5, Kap. B4.8.3) bezüglich einer enzymatischen Umsetzung des Substrats nach SDS-Aktivierung untersucht (Abb. C53). Eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel ermöglichte eine Zuordnung der katalytischen Aktivitäten zu bestimmten Proteinen.

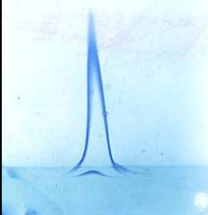

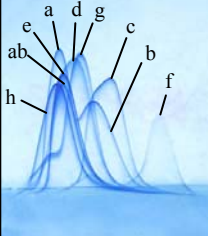
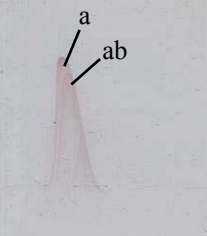
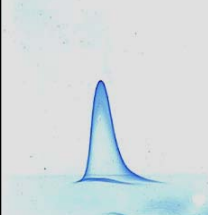

Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM L-DOPA - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min..	++
b)	KLH1-Elastase			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM L-DOPA - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	a: ++ b: - c: - d: - e: - f: - g: - h: -
c)	KLH1-abc			- 62 mM Natriumphosphat, pH 7,0 - 3,2 mM L-DOPA - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	30 Min.	++

Abb. C53: L-DOPA-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der *Crossed IE*. Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Diphenolase-Aktivitäten der KLH1-UE (a), einzelner FUs der KLH1-UE (b) sowie des Fragments KLH1-abc (c) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Der MBTH-Assay erfolgte nach SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed IE*. Als diphenolisches Substrat diente L-DOPA. Für die Proteine des KLH2 konnte mittels *Crossed IE* kein L-DOPA-Umsatz nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Nach Durchführung der *Crossed IE* konnte der MBTH-Assay nur für Proteine des KLH1 eine Umsetzung des Substrats L-DOPA anzeigen (Abb. C53). Bei den KLH2-UE, deren einzelnen FUs der Elastasespaltung sowie den aufgereinigten Fragmenten KLH2-abc und -fg, resultierte selbst eine Inkubation über Nacht in keiner sichtbaren Färbung der Präzipitationsgipfel (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte bei den KLH1-UE nach SDS-Aktivierung eindeutig eine Umsetzung des L-DOPA nachgewiesen werden (Abb. C53 a). Bei den Elastasegespaltenen KLH1-UE ergab sich in der *Crossed IE* jedoch nur bei den FUs KLH1-a und -ab eine sichtbare Bildung des violetten MBTH-Produkts (Abb. C53 c). Eine Beteiligung der FU KLH1-b an der positiven Reaktion des ab-Fragments konnte durch vergleichende Studien anhand der aufgereinigten FU-b (Daten nicht gezeigt) ebenso ausgeschlossen werden, wie durch eine nicht sichtbare Färbung des Präzipitationsgipfels der FU-b der Elastasegespaltenen KLH1-UE (Abb. C 53 b). Eine weitere Bestätigung der katalytischen Aktivität der FU KLH1-a konnte durch eine verhältnismäßig starke Färbung des aufgereinigten Fragments KLH1-abc erzielt werden (Abb. C53c). Auch hier konnte entsprechend bei der isolierten FU KLH1-c (Kap. C6.1) keine Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Allgemein ergab sich mit dem Diphenol L-DOPA bei den aktivierbaren Proteinen ein deutlich langsamerer und auch etwas schwächerer Umsatz, als beim Catechol (Abb. C51) und Dopamin (Abb. C51). Die Ursachen hierfür sollten in der komplexeren Struktur des L-DOPA

begründet liegen. Im Vergleich zum Catechol besitzt dieses eine zusätzliche Ethylaminseitenkette, die im Gegensatz zum Dopamin noch zusätzlich carboxyliert ist. Ein Substratzugang zum aktiven Zentrum wird vermutlich erst nach längerer SDS-Inkubation und daraus resultierender weiterer Proteinfaltung ermöglicht.

13.2.4 Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols Tyramin

Nachdem in den vorherigen Kapiteln C13.2.1 – 13.2.3 mittels *Crossed* IE gezeigt werden konnte, welche FUs nach SDS-Applikation zu einer Catecholase-/Diphenolase-Reaktion befähigt sind, sollten die gleichen Untersuchungen nachfolgend auch für die bereits in der nativen PAGE beobachtete Tyrosinase-/Monophenolase-Aktivität des KLH durchgeführt werden (Abb. C50, Kap. C13.1). Aus Löslichkeitsgründen erfolgte der MBTH-Assay (Tab. B5, Kap. B4.8.3) nicht anhand des natürlichen Tyrosinase-Substrats L-Tyrosin, sondern mit dem strukturell verwandten Tyramin. Aufgrund der fehlenden Carboxylgruppe ähnelt dieses Monophenol bezüglich des Ethylaminseitenrestes jedoch auch dem diphenolischen Dopamin. Die Untersuchungen zur SDS-induzierten Umsetzung des Tyramins erfolgten zur Aktivitätsverstärkung teilweise in Tris-Puffer mit $MgCl_2$ und nach Inkubation der Immungele über Nacht. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind entsprechend in der Abbildung angegeben. Bei den mittels *Crossed* IE aufgetrennten KLH-Proteinen handelte es sich u.a. um die KLH-UE, den FUs der Elastasespaltungen sowie den Fragmenten KLH1-abc und KLH2-fg (Abb. C54). Eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel ermöglichte eine Zuordnung der katalytischen Aktivitäten zu bestimmten Proteinen.

Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	ü.N.	++
b)	KLH2-UE			- 62 mM Natrium- phosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	+
c)	KLH1- Elastase			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	ü.N.	a: ++ b: - c: - d: - e: - f: - g: - h: -
d)	KLH2- Elastase			- 62 mM Natrium- phosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	a: - b: - c: - d: - e: - f: ++ g: - h: -
e)	KLH1-abc			- 62 mM Natrium- phosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	++
f)	KLH2-fg			- 62 mM Natrium- phosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Tyramin - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	++

Abb. C54: Tyramin-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der Crossed IE.

Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Monophenolase-Aktivitäten der KLH-UE (a, b), einzelner FUs (c, d) sowie der Fragmente KLH1-abc (e) und KLH2-fg (f) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Der MBTH-Assay erfolgte nach SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed IE*. Als monophenolisches Substrat diente das dem L-Tyrosin strukturell verwandte Tyramin. Abweichende Bedingungen zur Aktivitätssteigerung sind blau markiert. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Mit dem Monophenol Tyramin lieferte der MBTH-Assay für die immunologisch präzipitierten UE beider Isoformen nach SDS-Aktivierung eine positive Tyrosinase-Reaktion. Im Allgemeinen war die Färbung bei den KLH2-UE deutlich stärker als bei den KLH1-UE (Daten nicht gezeigt). Durch Inkubation der präzipitierten KLH1-UE über Nacht in Tris-

Puffer mit $MgCl_2$, konnte dieses Verhältnis jedoch umgekehrt werden (Abb. C54 a, b). Die Durchführung einer *Crossed* IE der Elastase-gespaltenen KLH1-UE zeigte im MBTH-Assay, nach Inkubation des Immungels in Tris-Puffer über Nacht, eine katalytische Umsetzung des Tyramins durch die FUs KLH1-a und -ab an (Abb. C54 c). Eine Monophenolase-Aktivität der FU KLH1-b konnte aufgrund nicht sichtbaren Färbung des Präzipitationsgipfels der FU-b der Elastase-gespaltenen KLH1-UE sowie durch vergleichende Studien mit der aufgereinigten FU-b ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Demnach war alleine die FU KLH1-a für die Färbung des ab-Fragments verantwortlich (Abb. C54 c). Für die Elastase-gespaltenen KLH2-UE konnte eine intensive Violettfärbung der FU KLH2-f beobachtet werden, die bereits nach 60 Minuten und unter herkömmlichen Bedingungen in Phosphat-Puffer auftrat (Abb. C54 d). Die Ergebnisse wurden durch weitere Studien verifiziert, so dass sich mit den isolierten Fragmenten KLH1-abc und KLH2-fg ebenfalls ein Tyramin-Umsatz ergab (Abb. C54 e, f). Ein Beitrag der FUs- KLH1-c und KLH2-g an der katalytischen Aktivität dieser Fragmente konnte auch hier durch einen zusätzlichen MBTH-Assay der beiden isolierten FUs (Kap. C6.1 und C4.3) ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Wie bereits bei der nativen PAGE festgestellt wurde (Kap. C13.1), waren die Mono-phenolase-Aktivitäten auch in der *Crossed* IE deutlich schwächer als die Diphenolase-Reaktionen und resultierten erst nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde in einer sichtbaren Färbereaktion der entsprechende Präzipitationsgipfel. Letzteres lässt sich hierbei auf die bei der Umsetzung von Monophenolen kinetisch feststellbare *Lagphase* zurückführen (Lerner *et al.*, 1949; Cabanes *et al.*, 1987; Cooksey *et al.*, 1997), dessen Ursache wiederum im molekularen Mechanismus der Tyrosinase-Reaktion und der Bildung des sogenannten "dead end"-Komplexes begründet liegt (Kap. A6). Es kann somit festgehalten werden, dass durch eine SDS-Aktivierung der qualitative Nachweis einer schwachen Tyrosinase-Aktivität einiger KLH-Proteine erbracht werden konnte, der sich im MBTH-Assay durch eine Anfärbung der entsprechenden Präzipitationsgipfel in der *Crossed* IE darstellte. Durch längere Inkubationszeiten sowie dem Einsatz von Tris-Puffer mit $MgCl_2$, konnte die Monophenolase-Aktivität entsprechend weiter verstärkt werden.

13.2.5 Qualitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols **4-Methylphenol**

Die letzten qualitativen Studien zur Monophenolase-Aktivität erfolgten anhand des strukturell einfach aufgebauten 4-Methylphenols (*p*-cresol), welches anstelle der Ethylaminseitenkette des Tyramins nur einen Methylrest in *Para*-Stellung am einfach hydroxylierten Benzolring trägt. Die Untersuchungen zur SDS-induzierten Umsetzung des Tyramins erfolgten zur Aktivitätsverstärkung alle in Tris-Puffer mit $MgCl_2$ und nach Inkubation der Immungel für 60 Minuten. Bei den mittels *Crossed* IE aufgetrennten KLH-Proteinen handelte es sich u.a. um die KLH-UE und die FUs der Elastasespaltungen beider Isoformen (Abb. C55). Eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel ermöglichte eine Zuordnung der katalytischen Aktivitäten zu bestimmten Proteinen.

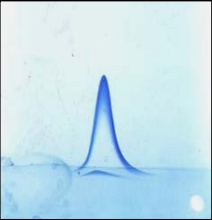
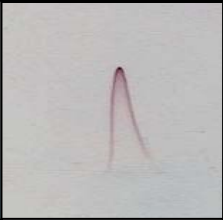
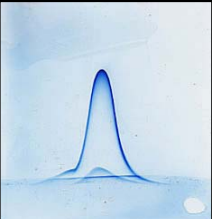
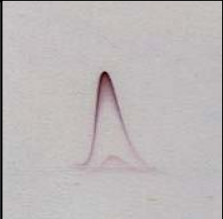
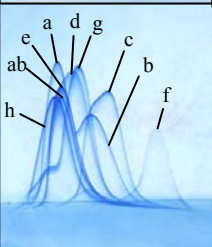
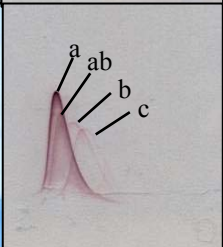
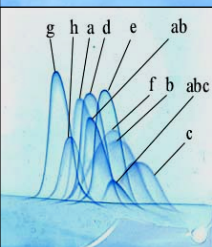
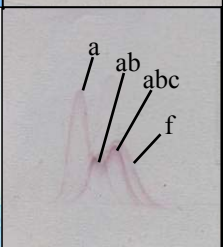
Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	++
b)	KLH2-UE			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	++
c)	KLH1-Elastase			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	a: +++ b: + c: + d: - e: - f: - g: - h: -
d)	KLH2-Elastase			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - 23 mM SDS	60 Min.	a: + b: - c: - d: - e: - f: + g: - h: -

Abb. C55: *p*-cresol-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der Crossed IE. Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Monophenolase-Aktivitäten der KLH-UE (a, b) und einzelner FUs beider Isoformen (c, d) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Der MBTH-Assay erfolgte nach SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed IE*. Als monophenolisches Substrat diente 4-Methylphenol (*p*-cresol). Abweichende Bedingungen zur Aktivitätssteigerung sind blau markiert. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Für das strukturell einfach aufgebaute 4-Methylphenol zeigte sich im MBTH-Assay eine starke SDS-induzierte Monophenolase-Aktivität bei den UE beider KLH-Isoformen (Abb. C55 a, b). Nach immunologischer Präzipitation der einzelnen FUs der KLH1-Elastasespaltung konnte eine katalytische Aktivität der FUs KLH1-a, -ab, -b und c nachgewiesen werden (Abb. C55 c). Auch wenn die Intensität der Violett-färbung der FUs -b und -c deutlich schwächer war, als bei der FU-a, schienen diese in Tris-Puffer mit MgCl₂ dennoch aktivierbar zu sein, und die FU KLH1-b lieferte eine Beitrag zur Färbung des Fragments KLH1-ab. Die Wahl des Puffers könnte zwar eventuell zur gesteigerten Aktivität der FUs KLH1-b und -c beigetragen haben, allerdings konnte eine solche Beobachtung mit Tyramin im gleichen Puffer nicht gemacht werden (Abb. C54 c). Bei den FUs der KLH2-Elastasespaltung ergab sich ebenfalls eine Monophenolase-Reaktion bei den FUs KLH2-a, -ab sowie bei den FUs KLH2-abc und -f (Abb. C55 d). Letztere zeigte bereits ein starke Färbung mit dem Substrat Tyramin an (Abb. C54 d). Da der MBTH-Assay der Elastase-Spaltprodukte für die FUs

KLH2-b und -c allerdings keine Aktivität lieferte (Abb. C55 d) und auch ein Test mit den isolierten FUs in keiner Bildung des MBTH-Produkts resultierte (Daten nicht gezeigt), konnte eine Beteiligung dieser FUs an der Färbung der Fragmente KLH2-ab und -abc ausgeschlossen werden. Somit ließ sich die bereits schwache Monophenolase-Aktivität der KLH-Proteine mit Tyramin (Abb. C54) durch die Wahl eines strukturell einfacher aufgebauten Monophenols deutlich steigern. Durch den Einsatz von Tris-Puffer mit $MgCl_2$ konnte die Inkubationszeit bei allen getesteten KLH-Proteinen zudem auf 60 Minuten verkürzt werden. Eine Umsetzung des strukturell sehr komplex aufgebauten Monophenols 4-tert-Butylphenol konnte jedoch unter diesen Bedingung für keines der getesteten Proteine erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

13.3 Qualitative Untersuchungen zur intrinsischen Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH in der *Crossed Immunelektrophorese*

In früheren Studien konnte für die Hämocyanine von *Helix pomatia* (HpH) und *Sepia officinalis* (SoH) bereits anhand des Substrats Catechols eine schwache intrinsische Diphenolase-Aktivität nachgewiesen werden (Siddiqui *et al.*, 2004, 2006). Um eine solche enzymatische Aktivität eventuell auch beim KLH ohne Zusatz des Aktivators SDS aufzuzeigen, wurde ein MBTH-Assay mit KLH-Proteinen und Substraten durchgeführt (Abb. C56), bei denen sich bereits in den vorherigen SDS-induzierten Untersuchungen eine subjektiv besonders intensive Färbung ergab. So zeigte sich nach SDS-Aktivierung sowohl in der nativen PAGE, als auch der *Crossed* IE, die größte subjektive Diphenolase-Aktivität mit dem strukturell einfach aufgebauten Catechol bei dem aufgereinigten Fragment KLH1-abc (Kap. C13.1, Abb.C50 b und Kap. C13.2.1, Abb. C51 e). Für den Nachweis einer etwaigen intrinsischen Monophenolase-Aktivität des KLH wurde 4-Methylphenol (*p*-cresol) verwendet, da die Tyrosinase-Aktivitäten der KLH-Proteine mit dem strukturell komplexeren Tyramin selbst nach SDS-Aktivierung nur sehr schwach waren (Abb. C54). Als KLH-Proteine kamen die UE sowie die einzelnen FUs der Elastasespaltungen beider Isoformen zum Einsatz. Da auf die Zugabe des Aktivators verzichtet wurde, erfolgten die Untersuchungen zur Monophenol-Umsetzung zur Aktivitätsverstärkung in Tris-Puffer mit $MgCl_2$. Zusätzlich wurden die Immungele bei allen Substraten über Nacht bei 4°C in der Färbelösung inkubiert. Eine Coomassie-Färbung der Präzipitationsgipfel ermöglichte eine Zuordnung der intrinsischen katalytischen Aktivitäten zu bestimmten Proteinen.

Abb.	Proteine	Coomassie	MBTH	Färbelösung	Inkub.zeit	Aktivität
a)	KLH1-UE			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - kein SDS	ü.N.	++
			4-Methylphenol			
b)	KLH2-UE			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - kein SDS	ü.N.	++
			4-Methylphenol			
c)	KLH1-Elastase			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - kein SDS	ü.N.	a: ++ b: + c: + d: - e: - f: - g: - h: -
			4-Methylphenol			
d)	KLH2-Elastase			- 78 mM Tris, 15 mM MgCl ₂ , pH 7,0 - 3,2 mM <i>p</i> -cresol - 450 µm MBTH - kein SDS	ü.N.	a: ++ b: + c: + d: + e: + f: + g: + h: +
			4-Methylphenol			
e)	KLH1-abc			- 62 mM Natrium- phosphat, pH 7,0 - 3,2 mM Catechol - 450 µm MBTH - kein SDS	ü.N.	+
			Catechol			

Abb. C56: Intrinsische Umsetzung von Mono- und Diphenolen durch verschiedene KLH-Proteine ohne SDS-Aktivierung in der *Crossed* IE.

Neben den jeweiligen Versuchsbedingungen (Färbelösung, Inkubationszeit) sind die subjektiven Monophenolase-Aktivitäten der KLH-UE (a, b), einzelner FUs beider Isoformen (c, d) sowie des Fragments KLH1-abc (e) von „+“ bis „++++“ bei einer positiven oder „-“ bei einer negativen Farbreaktion angegeben. Der MBTH-Assay erfolgte ohne SDS-Aktivierung der immunologisch präzipitierten Proteine mittels *Crossed* IE. Als Substrat diente das monophenolische 4-Methylphenol (a - e) sowie das diphenolische Catechol (e). Abweichende Bedingungen sind blau markiert. Die Identifizierung der Gipfel erfolgte gemäß den Abbildungen in Harris & Markl, 1999. Erläuterungen im Text.

Anhand des MBTH-Assay ohne Aktivator konnte eindeutig eine intrinsische Monophenolase-Aktivität der KLH-UE beider Isoformen mit dem Substrat 4-Methylphenol nachgewiesen werden (Abb. C56 a – b). Für die einzelnen FUs der mit Elastase gespaltenen KLH1-UE zeigte sich eine intrinsische Monophenolase-Aktivität für die FUs KLH1-a, -ab, -b und -c, was somit den Ergebnissen der SDS-Aktivierung entsprach (Abb. C56 c und Kap. C13.2.5, Abb. C55 c). Auch bezüglich der Farbintensität waren die Präzipitationsgipfel durchaus mit denen des MBTH-Assays mit SDS-Aktivierung vergleichbar (Abb. C56 a – c und Kap.

C13.2.5, Abb. C55 a – c). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Inkubation bei den Proteinen ohne Aktivator über Nacht erfolgte, während die volle enzymatische Aktivität durch Zugabe von SDS bereits nach einer Stunde erreicht wurde. Ein aktivitätssteigernder Tris-Puffer mit $MgCl_2$ wurde jedoch bei beiden Ansätzen eingesetzt. Die *Crossed* IE der Elastase-gespaltenen KLH2-UE lieferte im MBTH-Assay hingegen ein anderes Bild als nach SDS-Aktivierung. Hier zeigte sich nach Inkubation über Nacht eine intrinsische Aktivität aller FUs der UE (Abb. C56 d), während eine SDS-Applikation nach einer Stunde Inkubationszeit nur in einer Aktivierung der FUs KLH2-a und –f resultierte (Kap. C13.2.5, Abb. C55 d). Allerdings konnte auch hier eine stärkere intrinsische Aktivität bei der FU-a festgestellt werden, da es zu einer intensiveren Violettfärbung der FUs KLH2-a, -ab- und –abc kam (Abb. C56 d). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass entsprechend längere Inkubationszeiten beim Assay mit Aktivator, auch zu einer enzymatischen Umsetzung des *p*-cresols durch andere FUs geführt hätte. Auch eine intrinsische Diphenolase-Aktivität des KLH konnte am Beispiel des Fragments KLH1-abc aufgrund der Färbung des Präzipitationsgipfels nachgewiesen werden. Die Inkubation über Nacht in Phosphat-Puffer resultierte hierbei in einer vergleichbar intensiven Färbung wie beim MBTH-Assay mit Aktivator nach 30-minütiger Reaktionszeit (Abb. C56 e und Kap. C13.2.1, Abb. C51 e).

13.4 Quantitative Untersuchungen zur SDS-induzierten Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH mittels Kinetikmessungen im *Spektralphotometer*

Bei den qualitativen Untersuchungen der nativen PAGE bzw. der *Crossed* IE (Kap. C13.1 und C13.2) konnten ausschließlich subjektive Aussagen bezüglich der CO und TY-Aktivitäten der verschiedenen KLH-Proteine getroffen werden. Um die Ergebnisse dieser Studien auch quantitativ zu belegen, wurden nachfolgend zunächst Absorptionsspektren der KLH-UE von 340 – 600 nm im *Hitachi U-3000 Spektrophotometer* (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd) gemessen, um die Bildung des im MBTH-Assay (Kap. B4.13.2, Tab. B8) violett gefärbten Reaktionsprodukts anhand der Zunahme des typischen Absorptionsmaximums bei ~ 505 nm photometrisch nachzuweisen (Rodríguez-López *et al.*, 1994; Espin *et al.*, 1997). Kinetiken können allerdings nur dann ausgewertet werden, wenn die Umsatzrate ($\Delta OD_{505nm}/Min.$) über einen ausreichend langen Zeitraum konstant bleibt (*steady state*). Um dies zu gewährleisten, mussten die Messparameter zunächst durch Variation der Konzentrationen der verschiedenen Bestandteile des Assays (Protein/Enzym, Substrat, MBTH) optimiert werden. Eine optimale Auswertung der relativen Umsatzraten konnte schließlich in 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,0, bei 25 °C, bei einem Substrat-MBTH-Verhältniss von 1:20 und einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml im Ansatz (1 ml) erzielt werden (Tab. C3). Diese Messbedingungen wurden aus Gründen der Quantifizierbarkeit stets konstant gehalten. Lediglich bei den Messungen mit Monophenolen wurde die

Proteinkonzentration zur Verkürzung der auftretenden *Lagphase* auf 1 mg/ml erhöht (Duckworth *et al.*, 1970; Garcia-Cánovas *et al.*, 1980) und die Messdauer auf eine Stunde verlängert. Als Substrate kamen die Monophenole Tyramin und 4-Methylphenol sowie die Diphenole Catechol, Dopamin und L-DOPA in einer Konzentration von jeweils 4 mM zum Einsatz. Die Dauer der photometrischen Messung richtete sich nach der Art des Substrats. Bei Diphenolen war die *Plateauphase* in der Regel bereits nach 20 Minuten erreicht, während Ansätze mit Monophenolen aufgrund der langsameren Reaktionskinetik für mindestens eine Stunde gemessen wurden (Tab. C3). Die quantitative Darstellung der Messungen erfolgte, vor allem bei den diphenolischen Messungen mit starker Autooxidation der Substrate, durch manuellen Abzug der entsprechenden Referenzläufe mit Puffer anstelle von Protein/Enzym. Bezüglich der eingesetzten Proteine kamen neben den UE beider Isoformen sowie den aufgereinigten Fragmenten KLH1-abc, KLH2-abc und KLH2-fg auch die oligomeren Didekamere beider Isoformen zum Einsatz. Die enzymatischen Aktivitäten der letzteren ließen sich qualitativ nicht in der nativen PAGE und der *Crossed* IE bestimmen (Kapitel C13.1 und C13.2), da es unter den alkalischen Laufbedingungen zu einer Dissoziation der Didekamere in UE kam. Aus diesem Grund waren die Didekamere vor den kinetischen Messungen in Stabilisierungs-Puffer pH 7,4 (mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂) gelöst, während die UE und Fragmente in Glycin-Puffer pH 9,6 vorlagen. Die Verwendung des alkalischen Glycin-Puffers resultierte allerdings nach Zugabe der Proteinlösung (200 µl) zur Färbelösung in der Küvette (800 µl) in einer geringfügigen Erhöhung des ursprünglichen pH-Wertes von 7,0 auf 7,4. Zur Aktivierung der Proteine wurde ausschließlich SDS in einer Konzentration von 2 mM im Ansatz (1 ml) eingesetzt, da mittels dynamischer Lichtstreuung gezeigt werden konnte, dass es in 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,5 ab ~ 1 mM SDS zu einer Überschreitung der kritischen mizellaren Konzentration kommt, was schließlich in einer optimalen Aktivierung von Hämocyaninen resultiert (Baird *et al.*, 2007, Decker *et al.*, 2007a). Die Inkubation mit dem Aktivator erfolgte in der Küvette für etwa 30 Sekunden unmittelbar vor Beginn der photometrischen Messungen.

Substrat	Konz.	Proteinkonz.	MBTH	Puffer	Aktiv.	Messdauer	Vol.
Catechol	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	2 mM SDS	< 3 Min.	1 ml
Dopamin	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	2 mM SDS	20 Min.	1 ml
L-DOPA	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	2 mM SDS	20 Min.	1 ml
Tyramin	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	2 mM SDS	60 Min.	1 ml
<i>p</i> -cresol	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	2 mM SDS	60 Min.	1 ml

Tab. C3: Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung der SDS-induzierten TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C.

Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

13.4.1 Vorversuche zur Stabilität der KLH-Didekamere nach SDS-Applikation

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte für zahlreiche Arthropoden-Hämocyane bereits gezeigt werden, dass eine Phenoloxidase-Aktivität nach Zugabe von mizellaren SDS-Konzentrationen lediglich durch Konformationsänderung induziert wird, die einen Zugang des Substrats zum aktiven Kupferzentrum ermöglicht, ohne in einer Denaturierung des Proteins zu resultieren (Baird *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit angestellten photometrischen Messungen sollten es bei Wahl des richtigen Puffers zulassen, auch die oligomeren Didekamere beider KLH-Isoformen bezüglich einer SDS-induzierten Phenoloxidase-Aktivität zu untersuchen und diese mit den Aktivitäten der UE zu vergleichen. DSC-Studien dieser Arbeit konnten jedoch bereits eine Schwächung der thermischen Stabilität der KLH-UE nach Zugabe von 2 mM SDS anzeigen (Kap. C14.3). Vor der Durchführung der kinetischen Messungen musste daher sichergestellt sein, dass es unter den Versuchsbedingungen des MBTH-Assays im Photometer mit 2 mM SDS, zu keinem Zerfall der Didekamere kommt und die native Quartärstruktur des KLH auch nach mindestens 20-minütiger Versuchsdauer noch intakt bleibt. Hierzu erfolgte am Beispiel der in Stabilisierungspuffer pH 7,4 gelösten KLH1-Didekamere in getrennten Ansätzen eine Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an SDS, gefolgt von einer Überprüfung der Molekülgröße (Durchmesser und Breite) in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) sowie einer visuellen Zustandsprüfung der Moleküle im TEM (Abb. C57).

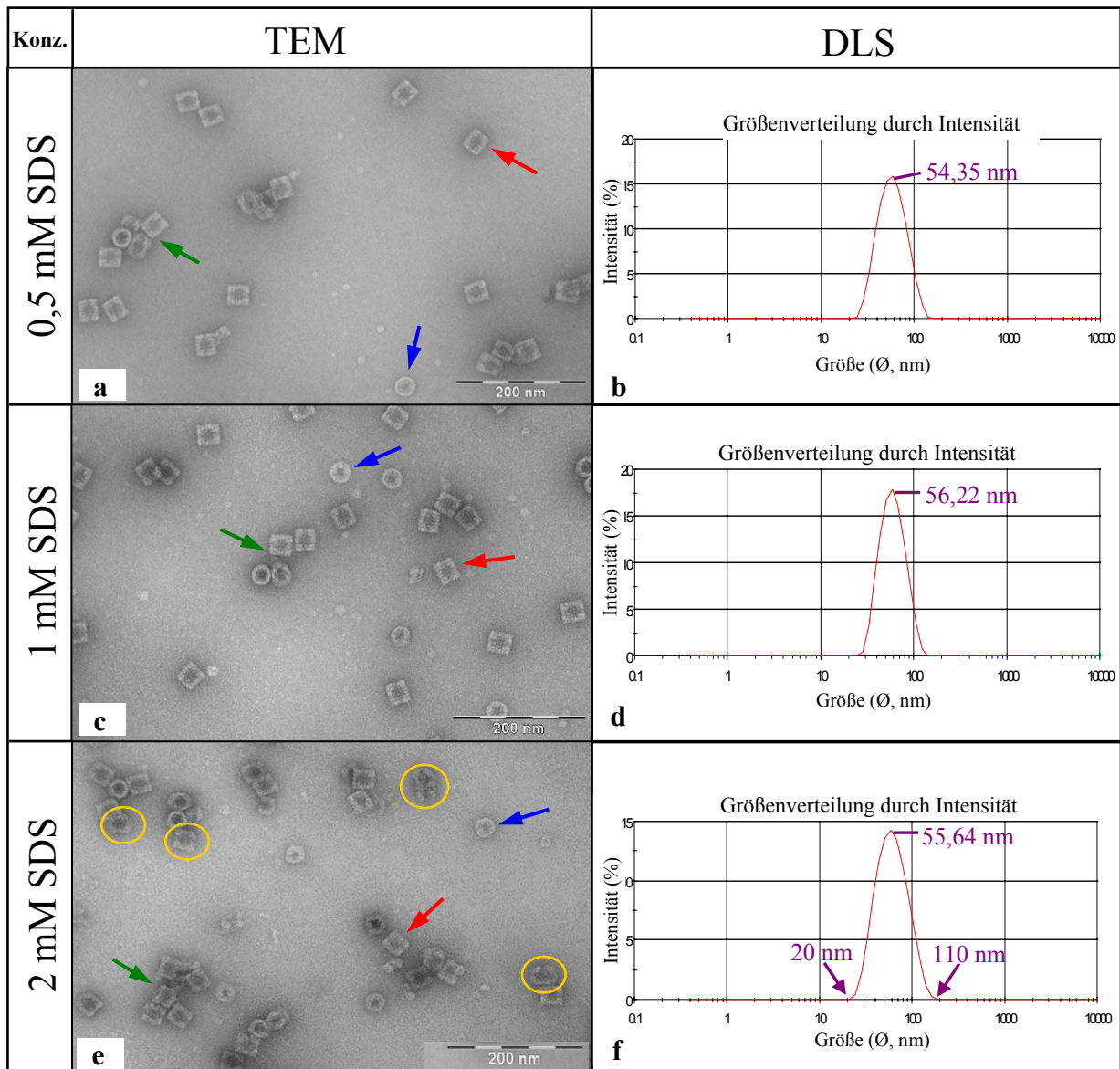


Abb. C57: Chemische Stabilität der KLH1-Didekamere nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an SDS.

Die Stabilität der KLH1-Didekamere (in Stab.-Puffer pH 7,4) wurde nach 20-minütiger Inkubation von 0,5 mM (a, b), 1 mM (c, d) und 2 mM (e, f) SDS zum einen visuell anhand von TEM-Aufnahmen (a, c, e) als auch durch eine Messung der Molekülgrößen (Durchmesser) sowie deren Intensitätsverteilung in der DLS (b, d, f) bestimmt. Die durchschnittliche Molekülgröße des Peakmaximums ist jeweils angegeben. Die Didekamere blieben auch bei 2 mM SDS noch intakt, allerdings zeigte sich im TEM bei dieser SDS-Menge eine beginnende Auffaltung der Moleküle (gelbe Kreise in Abb. e). In der DLS äußerte sich die höhere SDS-Konzentration durch ein Vorkommen von größeren Molekülaggregaten mit ~110 nm, aber auch zusätzlichen kleineren Bruchstücken mit ~20 nm (violette Pfeile in f). Rote Pfeile: Seitenansicht; blaue Pfeile: Topansicht; grüne Pfeile: KLH1-Cluster.

Nach 20-minütiger Inkubation der KLH1-Didekamere mit 0,5 mM SDS, konnte im TEM keinerlei Zerfall oder Strukturänderungen der Moleküle beobachtet werden. Neben einzelnen Didekameren zeigten sich auch zahlreiche der für diese Isoform typischen Didekamer-Cluster (Abb. C57 a). In der DLS wurde für die Mehrzahl der Proteine dieser Probe ein durchschnittlicher Durchmesser von 54,35 nm bestimmt (Abb. C57 b). Dieser Wert lag zwar deutlich über den auf TEM-Aufnahmen basierende Literaturangaben von ~35 nm für ein (Di)dekamer (Mouche *et al.*, 1999), allerdings muss berücksichtigt werden, dass der ermittelte Wert nur den durchschnittlichen Durchmesser aller in der Probe befindlichen Molekülgrößen

wiedergab. Da es bei jeder Messung jedoch nur einen einzelnen Peak gab, konnte dennoch von monodispersen Proben ausgegangen werden, wobei sich im TEM zeigte, dass ein Großteil der Moleküle zu größeren Didekamer-Clustern mit teilweise über 100 nm Durchmesser aggregiert war (grüne Pfeile in Abb. C57 a, c, e). Diese gingen entsprechend auch in die Berechnung des durchschnittlichen Moleküldurchmessers mit ein und resultierten in einer insgesamt höheren Durchschnittsgröße. Letztere stieg auch nach Zugabe von 1 mM des Detergenz nur minimal auf 56,22 nm an (Abb. C57 d), und im Elektronenmikroskop war nach wie vor noch kein Zerfall der Moleküle nachweisbar (Abb. C57 c). Erst nach einer Inkubation mit 2 mM SDS war in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine beginnende Auffaltung der KLH1-Didekamere zu erkennen, wobei die Quartärstruktur der Didekamere nach wie vor intakt blieb (gelbe Kreise in Abb. C57 e). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Messung der Probe in der DLS. Hier zeigte der breitere Messpeak zwar erstmals auch ein Vorkommen von kleineren Bruchstücken mit ~ 20 nm, aber auch größeren Molekülaggregaten mit ~110 nm Durchmesser an (violette Pfeile in Abb. C57 f). Letztere sind vermutlich das Ergebnis der strukturell geringfügig aufgefalteten Didekamere und – Cluster, die sich im TEM sehr deutlich nachweisen ließen. Bei den vorherigen Versuchen mit geringerer SDS-Konzentration konnten diese Beobachtungen hingegen noch nicht gemacht werden (Abb. C57 b, d). Insgesamt war die Intensität der kleineren Proteine/Bruchstücke aber auch bei 2 mM SDS vernachlässigbar gering und diese im TEM auch kaum sichtbar (Abb. C57 e). Im Durchschnitt blieb der Moleküldurchmesser folglich nahezu konstant mit 55,64 nm (Abb. C57 f).

Somit konnte anhand dieser zwei Methoden eindeutig nachgewiesen werden, dass der Einsatz von 2 mM des Detergenz SDS auch nach 20-minütiger Inkubation lediglich in einer leichten strukturellen Auffaltung der oligomeren Didekamere resultierte, der einen bestmöglichen Substratzugang, bei gleichzeitiger Erhaltung der Quartärstruktur, gewährleisten sollte.

13.4.2 *Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols Catechol*

Zunächst wurden anhand des **MBTH-Assays** Umsatzkinetiken verschiedener KLH-Proteine, nach Zugabe von **4 mM** des strukturell einfachsten Diphenols **Catechol**, im Spektralphotometer gemessen (Abb. C58). Die Aktivierung erfolgte in der Messküvette durch 30-sekündige Inkubation mit **2 mM SDS** unmittelbar vor Versuchsbeginn. Alle Messungen wurden in **Phosphat-Puffer pH 7,0** bei einer **Proteinkonzentration** von jeweils **0,2 mg/ml** im Ansatz durchgeführt.

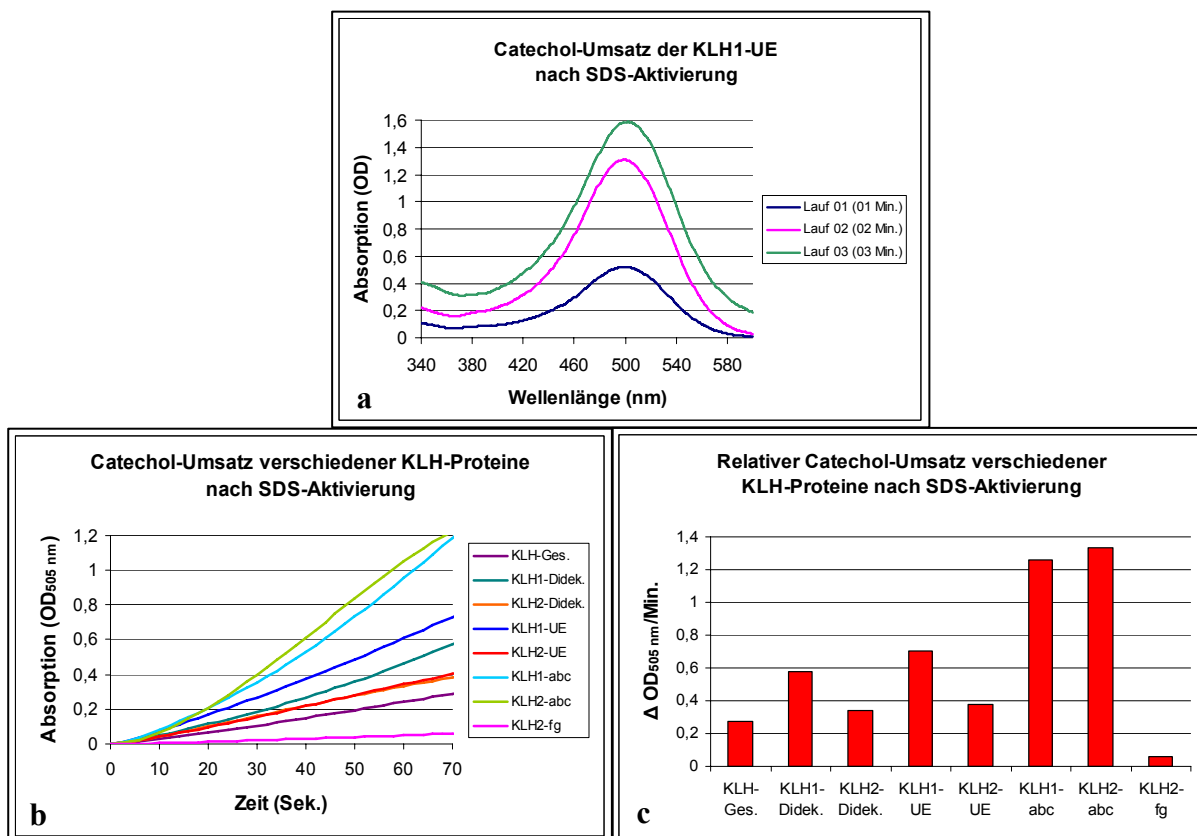


Abb. C58: Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Catechol-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer.

a) Minütliche Absorptionsspektren des Catechol-Umsatzes von 340 – 600 nm, am Beispiel der KLH1-UE. b) Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH-Proteine bei 505 nm für 70 Sekunden. c) Aus b) ermittelte relative Umsatzraten (Änderung der OD_{505nm}/Min.) verschiedener KLH-Proteine im *steady state*. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für max. drei Min. Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM Catechol, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml Protein. Bei allen Messungen wurde die jeweilige Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Die Messung der Absorptionsspektren von 340 – 600 nm resultierte nach Zugabe des diphenolischen Substrats Catechol bei allen getesteten Proteinen bereits innerhalb der ersten Minute in einem sehr starken Anstieg des Absorptionsmaximums (λ_{\max}) bei 500 nm (Abb. C58 a). Dies deutete, neben der innerhalb von Sekunden auftretende Violettfärbung des Ansatzes, auf eine sehr schnelle Bildung des MBTH-Produkts hin, der die Oxidation des Catechols durch die aktivierten KLH-Proteine vorausging. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits bei den qualitativen Studien in der nativen PAGE sowie der *Crossed IE* gemacht werden. Auch hier zeigte sich eine sehr schnelle Anfärbung der entsprechenden Proteinbanden bzw. Präzipitate (Kap. C13.1, Abb. C50 und Kap. C13.2.1, Abb. C51). Bei den photometrischen Messungen setzte allerdings schon nach wenigen Minuten eine Niederschlagsbildung ein, die sich in den Spektren durch eine zunehmende Streuung sowie einer erneuten Abnahme des Absorptionsmaximums darstellte. Für die KLH1-UE sind die Spektren daher nur bis zur dritten Minute dargestellt (Abb. C58 a). Frühere Studien konnten zeigen, dass die mit Catechol gebildeten MBTH-Produkte nur bei einem pH-Wert < 5,0 längere Zeit stabil und löslich bleiben und bei einem pH-Wert von 7,4 bereits nach wenigen Minuten

ausfallen (Espin *et al.*, 1997). Da der pH-Wert der Ansätze dieser Arbeit bei etwa 7,4 lag, konnte die Diphenolase-Aktivität mit Catechol folglich nur für kurze Zeit mittels eines schnellen kinetischen MBTH-Assays ermittelt werden (Abb. C58 b, c). Die Kinetiken zur Zunahme des OD_{505nm} zeigten für alle getesteten KLH-Proteinen bereits nach etwa 20 Sekunden das Erreichen des *steady state* mit konstanten Umsatzraten an (Abb. C58 b). Lediglich für das Fragment KLH1-abc konnte ein etwas verzögerter Eintritt in diese Phase beobachtet werden. Der beginnende Eintritt in die *Plateauphase* bzw. die beginnende Niederschlagsbildung konnte in der Regel nach zwei Minuten beobachtet werden, wobei das Fragment KLH2-abc aufgrund der höchsten relativen Umsatzrate (Abb. C58 c) bereits nach 60 Sekunden eine starke Streuung durch das Ausfallen des MBTH-Produkts zeigte (Daten nicht gezeigt). Auch für das Fragment KLH1-abc konnte die bereits starke subjektive Aktivität der qualitativen Studien durch Messung der relativen Umsatzraten kinetisch belegt werden (Abb. C58 b, c). Eine im Vergleich zum Fragment KLH1-abc noch höhere Aktivität des Fragments KLH2-abc sollte jedoch in einer zumindest vergleichbaren Aktivität der UE beider Isoformen resultieren, zumal sich für die KLH2-UE auch noch eine geringe Aktivität des Fragments KLH2-fg nachweisen ließ (Abb. C58 c, d und Kap. C13.2.1, Abb. C51 d, g). Die Didekamere und -UE des KLH2 zeigten jedoch, aufgrund der schwächeren Bandenfärbung in der nativen PAGE (Kap. C13.1, Abb. C50 b) sowie den Kinetiken der photometrischen Messungen, eine deutlich niedrigere Diphenolase-Aktivität mit Catechol als bei den KLH1-Didekameren und -UE (Abb. C58 c, d). Dieser scheinbare Widerspruch kann nur durch einen besseren Substratzugang zum katalytischen Zentrum der SDS-aktivierten FU-a des Fragments KLH2-abc interpretiert werden, der bei der gesamten KLH2-UE hingegen trotz Aktivierung nur eingeschränkt möglich war. Die Ursachen hierfür könnten in der Tertiärstruktur der KLH2-UE begründet liegen, die den Catechol-Umsatz somit beeinträchtigen würden. Der nur sehr geringe Catechol-Umsatz des Fragments KLH2-fg war ebenfalls erstaunlich, da die *Crossed IE* eine starke Aktivität der FU-f suggeriert hatte (Abb. C58 b, c und Kap. C13.2, Abb. C51 d, g). Da die *Crossed IE* allerdings eine sehr sensitive Methode ist, reichte die geringe Aktivität scheinbar aus, um eine deutliche Färbung der entsprechenden Präzipitationsgipfel bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit zu induzieren.

Die bereits in früheren Studien zur Phenoloxidase-Aktivität von Mollusken-Hämocyaninen gezeigte stärkere enzymatische Aktivität der UE im Vergleich zu höher oligomerisierten Didekameren (Siddiqui *et al.*, 2004, 2006), konnte auch bei den Messungen mit Catechol beobachtet werden. Die Ursachen hierfür sind vermutlich in der besseren Zugänglichkeit des Substrats zum aktiven Zentrum zu suchen.

Bioinformatische Studien konnten belegen, dass keine sterische Fixierung des strukturell primitiven Catechols an den entsprechenden Bindungsstellen des aktiven Zentrums vorliegt (Diplomarbeit Hagen Meckel, 2005). Ein Vorkommen des Catechols *in vivo* wurde bis heute ebenfalls nicht nachgewiesen. Umso erstaunlicher ist es, dass einige FUs dennoch zu einer enzymatischen Oxidation des Catechols zum Diquinon bzw. zum MBTH-Produkt befähigt

sind. Der Grund, warum das strukturell primitive Catechol allerdings nicht von allen FUs des KLH umgesetzt wird, ist nach wie vor ungeklärt und bedarf weiterer Studien. Eventuell bleibt das Substrat bei einigen FUs in einer Fehlorientierung im katalytischen Zentrum stecken und eine Oxidation oder Freisetzung des Catechols bleibt aus.

13.4.3 Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols **Dopamin**

Die nachfolgenden Umsatzkinetiken verschiedener KLH-Proteine wurden nach Zugabe von **4 mM** des Diphenols **Dopamin** zur Färbelösung des **MBTH-Assays** im Spektralphotometer gemessen (Abb. C59). Dieses Substrat enthält, im Gegensatz zum strukturell primitiven Catechol, eine zusätzliche Ethylaminseitenkette am 1,2-Dihydroxybenzolring und sollte daher aus sterischen Gründen in niedrigeren Umsatzraten nach Aktivierung mit **2 mM SDS** resultieren. Alle Messungen wurden für **20 Minuten** in **Phosphat-Puffer pH 7,0**, bei einer **Proteinkonzentration** von jeweils **0,2 mg/ml** im Ansatz durchgeführt.

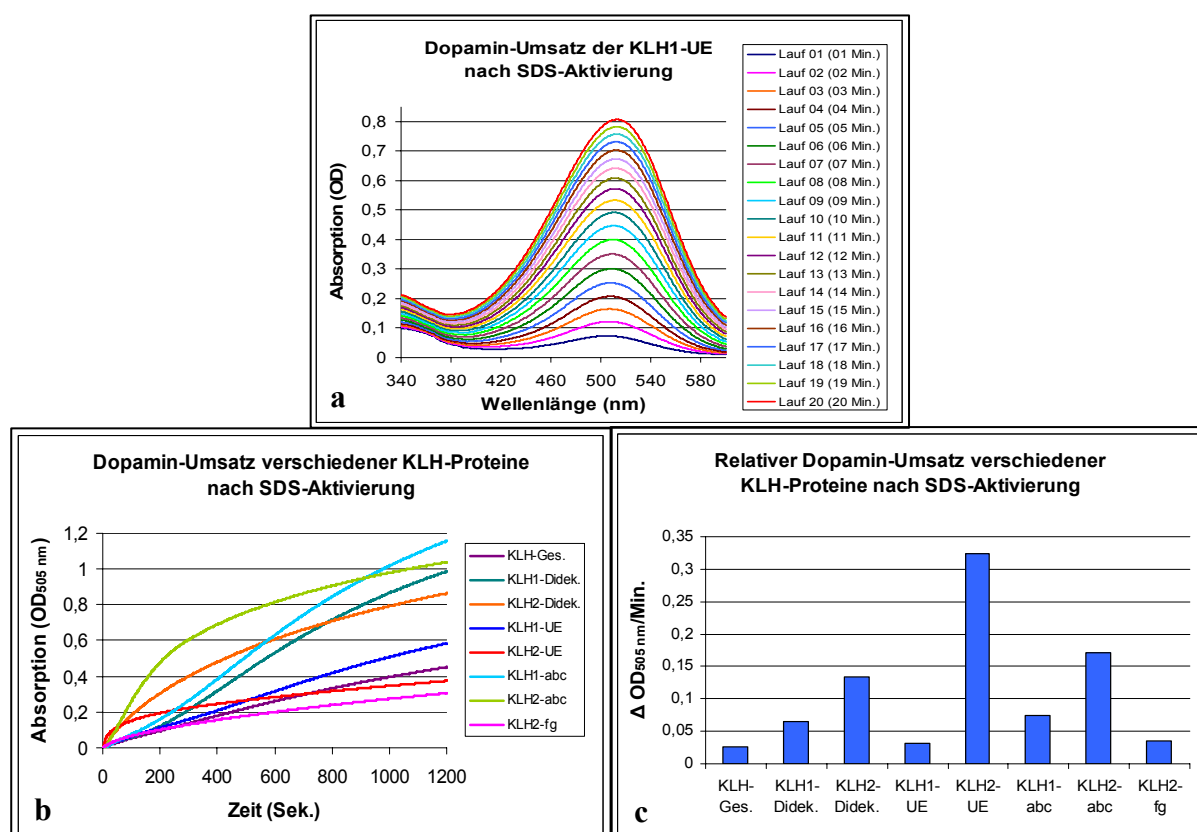


Abb. C59: Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Dopamin-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer.

a) Minütliche Absorptionsspektren des Dopamin-Umsatzes von 340 – 600 nm, am Beispiel der KLH1-UE. b) Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH-Proteine bei 505 nm. c) Aus b) ermittelte relative Umsatzraten (Änderung der OD_{505nm}/Min.) verschiedener KLH-Proteine im *steady state*. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für max. 20 Min. Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM Dopamin, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml Protein. Bei allen Messungen wurde die jeweilige Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Die Absorptionsspektren der KLH1-UE zeigten mit dem Substrat Dopamin einen kontinuierlichen Anstieg der Absorptionsmaxima bei 503 nm, und es konnte ein linearer Anstieg der

OD_{505nm} bis zum Messende nach 20 Minuten beobachtet werden (Abb. C59 a, b). Eine Niederschlagsbildung wie beim Catechol trat als Folge des Ausfallens des MBTH-Produkts nicht auf. Da im Bereich um 505 nm die molaren Extinktionskoeffizienten der MBTH-Produkte von Catechol ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 17500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Dopamin ($\lambda_{\text{max}} = 503 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 20700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sehr ähnlich sind (Espin *et al.*, 1997), konnte die Bildung dieser Produkte am Beispiel der KLH1-UE semiquantitativ verglichen werden. Im Allgemeinen waren die relativen Umsatzraten aller getesteten KLH-Proteine deutlich langsamer als beim Catechol. So ergab sich bei den KLH1-UE mit Catechol nach zwei Minuten eine OD_{500nm} von $\sim 1,3$, während das Absorptionsmaximum des Dopamins nach der gleichen Zeit erst eine OD_{505nm} von 0,12 anzeigte (Abb. C59 a und Kap. C13.4.2 Abb. C58 a). Dies entsprach somit einer fast 11-fach geringeren Umsatzgeschwindigkeit beim Dopamin. Der Verlauf der Kinetiken unterschied sich zudem deutlich bei den verschiedenen getesteten KLH-Proteinen. So ergab sich bei den Proteinen des KLH2 generell ein typisch hyperbolischer Kurvenverlauf mit einem sehr frühzeitigen und schnellen Dopamin-Umsatz, während die KLH1-Didekamere und das Fragmente KLH1-abc eine eher sigmoidale Kinetik zeigten (Abb. C59 b). Diese lassen sich auf geringere Umsatzraten zu Messbeginn (*Lagphase*) zurückführen. Das Fragment KLH1-abc erreichte den *steady state* erst nach etwa 240 Sekunden. Eine solch ausgeprägte *Lagphase* ist normalerweise für den enzymatischen Umsatz von Monophenolen charakteristisch und basiert auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen (Kap. A6). Auch allosterisch regulierte (kooperative) Enzyme zeigen einen typisch sigmoidalen Kurvenverlauf. Bei den KLH1-Didekameran und dem Fragment KLH1-abc könnte die Kinetik ebenfalls auf charakteristischen, allosterischen Enzymeigenschaften beruhen. Interessant wäre diesbezüglich die Umsatz-Kinetik der katalytisch aktiven FU-a alleine, die in diesem Fall einen hyperbolischen Kurvenverlauf zeigen sollte. Andererseits wären auch verschiedene Aktivierungsmechanismen bei beiden Isoformen denkbar, die bei den KLH1-Proteinen erst nach längerer Inkubationsdauer mit dem Aktivator SDS einen Substratzugang zum aktiven ermöglichen. Entsprechend traten die Proteine der Isoform 1 auch erst gegen Messende nach 15 Minuten in die *Plateauphase* ein. Bei den KLH2-Proteinen wurde diese Phase bereits nach spätestens 180 Sekunden eingeleitet, was entweder auf einen besseren Zugang des Dopamins zum aktiven Zentrum der aktivierten KLH2-Proteine hinweist, oder eine schnellere SDS-induzierte Auffaltung und damit Aktivierung der Proteine der Isoform 2 belegt. Beide Möglichkeiten könnten auf speziellen, strukturellen Eigenschaften des KLH2 basieren. Besonders auffallend war in diesem Zusammenhang der sehr hohe relative Substrat-Umsatz der KLH2-UE, der jedoch nur innerhalb der ersten 10 Sekunden konstant war und anschließend rapide abnahm (Abb. C59 b, c). Die Bestimmung der relativen Umsatzrate konnte daher nur während dieser kurzen Zeitspanne des konstanten Umsatzes berechnet werden. Ähnliche Beobachtungen konnten prinzipiell auch für das Fragment KLH2-abc und die KLH2-Didekamere gemacht werden, die nach der KLH2-UE zu den Proteinen mit den höchsten relativen Dopamin-Umsätzen zählten (Abb. C 59 c). Da das Verhältnis der im Assay

eingesetzten aktiven FUs beim Fragmenten KLH1-abc höher war als bei gleicher Proteinmenge der sehr viel schwereren KLH2-UE, konnte entsprechend mehr Substrat umgesetzt werden, und ein Rückgang des Umsatzes konnte erst nach etwa 180 Sekunden beobachtet werden (Abb. C59 b). Abschließend bleibt festzuhalten, dass Dopamin von den KLH-Proteinen der Isoform 2 bei allen Messungen deutlich schneller umgesetzt wurde als bei den Proteinen der Isoform 1 (Abb. C59 c, d). Dies waren diesbezüglich somit genau umgekehrte Beobachtungen wie bei den Messungen des Catechols (Kap. C13.4.2, Abb. C58). Beim Dopamin lag dieses Ergebnis in einer insgesamt größeren Aktivität der KLH2-UE begründet, die wiederum aus der Beteiligung von drei aktiven FUs KLH2-a,- f,- h resultierte. Bei den KLH1-UE zeigten hingegen nur die zwei FUs KLH1-a und -e eine Aktivität (Kap. C13.2.2, Abb. C52).

Die von Siddiqui *et al.* (2004, 2006) festgestellte stärkere enzymatische Aktivität der Mollusken-UE im Vergleich zu höher oligomerisierten Didekameren, konnte beim KLH mit Dopamin als Substrat nicht nachgewiesen werden (Abb. C59 b). Dies lässt sich anhand des aktivitätssteigernden Effekts des Tris im Stabilisierungs-Puffer erklären (Kap. C13.6.1). Letzterer war notwendig, um die oligomere Struktur der Didekamere in den Proben aufrechtzuerhalten. Das Ausbleiben dieses Effekts bei den Messungen der Didekamere mit Catechol, beruht hingegen auf der gegensätzlichen Wirkung des Tris, welches bei diesem Substrat stets einen inhibitorischen Einfluss auf die relativen Umsatzraten ausübte (Kap. C13.6.1, Abb. C65 a).

13.4.4 *Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Diphenols L-DOPA*

Die letzte quantitative Studie mit diphenolischem Substrat erfolgte anhand des Substrats L-DOPA, welches im Vergleich zum Dopamin eine zusätzliche Carboxylgruppe an der Ethylaminseitenkette des 1,2-Dihydroxybenzolrings trägt. Die Umsatzkinetiken der mit **2 mM SDS** aktivierten KLH-Proteine wurden photometrisch nach Zugabe von **4 mM L-DOPA** zur Färbelösung des MBTH-Assays bestimmt (Abb. C60). Die Messungen erfolgten für **20 Minuten** in **Phosphat-Puffer pH 7,0**, bei einer **Proteinkonzentration** von jeweils **0,2 mg/ml** im Ansatz.

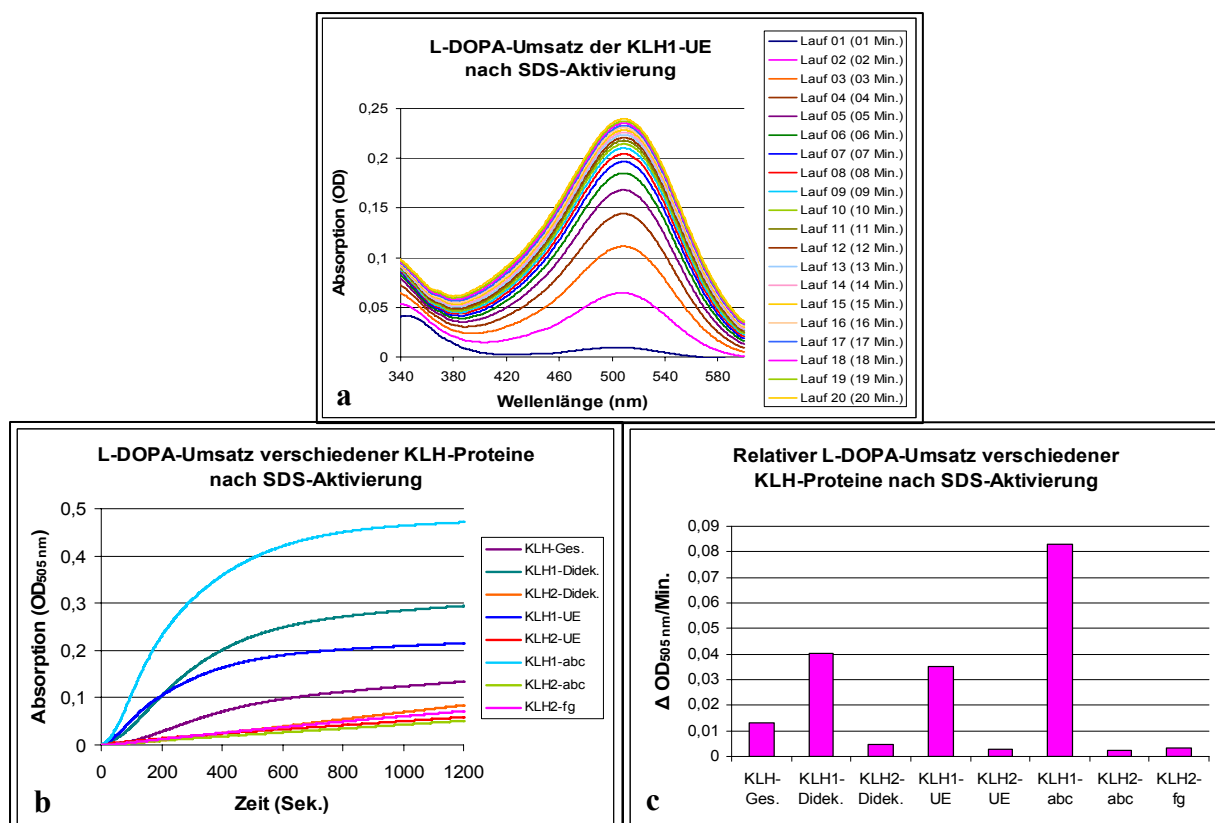


Abb. C60: Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen L-DOPA-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer.

a) Minütliche Absorptionsspektren des Dopamin-Umsatzes von 340 – 600 nm, am Beispiel der KLH1-UE. b) Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH-Proteine bei 505 nm. c) Aus b) ermittelte relative Umsatzraten (Änderung der $OD_{505nm}/Min.$) verschiedener KLH-Proteine im *steady state*. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für max. 20 Min. Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM L-DOPA, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml Protein. Bei allen Messungen wurde die jeweilige Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Die minütliche Messung der Absorptionsspektren von 340 – 600 nm ergab für die KLH1-UE in den ersten Minuten zunächst einen starken Anstieg des Absorptionsmaximums des gebildeten MBTH-Produkts bei 507 nm (Abb. C60 a). Nach etwa fünf Minuten Messdauer nahm die Intensität des weiteren Anstiegs jedoch stetig ab, was sich nach Messung der zeitlichen Zunahme der OD_{505nm} entsprechend als eine hyperbolische Kurve darstellte (Abb. C60 b). Im Vergleich zum Dopamin war die Umsatzgeschwindigkeit mit L-DOPA bei allen getesteten KLH-Proteinen nochmals deutlich langsamer. Bei den KLH1-UE konnte mit Dopamin nach zwei Minuten eine OD_{505nm} von $\sim 0,12$ gemessen werden, während das Absorptionsmaximum mit L-DOPA nach der gleichen Zeit erst eine OD_{507nm} von 0,06 anzeigte (Abb. C60 a und Kap. C13.4.3 Abb. C59 a). Bei vergleichbaren molaren Extinktionskoeffizienten der MBTH-Produkte von L-DOPA ($\lambda_{max} = 507 \text{ nm}$, $\epsilon_{max} = 22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Dopamin ($\lambda_{max} = 503 \text{ nm}$, $\epsilon_{max} = 20700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ergab ein semiquantitativer Vergleich für die KLH1-UE eine nur etwa halb so hohe Umsatzgeschwindigkeit mit L-DOPA. Eine Gegenüberstellung mit dem strukturell primitivsten Diphenol Catechol resultierte sogar in einem etwa 22-fach niedrigeren relativen Substrat-Umsatz (vgl. Kap. C13.4.2 Abb. C58 a). Hierbei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass L-DOPA unter den

gegebenen Bedingungen aus Löslichkeitsgründen nur in Konzentrationen von bis zu maximal 3,5 mM eingesetzt werden konnte (Winder, 1994). Auch wenn man somit von vorneherein von einer geringeren Substratkonzentration ausgehen musste, sollte sich eine theoretisch 0,5 mM höhere Konzentration, in keiner dem Dopamin oder Catechol vergleichbaren Steigerung des Substrat-Umsatzes auswirken. Vielmehr sollten die Ursachen in einer generell niedrigeren enzymatischen Aktivität der KLH-Proteine mit diesem Substrat begründet liegen. Dies konnte nach Messung der Kinetiken zur zeitlichen Zunahme der OD_{505nm}, speziell für die KLH2-Proteine nachgewiesen werden und entsprach somit den qualitativen Beobachtungen der *Crossed IE* (Abb. C60 b und Kap. C13.2.3, Abb. C53). So stieg das Absorptionsmaximum bei den Proteinen der Isoform 2 nur sehr geringfügig und linear an, während alle KLH1-Proteine einen hyperbolischen Kurvenverlauf zeigten. Aufgrund der deutlich höheren Umsatzraten der KLH1-Proteine im *steady state*, konnte der Eintritt in die *Plateauphase* bereits nach etwa fünf Minuten festgestellt werden. Allerdings zeigten die KLH1-Didekamere sowie das Fragment KLH1-abc, wie bereits beim Dopamin und Catechol (Kap. C13.4.2 und C13.4.3), auch hier eine für Diphenole untypische *Lagphase* von etwa 70 - 90 Sekunden, was auf einen verzögerten Substratzugang zum katalytischen Zentrum hinweisen könnte. Dennoch konnte für das Fragment KLH1-abc die höchste relative Umsatzrate bestimmt werden, gefolgt von den KLH1-Didekameran und den KLH1-UE (Abb. C60 c). Die bei anderen Substraten hohe Aktivität des Fragments KLH2-abc (Kap. C 13.4.2, Abb. C58 und Kap. C13.4.3, Abb. C59), konnte nach Zugabe von L-DOPA nicht beobachtet werden. Hier waren die relativen Umsatzraten ebenso niedrig, wie beim Fragment KLH2-fg. Die bei den Didekameran beider Isoformen im Vergleich zur jeweiligen UE höhere Aktivität kann, wie bereits beim Dopamin, auf den aktivitätsfördernden Effekt des Tris im Stabilisierungspuffer zurückgeführt werden. (Kap. C13.6.1).

13.4.5 Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols **Tyramin**

Nachdem die ermittelten Diphenolase-Aktivitäten der einzelnen KLH-Proteine in den vorherigen Kapiteln bereits quantitativ belegt werden konnten, wurden als nächstes auch die Monophenolase-Aktivitäten mit Hilfe des **MBTH-Assays** photometrisch bestimmt (Abb. C61). Als Substrat dienten **4 mM** des Monophenols **Tyramin**. Letzteres ist strukturell mit der Aminosäure Tyrosin verwandt, besitzt jedoch keine Carboxylgruppe und ähnelt bezüglich des Ethylaminrestes daher auch dem diphenolischen Dopamin. Um die Ergebnisse quantitativ mit den diphenolischen Messungen vergleichen zu können, wurden die relativen Substrat-Umsätze erneut in **Phosphat-Puffer pH 7,0** gemessen. Auf den Einsatz eines aktivitätssteigernden Tris-Puffers, wie er teilweise bei den qualitativen Studien in der nativen PAGE und *Crossed IE* zum Einsatz kam (Kap. C13.1 und C13.2), wurde bewusst verzichtet. Lediglich die **Proteinkonzentration** des KLH wurde im Ansatz auf **1 mg/ml** erhöht, da dies in einer Verkürzung der beim Monophenolumsatz auftretenden *Lagphase* resultiert (Duckworth *et al.*, 1970; Garcia-Cánovas *et al.*, 1980). Aufgrund der zu erwartenden

langsameren Reaktionskinetik fand die Messung des Substrat-Umsatzes zudem für **60 Minuten** statt. Ansonsten wurden die Bedingungen der diphenolischen Messungen beibehalten (Kap. C13.4, Tab. C3) und die KLH-Proteine mit **2 mM SDS** aktiviert. Die Inkubation mit dem Aktivator erfolgte vor Messbeginn für etwa 30 Sekunden.

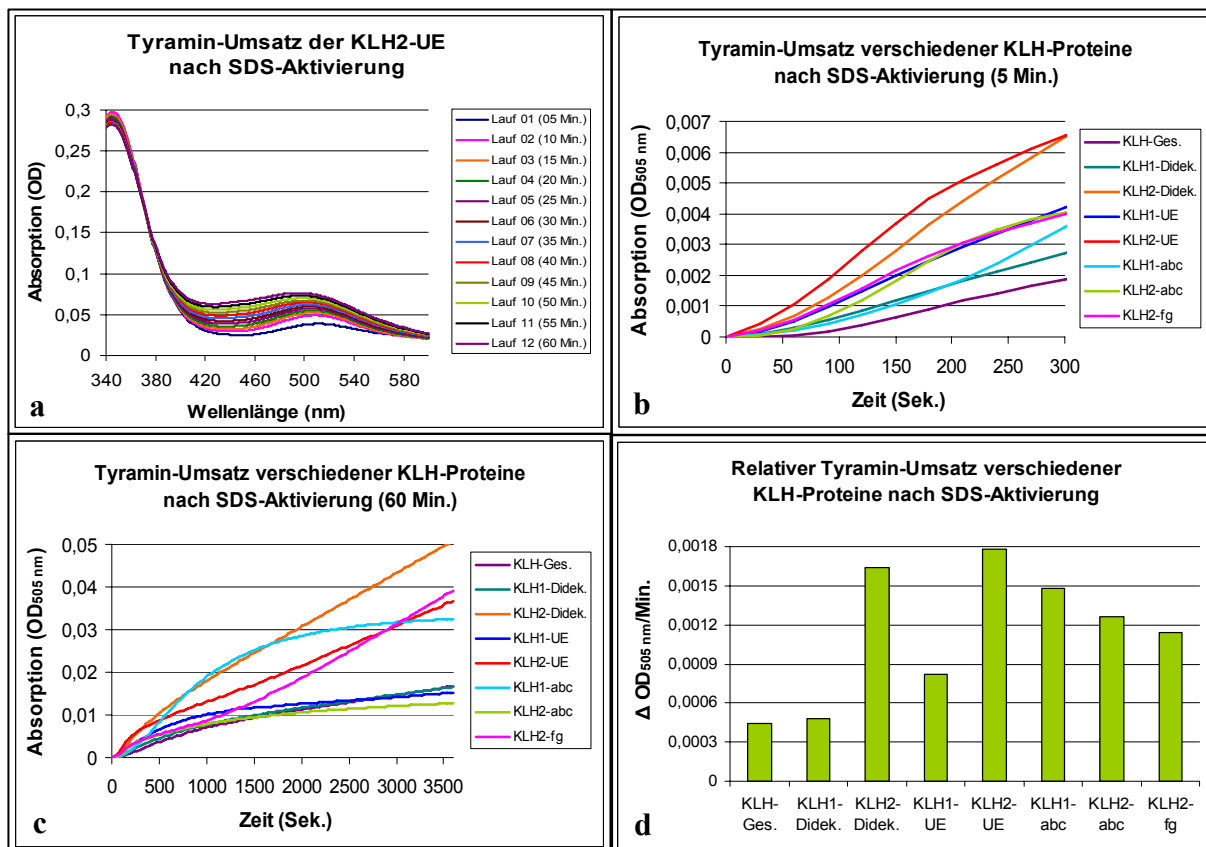


Abb. C61: Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Tyramin-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer.

a) Fünfminütige Absorptionsspektren des Tyramin-Umsatzes von 340 – 600 nm, am Beispiel der KLH2-UE. λ_{max} verschob sich während der einstündigen Messdauer von 511 nm auf 496 nm. b – c) Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH-Proteine bei 505 nm für 5 Min. (b) bzw. 60 Min (c). Die kurzzeitige Messung verdeutlichte die beim Monophenol-Umsatz auftretende *Lagphase* innerhalb der ersten 90 - 240 Sek. d) Aus b) bzw. c) ermittelte relative Umsatzraten (Änderung der $OD_{505nm}/Min.$) verschiedener KLH-Proteine im *steady state*. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für max. 60 Min. Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM Tyramin, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 1,0 mg/ml Protein. Bei allen Messungen wurde der Leerwert (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Die bereits mittels nativer PAGE und *Crossed* IE qualitativ nachgewiesene Monophenolase-Aktivität des aktivierten KLH (Kap. C13.1, Abb. C50 f und Kap. C13.2.4, Abb. C54), konnte durch die photometrischen Kinetikmessungen schließlich auch quantitativ belegt werden (Abb.C61). Die SDS-Aktivierung resultierte jedoch in einem deutlich geringeren Monophenol-Umsatz als es bei diphenolischen Substraten der Fall war (Kap. C13.4.2 - C13.4.4). Dies deutete sich schon nach Messung der Absorptionsspektren an, so dass aufgrund der geringen Aktivität nur alle fünf Minuten ein ebensolches aufgenommen wurde (Abb. C61 a.). Ein direkter Vergleich der Mono- und Diphenolase-Aktivitäten anhand der Zunahme von λ_{max} war allerdings nur bedingt möglich, da die Maxima eine zeitabhängige

Verschiebung in Richtung kürzerer Wellenlänge zeigten. Die enzymatische Hydroxylierung des Tyramins zum Dopamin und das nachfolgend gebildete Reaktionsprodukt aus oxidiertem DOPACHINON und MBTH resultierten folglich in keinem zu erwartenden Absorptionsmaximum bei 503 nm, sondern λ_{\max} verschob sich von 511 nm zu Versuchsbeginn, auf 496 nm nach einer Stunde Messdauer (Abb. C61 a). Nach Espin *et al.* (1997) liegt dies in der Bildung eines weiteren gelblichen Oxidationsprodukts des MBTH-Assays begründet, deren Menge mit der Zeit zunimmt. Dies tritt zwar generell sowohl bei Mono- als auch Diphenolase-Reaktionen auf, wurde aber in dieser Arbeit aufgrund der geringeren Monophenolase-Aktivität erst bei entsprechend längerer Versuchsdauer signifikant. Zusätzlich kam es im Ansatz neben der katalytischen Oxidation auch zu einer Autooxidation des enzymatisch gebildeten Dopamins zum DOPACHINON, welches in Verbindung mit λ_{\max} des MBTH-Produkts zu einem zunehmend breiteren Absorptionstypus der Spektren führte. Da diese Autooxidation nur bei Diphenolen stattfindet, deren Bildung ausgehend vom Monophenol jedoch auch die Zugabe des Enzyms/Proteins bedingt, konnte eine Negativkontrolle ohne KLH nicht von den Spektren abgezogen werden. Betrachtet man λ_{\max} des Dopamin- ($OD_{503\text{nm}} = 0,7$) und Tyramin-Umsatzes ($OD_{511\text{nm}} = 0,06$) der KLH2-UE nach fünf Minuten Versuchsdauer, kann man von einer etwa 12-fach geringeren Monophenolase-Aktivität ausgehen. Entsprechend war auch der Einsatz höherer Protein/Enzymmengen nicht ausreichend, um die Dauer der *Lagphase* signifikant zu verkürzen. In der Regel wurde der *steady state* erst nach ~ 90 Sekunden, bzw. beim Fragment KLH1-abc sogar erst nach ~ 240 Sekunden erreicht (Abb. C61 b). Die mit 4 mM ebenfalls nicht geringe Menge an eingesetztem Monophenol relativierte die Verkürzung der *Lagphase* somit vermutlich wieder (Duckworth *et al.*, 1970; Garcia-Cánovas *et al.*, 1980). Eine geringfügige und extern zum Reaktionsansatz hinzugefügte Menge an diphenolischem Dopamin, zur Verkürzung der Anlaufphase des kinetischen Monophenolase-Assays (Kap. A6), wären eventuell vorteilhafter gewesen. Die Messung der zeitlichen Absorptionzunahme der $OD_{505\text{nm}}$ lieferte für die meisten gemessenen KLH-Proteine einen hohen Substrat-Umsatz nach Erreichen des *steady state* für $\sim 100 - 150$ Sekunden, gefolgt von einem frühen Eintritt in die *Plateauphase* mit jedoch nur allmählich abnehmendem Tyramin-Umsatz (Abb. C61 c). Allein das Fragment KLH1-abc zeigte für einen Zeitraum von insgesamt ~ 400 Sekunden konstante Umsatzraten. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs des Fragments KLH2-fg fiel auf, dass es innerhalb der *Plateauphase* nach 1500 Sekunden erneut zu einem geringfügigen Anstieg der Umsatzraten kam. Dies könnte auf zwei unterschiedliche Reaktionskinetiken der aktivierten FUs KLH2-f sowie -g hinweisen, die somit als Didomänen-Fragment einen solchen Kurvenverlauf bedingen würden. Da die FU KLH2-g allerdings im Gegensatz zur FU KLH2-f keinerlei Aktivität in der *Crossed IE* zeigte (Kap. C13.2.4, Abb. C54 d, f), könnten die Gründe hierfür auch in einem erst nach 20-minütiger SDS-Inkubation auftretenden optimalen Substratzugang liegen, der den Umsatz somit auch in der *Plateauphase* nochmals kurzfristig erhöhen würde. Entsprechend war bei diesem Fragment nach Ende der Messdauer nach 60 Minuten noch kein

vollständiger Umsatz des monophenolischen Tyramins nachweisbar. Das Gleiche galt für die KLH2-Didekameran und KLH2-UE, die die insgesamt höchsten relativen Umsatzraten im photometrischen MBTH-Assay zeigten (Abb. C61 c, d). Für das Fragment KLH2-fg konnte im Gegensatz zu den Messungen mit Catechol, Dopamin und L-DOPA (Kap. C13.4.2 bis C13.4.4) zum ersten Mal ein im Verhältnis zu den Fragmenten KLH1- und KLH2-abc vergleichbar hoher relativer Umsatz nachgewiesen werden. Auch die in der *Crossed* IE (bei Verwendung von Phosphatpuffer!) im Vergleich zur KLH2-UE beobachtet niedrigere Aktivität der KLH1-UE konnte quantitativ bestätigt werden (Abb. C61c, d). Ein zunächst scheinbarer Widerspruch ergab sich nach Betrachtung der hohen relativen Umsatzrate des Fragments KLH2-abc, obwohl in der *Crossed* IE ausschließlich eine Aktivität der FU KLH2-f und nicht der FUs-a, -b, oder -c nachgewiesen werden konnte (Kap. C13.2.4, Abb. C54 d). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass der relative Tyramin-Umsatz aus der Zunahme der OD_{505nm} im *steady state* ermittelt wurde. Ein konstanter Substrat-Umsatz ergab sich bei den Fragmente KLH2-abc und -fg allerdings nur zu Beginn der photometrischen Messung zwischen Sekunde 100 – 150, wobei der Umsatz hier für das Fragment KLH2-abc sogar etwas höher war, als beim Fragment KLH2-fg (Abb. C61 b). Die Menge an gebildetem MBTH-Produkt durch das Fragment KLH2-fg überstieg jedoch nach ~ 360 Sekunden die Menge an gebildetem Produkt durch das Fragment KLH2-abc. Letzteres erreichte hingegen ziemlich schnell die *Plateauphase* mit kaum noch messbarem Tyramin-Umsatz nach ~ 1500 Sekunden, während die Kurve des Fragments KLH2-fg weiterhin steil anstieg (Abb. C61 c). Nach einer Messdauer von 60 Minuten ergab sich hier somit eine deutlich größere Menge an violetter MBTH-Produkt, die in der *Crossed* IE zu einer entsprechend starken Färbung der FU-f nach gleicher Inkubationsdauer führte und die FU KLH2-a nach wie vor keine Farbreaktion anzeigte.

13.4.6 Quantitative Untersuchungen zur Umsetzung des Monophenols **4-Methylphenol**

Die abschließende quantitative Studie zur Tyrosinase-Aktivität des KLH erfolgte anhand des strukturell primitiveren Substrats 4-Methylphenol, welches im Vergleich zum Tyramin nur eine einfache Methylgruppe anstelle des Ethylaminrestes trägt. Die Umsatzkinetiken der mit **2 mM SDS** aktivierten KLH-Proteine wurden im MBTH-Assay mit **Phosphat-Puffer pH 7,0** und nach Zugabe von **4 mM** des **Substrats** bestimmt (Abb. C60). Die Messdauer betrug **60 Minuten** bei einer **Proteinkonzentration** von jeweils **1 mg/ml** im Ansatz.

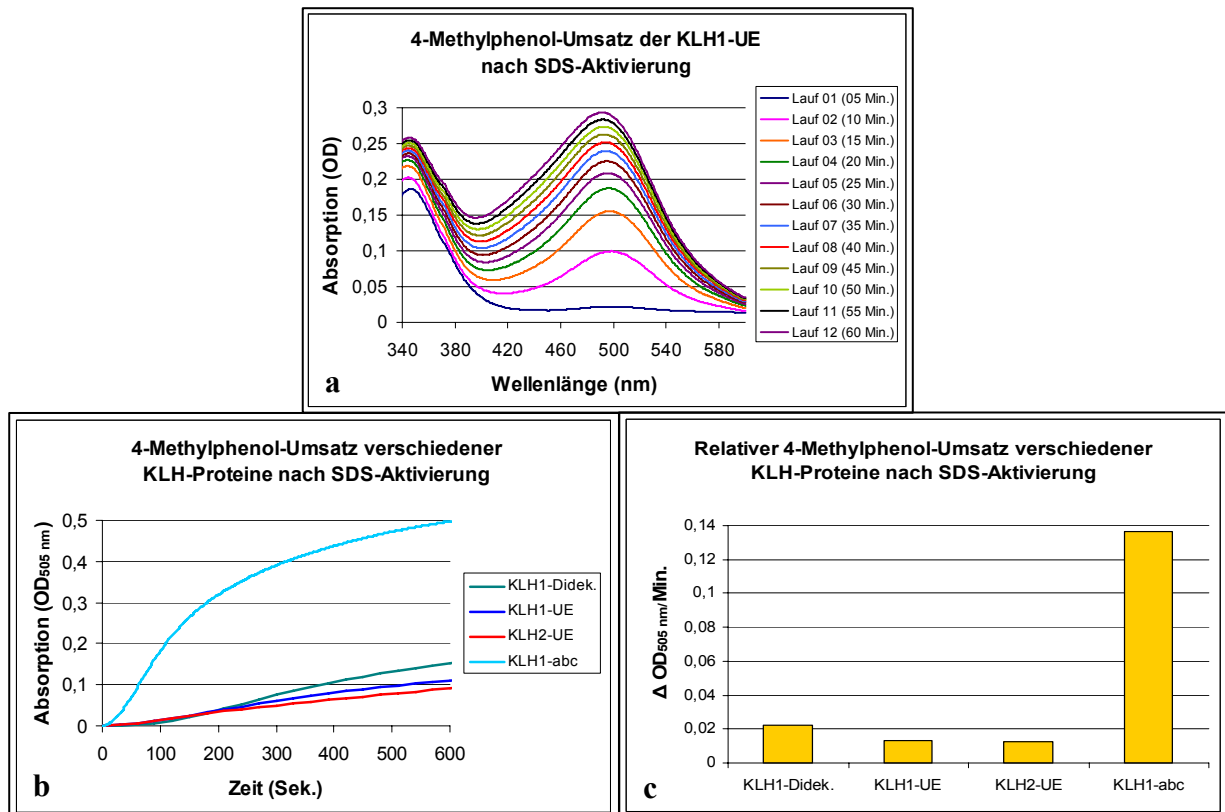


Abb. C62: Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen 4-Methylphenol-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer.

a) Fünfminütige Absorptionsspektren des 4-Methylphenol-Umsatzes von 340 – 600 nm, am Bsp. der KLH1-UE. λ_{max} verschob sich während der einstündigen Messdauer von 509 nm auf 491 nm. b) Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH-Proteine bei 505 nm für 10 Minuten. c) Aus b) ermittelte relative Umsatzraten (Änderung der $OD_{505nm}/Min.$) verschiedener KLH-Proteine im *steady state*. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für max. 60 Min. Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM 4-Methylphenol, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 1,0 mg/ml Protein. Bei allen Messungen wurde der Leerwert (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Im Vergleich zum Tyramin-Umsatz der KLH2-UE (Abb. C61 a), konnte nach Zugabe des 4-Methylphenols eine etwa doppelt so hohe Monophenolase-Aktivität bei der SDS-aktivierten KLH1-UE beobachtet werden. Eine direkte Gegenüberstellung der Umsatzraten beider Substrate anhand der Zunahme der Absorptionsmaxima war allerdings schwierig, da auch die Messung mit 4-Methylphenol in einer zeitabhängigen Verschiebung von λ_{max} in Richtung kürzerer Wellenlänge resultierte, die sich jedoch von der des Tyramins unterschied. So ergab sich mit *p*-cresol eine Abnahme des Absorptionsmaximums von 509 nm zu Versuchsbeginn, auf 491 nm nach einer Stunde Messdauer (Abb. C62 a). Nach Espin *et al.* (1997) sollte die Bildung des vom hydroxylierten 4-Methylcatechol ausgehenden MBTH-Produkts jedoch ein λ_{max} von 494 nm besitzen. Bezüglich der Zunahme der OD_{505nm} konnten die höchsten relativen Umsatzraten für das Fragment KLH1-abc gemessen werden (Abb. C62 b, c). Diese Beobachtung deutete sich bereits während der qualitativen Studien in der nativen PAGE sowie der *Crossed IE* an, wo sich eine starke Banden- bzw. Präzipitats-Färbung beim Fragment KLH-abc bzw. den einzelnen FUs –a, -b und –c zeigte (Kap. C13.1, Abb. C50 g und Kap. C13.2.5, Abb. C55 c). Die *Lagphase* war bei diesem Fragment mit 4-Methylphenol etwas kürzer als beim Tyramin. Der *steady state* wurde bereits nach ~ 60 Sekunden Mess-

dauer erreicht und hielt bis ~ 150 Sekunden an. Nach 10 Minuten Messdauer ging der relative Substrat-Umsatz deutlich zurück, und die *stationäre Phase* war nahezu erreicht (Abb. C62 b). Bei den KLH1-Didekameran sowie den UE beider Isoformen zeigte sich hingegen erst ab ~ 90 Sekunden ein beginnender Substrat-Umsatz, wobei dieser bei allen drei KLH-Proteine etwa um den Faktor 10 niedriger war, als beim Fragment KLH1-abc. Auch hier gingen die Umsatzraten nach 10 Minuten bereits deutlich zurück. Betrachtet man sich die relativen Substrat-Umsätze der Didekamere, so konnte eine im Vergleich zu den UE höhere Aktivität beobachtet werden (Abb. C62 d). Wie bei den Messungen der Kapitel zuvor, sollte dies auch hier in der Lagerung der Didekamere in Tris-haltigem und somit aktivitätsfördernden Stabilisierungs-Puffer (Kap. C13.6.1) unmittelbar vor Versuchsbeginn begründet liegen.

13.5 Quantitative Untersuchungen zur intrinsischen Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH mittels *Kinetikmessungen* im Spektralphotometer

Im Kap. C13.3 konnte für die mono- und diphenolischen Substrate Catechol und 4-Methylphenol bereits der qualitative Nachweis einer intrinsischen Mono- und Diphenolase-Aktivität für einige KLH-Proteine erbracht werden (Abb. C56). Um dies auch quantitativ nachzuweisen, wurde am Beispiel der KLH1-Proteine ein MBTH-Assay ohne SDS-Aktivator durchgeführt und die Zunahme der OD_{505nm} photometrisch bestimmt. Der Substrat-Umsatz der Diphenole Catechol, Dopamin und L-DOPA sowie des Monophenols 4-Methylphenol wurde schließlich für die Messungen mit bzw. ohne Aktivator vergleichend dargestellt (Abb. C63, C64 und Tab. C5). Da die relativen Umsatzraten des Tyramins bereits mit Aktivator nur sehr schwach ausfielen (Kap. C13.4.5, Abb. C61), wurde auf die Verwendung dieses Substrats zur Bestimmung der intrinsischen Aktivität verzichtet. Aus dem gleichen Grund erfolgten die Messungen mit den übrigen Substraten auch nur für die Proteine der Isoform 1, da speziell die Umsatzraten des L-DOPA durch die KLH2-Proteine selbst nach SDS-Aktivierung sehr gering waren (Kap. C13.4.4, Abb. C60). Die übrigen Messbedingungen sind in Tab. C4 zusammengefasst und entsprachen bezüglich der eingesetzten MBTH-, Protein- und Substratkonzentration sowie der verwendeten Puffersubstanz den Bedingungen der vorherigen Kapitel (Kap. C13.4, Tab. C3 und Kap. B4.13.2, Tab. B8). Anstelle des Aktivators wurden den Ansätzen lediglich gleiche Volumina an *Aqua dest.* hinzugefügt.

Substrat	Konz.	Proteinkonz.	MBTH	Puffer	Aktiv.	Messdauer	Vol.
Catechol	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	keine	10 Min.	1 ml
Dopamin	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	keine	20 Min.	1 ml
L-DOPA	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	keine	20 Min.	1 ml
<i>p</i> -cresol	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	100 mM Na-Phosphat, pH 7,0	keine	60 Min.	1 ml

Tab. C4: Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung der intrinsischen TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C.

Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

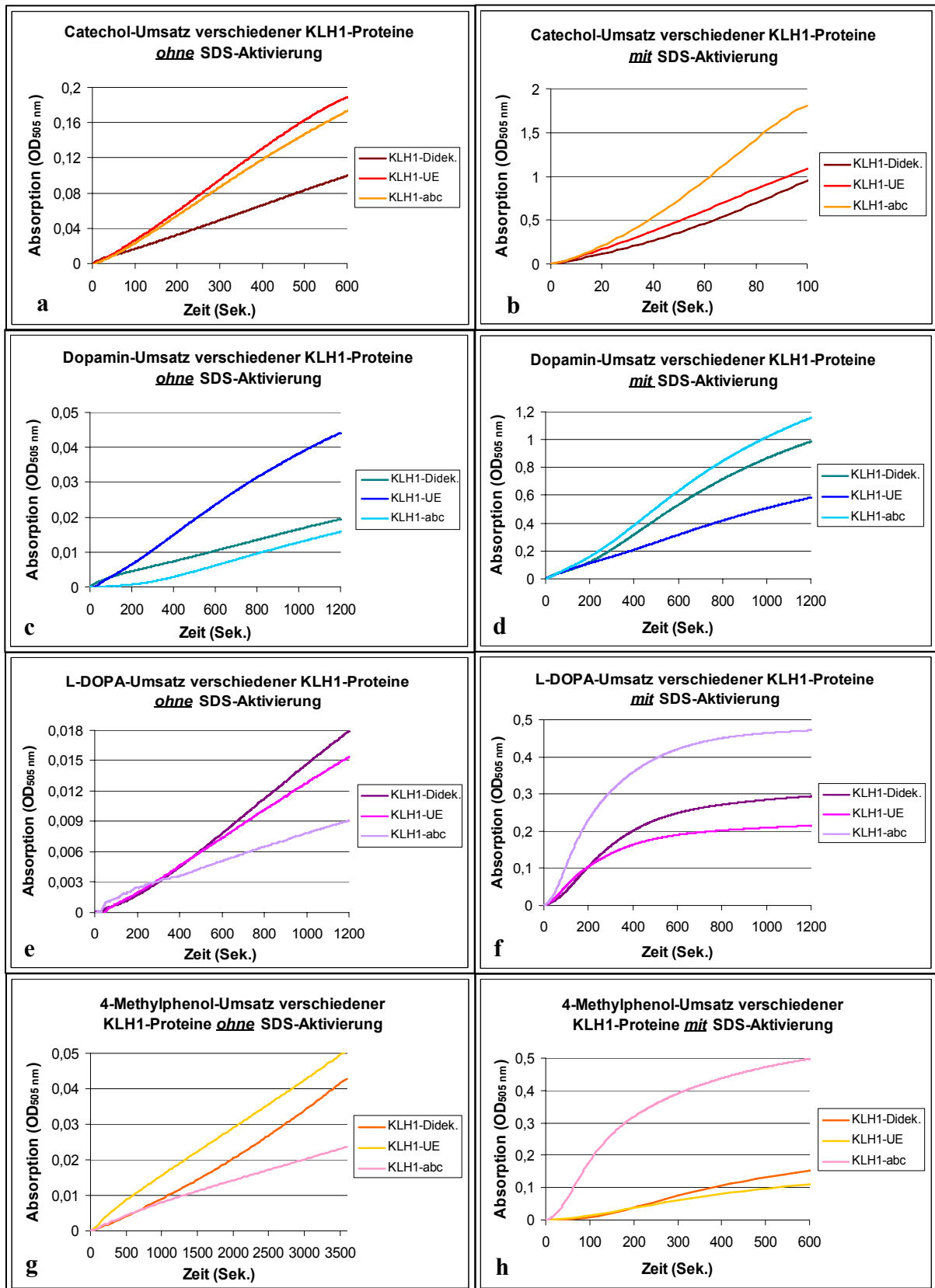


Abb. C63: Vergleich intrinsischer und SDS-induzierter Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine. Messung der Absorptionzunahme verschiedener KLH1-Proteine bei 505 nm nach Zugabe von Catechol (a, b), Dopamin (c, d), L-DOPA (e, f) und 4-Methylphenol (g, h). Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C, für 10 Min. (a), 100 Sek. (b), 20 Min. (c – f), 60 Min. (g) und 10 Min. (h). Die Ansätze enthielten 100 mM Na-Phosphat pH 7,0, 4 mM Substrat, 0,2 mM MBTH und 0,2 (a – f) bzw. 1,0 mg/ml (g, h) Protein. Eine Aktivierung mit 2 mM SDS fand nur bei b, d, f, h statt. Bei allen Messungen wurde der jeweilige Leerwert bzw. die Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Erläuterungen im Text.

Nach **SDS-Aktivierung** konnte bei allen getesteten Substraten die jeweils höchste Umsatzrate für das Fragment KLH1-abc beobachtet werden (Abb. C 63 b, d, f, h). Mit Ausnahme des Catechols ergab sich bei den KLH1-Didekameran zudem stets ein höherer Umsatz als bei den KLH1-UE (Abb. C63 d, f, h). Die Gründe hierfür wurden bereits in den vorherigen Kapiteln erörtert und sind auf den aktivitätsfördernden Effekt des Tris-haltigen Stabilisierungs-Puffers zurückzuführen (Kap. C13.6.1). In diesem wurden ausschließlich die Proben der Didekamere gelagert, um die oligomere Quartärstruktur der Proteine aufrecht zu erhalten. Das diesbezüglich ein genau umgekehrtes Aktivitätsverhältnis zwischen Didekamer und UE beim Catechol auftrat (Abb. C63 b), konnte später durch einen aktivitätshemmenden Einfluss des Tris-Puffers belegt werden, der nur bei diesem Substrat auftrat (Kap. C13.6.1, Abb. C65).

Betrachtet man die **intrinsischen** Umsatzraten der KLH1-Proteine **ohne SDS-Aktivierung**, fällt neben der generell deutlich niedrigeren enzymatischen Aktivität (Abb. C64) am deutlichsten der im Verhältnis zu den anderen KLH1-Proteinen starke Aktivitätsrückgang des Fragments KLH1-abc auf. Während dieses mit Aktivator noch den höchsten Umsatz bei allen Substraten mit einer deutlichen *Lagphase* lieferte, war die Aktivität ohne SDS im Vergleich zu den Didekameran und UE nun am niedrigsten. Lediglich beim Catechol lag die Umsatzrate des abc-Fragments nur geringfügig unterhalb der der KLH1-UE, die bei diesem Substrat die höchste intrinsische Aktivität zeigten (Abb. C63 a). Die für das Fragment KLH1-abc typische *Lagphase* zu Versuchsbeginn, war ebenfalls nur noch beim Dopamin offensichtlich zu erkennen (Abb. C64 c). Dies bestätigte die Vermutung, dass speziell das Fragment KLH1-abc einer deutlich längeren SDS-Inkubationsdauer bedarf, um katalytisch aktiviert zu werden, dann jedoch sehr hohe Umsatzraten liefert. Aufgrund der geringeren intrinsischen relativen Umsatzraten konnte der Catechol-Umsatz zudem für eine längere Dauer von 10 Minuten bestimmt werden, bevor es zum Ausfallen des MBTH-Produkts kam (vgl. Kap. C13.4.2).

Neben Catechol wurde ohne Aktivator auch beim Dopamin und *p*-cresol die höchste Menge an MBTH-Produkt durch die UE gebildet (Abb. C63 c, g). Dies widersprach somit den Beobachtungen mit SDS-Aktivator, wo es aufgrund der Anwesenheit von Tris im Puffer zu einer höheren Aktivität der Didekamere im Vergleich zu den UE kam (ausgenommen Catechol, Kap. C13.4.2). Tris scheint somit nur dann als allosterischer Effektor der Didekamere zu wirken, wenn eine SDS-Aktivierung stattfindet. Lediglich beim L-DOPA kam es ab einer Messdauer von 500 Sekunden zu einer höheren Umsatzrate der Didekamere. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Menge an gebildetem MBTH-Produkt jedoch bei beiden Proteinen annähernd gleich (Abb. C63 e).

Um die intrinsischen und SDS-induzierten enzymatischen Aktivitäten der verschiedenen KLH1-Proteine direkt miteinander vergleichen zu können und somit den Einfluss des Aktivators bei unterschiedlichen Substraten abschätzen zu können, wurden die Ergebnisse der Abb. C63 in Form der relativen Umsatzraten zusammengefasst (Tab. C5 und Abb. C64).

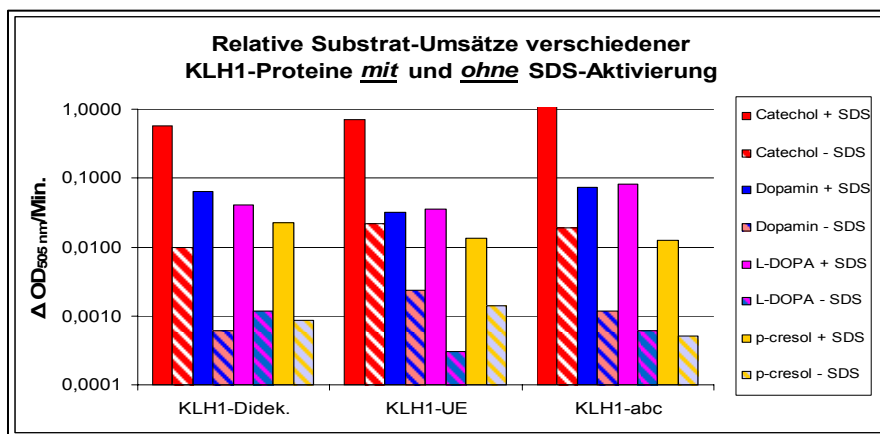


Abb. C64: Vergleich der relativen intrinsischen und SDS-induzierten Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine (s. Tab. C5).

Vergleichende halblogarithmische Darstellung der relativen Umsatzraten (Änderung der OD_{505nm}/Min.) der in Abb. C63 getesteten KLH1-Proteine und Substrate im *steady state* mit und ohne SDS-Aktivierung. Auf eine normierte Darstellung der eingesetzten absoluten Molekülmassen wurde in diesem Fall aus Gründen der zu großen Aktivitätsunterschiede verzichtet. Erläuterungen im Text.

Protein	Substrat	OD _{505nm} /Min intrinsisch	OD _{505nm} /Min SDS-aktiviert	Faktor der rel. Steigerung
KLH1-DD	Catechol	0,0099	0,5805	58
	Dopamin	0,0006	0,0648	108
	L-DOPA	0,0012	0,0402	34
	<i>p</i> -cresol	0,0009	0,0223	25
KLH1-UE	Catechol	0,0219	0,7002	32
	Dopamin	0,0024	0,0315	13
	L-DOPA	0,0003	0,0351	117
	<i>p</i> -cresol	0,0014	0,0134	10
KLH1-abc	Catechol	0,0192	1,2597	65
	Dopamin	0,0012	0,075	63
	L-DOPA	0,0006	0,0828	138
	<i>p</i> -cresol	0,0005	0,0127	25

Tab. C5: Vergleich der relativen intrinsischen und SDS-induzierten Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine (s. Abb. C64).

SDS-induzierte Aktivitätssteigerungen um den Faktor >100 sind blau und <30 violett gekennzeichnet.

Der Vergleich der intrinsischen und SDS-induzierten enzymatischen Aktivitäten zeigte, dass durch Zugabe des Aktivators zu den KLH1-UE und dem Fragment KLH1-abc eine über 100-fache Steigerung des relativen L-DOPA-Umsatzes erzielt werden konnte (Tab. C5). Das Gleiche galt für die KLH1-DD und deren Dopamin-Umsatz. Bei diesen KLH-Proteinen konnte den entsprechenden Substraten durch den Aktivator SDS folglich ein besonders effizienter Zugang zum aktiven Zentrum gewährt werden.

Eine nur sehr geringe Steigerung der Mono- bzw. Diphenolase-Aktivitäten um etwa den Faktor 10, ergab sich bei den KLH1-UE mit *p*-cresol bzw. Dopamin. Auch bei den KLH1-Didekameran und dem Fragment KLH1-abc resultierte eine SDS-Inkubation in einer nur vergleichsweise geringen Steigerung des *p*-cresol-Umsatzes um den Faktor 25.

Bei den übrigen Messungen konnte durch SDS-Applikation eine Umsatz-Steigerung um den Faktor 30 – 60 erreicht werden, was in etwa zwischen den stärksten und schwächsten Aktivierungsraten lag.

13.6 Einfluss von Effektoren auf die relativen Substrat-Umsätze des KLH nach SDS-Aktivierung

Für Arthropoden-Hämocyane konnte bereits ein steigernder bzw. inhibitorischer Einfluss verschiedener Puffersubstanzen oder zweiwertiger Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} auf die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Dissertation Nillius, 2007). Um einen solchen Effekt eventuell auch für die TY- bzw. CO-Aktivität des Gastropoden-Hämocyans aus *Megathura crenulata* nachzuweisen und somit eventuell eine Steigerung der nur schwachen Monophenolase-Aktivität zu erzielen, wurde der Einfluss dieser Effektoren quantitativ am Beispiel der KLH2-UE untersucht.

13.6.1 Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf die relativen Umsatzraten des KLH

Um einen etwaigen Einfluss der Puffersubstanz auf die enzymatische Aktivität der KLH2-UE nachzuweisen, wurde gemäß der vorherigen Kapitel ein MBTH-Assay durchgeführt und die relativen Substrat-Umsätze anhand der Zunahme der OD_{505nm} photometrisch bestimmt (Abb. C65, Tab. C6). Als Puffersubstanz wurde 100 mM Na-Phosphat pH 7,0 verwendet, wie er bei bisher allen Messungen zum Einsatz kam (Tab. C3, C4) und die relativen Umsatzraten mit denjenigen bei Verwendung von 50 mM Tris pH 7,0 (Reaktionsansatz mit pH 7,4) verglichen. Tris wurde gewählt, da sich bei den Messungen der KLH-Didekamere meist eine im Vergleich zu den UE höhere Aktivität zeigte (Kap. C13.4.2 bis C13.4.6). Gemäß früherer Studien sollte sich für die UE jedoch generell eine höhere Aktivität als bei höher oligomerisierte Didekamere nachweisen lassen (Siddiqui *et al.*, 2006). Bei den Messungen dieser Arbeit lagen die Didekamere in Tris-haltigem Stabilisierungs-Puffer mit Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen gelöst vor, um deren Dissoziation in UE zu vermeiden. Daher wurde zunächst untersucht, ob Tris ein aktivitätsfördernder Effekt zugeschrieben werden kann. Mit Ausnahme der Puffersubstanzen erfolgten die Messungen gemäß der Versuchsbedingungen der vorherigen Kapitel (Tab. C6).

Substrat	Konz.	Proteinkonz.	MBTH	Puffer	Aktiv.	Messdauer	Vol.
Catechol	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	- 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 50 mM Tris, pH 7,0	2 mM SDS	3 Min.	1 ml
Dopamin	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	- 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 50 mM Tris, pH 7,0	2 mM SDS	20 Min.	1 ml
L-DOPA	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	- 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 50 mM Tris, pH 7,0	2 mM SDS	20 Min.	1 ml
Tyramin	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	- 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 50 mM Tris, pH 7,0	2 mM SDS	ü.N. (800 Min.)	1 ml
<i>p</i> -cresol	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	- 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0 - 50 mM Tris, pH 7,0	2 mM SDS	60 Min.	1 ml

Tab. C6: Versuchsbedingungen zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Puffersubstanzen auf die TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C.

Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

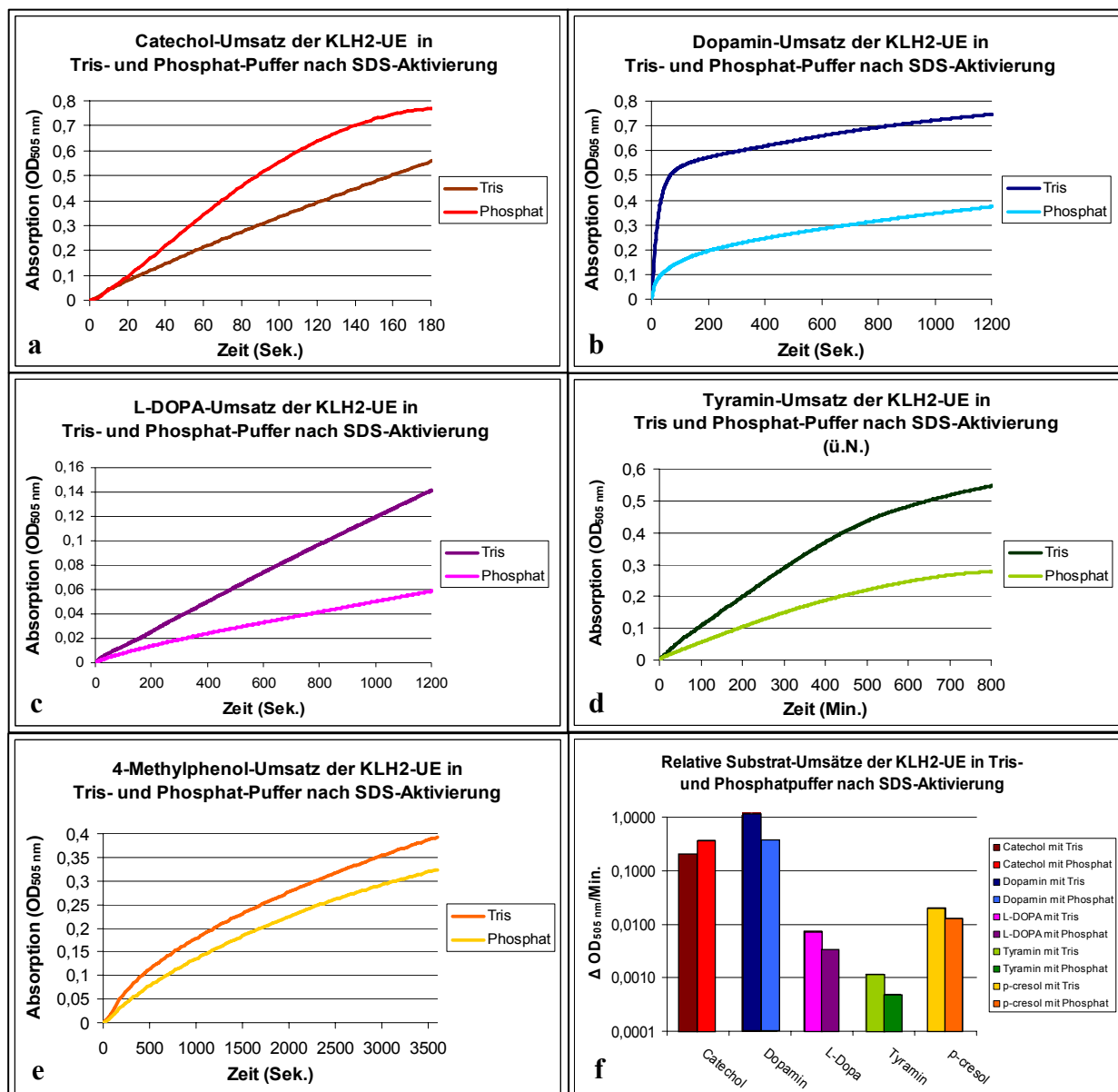


Abb. C65: Vergleich der verschiedenen Substrat-Umsätze der KLH2-UE in Tris- und Phosphat-Puffer nach SDS-Aktivierung (s. Tab. C7).

a – e) Messung der Absorption bei 505 nm nach Zugabe von Catechol (a), Dopamin (b), L-DOPA (c) Tyramin (d) und 4-Methylphenol (e) zu den aktivierten KLH2-UE. Die Messung des Monophenols Tyramin (d) erfolgte über Nacht (ü.N.). f) Halblogarithmische Darstellung der relativen Substrat-Umsätze (Änderung der OD_{505nm}/Min.) der KLH2-UE im *steady state* nach Zugabe der entsprechenden Substrate. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C. Die Ansätze enthielten 4 mM Substrat, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml (a – c) bzw. 1,0 mg/ml (d, e) Protein. Bei allen Messungen wurde der Leerwert bzw. die Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Als Puffer dienten 50 mM Tris- bzw. 100 mM Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert von jeweils 7,0. Erläuterungen im Text.

Protein	Substrat	OD _{505nm} /Min Phosphat	OD _{505nm} /Min. Tris	Faktor der rel. Steigerung/Hemmung
KLH2-UE	Catechol	0,3741	0,1965	2
	Dopamin	0,3468	1,1913	3
	L-DOPA	0,0033	0,0075	2
	Tyramin	0,0005	0,0012	2
	p-cresol	0,0127	0,0206	2

Tab. C7: Vergleich der verschiedenen Substrat-Umsätze der KLH2-UE in Tris- und Phosphat-Puffer nach SDS-Aktivierung (s. Abb. C65).

Eine Puffer-induzierte Steigerung des relativen Substrat-Umsatzes ist violett, eine Hemmung blau gekennzeichnet.

Die Wahl des Tris-Puffers resultierte beim diphenolischen Substraten L-DOPA sowie bei den Monophenolen Tyramin und *p*-cresol in einem doppelt so hohen relativen Substrat-Umsatz. Mit Dopamin konnte im *steady state* sogar eine Verdreifachung der Menge an gebildetem MBTH-Produkt verzeichnet werden (Abb. C65 b – f und Tab. C7). Lediglich beim Catechol kam es zu einem gegenläufigen Effekt, so dass der Tris-Puffer hier einen inhibitorischen Effekt ausübte und den relativen Substratumsatz sogar um die Hälfte reduzierte (Abb. C65 a, f und Tab. C7). Zudem konnte das beim Catechol-Umsatz in Phosphat-Puffer schon nach drei Minuten übliche Ausfallen des gebildeten MBTH-Produktes in Tris-Puffer aufgrund der Abschwächung der Aktivität noch nicht festgestellt werden. Hier kam es vielmehr zu einem linearen Anstieg des Substrat-Umsatzes ohne eine starke Mess-Streuung gegen Messende. Beim Dopamin resultierte die Wahl des Tris-Puffers in einem sofortigen und sehr starken Anstieg des Substrat-Umsatzes. Bereits nach einer Minute kam es zu einer deutlichen Abschwächung der enzymatischen Aktivität, was sich durch den beginnenden Eintritt in die *Plateauphase* darstellte (Abb. C65 b). Der gleiche Effekt trat auch mit Phosphat-Puffer auf, der somit in einem ähnlichen Kurvenverlauf, allerdings aufgrund der dreifach niedrigeren relativen Umsatzrate auch in einer deutlich flacheren Kurve resultierte. Vergleichbare Beobachtungen konnten entsprechend auch bei den Substraten L-DOPA, Tyramin und *p*-cresol gemacht werden (Abb. C65 c – e).

Die Messungen bestätigten somit den ursprünglichen Verdacht eines aktivitätssteigernden Effekts des Tris-Puffers und können zur Klärung der bisher festgestellten höheren enzymatischen Aktivität der Didekamere im Vergleich zu den UE herangezogen werden (Kap. C13.4.2 bis C13.4.6). Auch die bisher eher gegensätzlichen Beobachtungen für die Messungen der Oligomere mit Catechol (Kap. C13.5, Abb. C63 a, b) finden nun eine Rechtfertigung durch den hier nachgewiesenen inhibitorischen Einfluss des Tris-Puffers.

13.6.2 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die relativen Umsatzraten des KLH

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von Tris-Puffer bei den meisten Substraten in einer Steigerung der relativen Umsatzraten resultierte (Kap. C13.6.1), sollte als nächstes auch der Einfluss der zweiwertigen Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} untersucht werden. Letztere waren neben Tris ebenfalls im Stabilisierungs-Puffer in einer Konzentration von 5 mM vorhanden und sind neben einem neutralen pH-Wert für die Aufrechterhaltung der oligomeren, nativen Form der KLH-Didekamere essenziell. Als Puffersubstanz der MBTH-Ansätze kam, wie bereits beim Kap. C13.6.1, 50 mM Tris, pH 7,0, mit 0/10/20 mM $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ zum Einsatz (Reaktionsansatz mit pH 7,4). Messungen in Phosphat-Puffer (Tab. C3 und C4) waren aufgrund des zu erwartenden Ausfallens von Magnesium- bzw. Calciumphosphat und der daraus bedingten starken Streuung im Photometer nicht möglich. Die Messungen erfolgten am Beispiel der SDS-aktivierten KLH2-UE anhand der Substrate Dopamin und Tyramin (Abb. C66). Die übrigen Messbedingungen entsprachen, mit Ausnahme der Puffersubstanz, denen der vorherigen Kapitel (Tab. C8).

Substrat	Konz.	Proteinkonz.	MBTH	Puffer	Aktiv.	Messdauer	Vol.
Dopamin	4 mM	0,2 mg/ml	0,2 mM	50 mM Tris, mit 0/10/20 mM MgCl ₂ pH 7,0	2 mM SDS	20 Min.	1 ml
Tyramin	4 mM	1 mg/ml	0,2 mM	50 mM Tris, mit 0/10/20 mM MgCl ₂ pH 7,0	2 mM SDS	60 Min.	1 ml

Tab. C8: Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung des Einflusses verschiedener Konzentrationen an MgCl₂ auf die TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C. Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

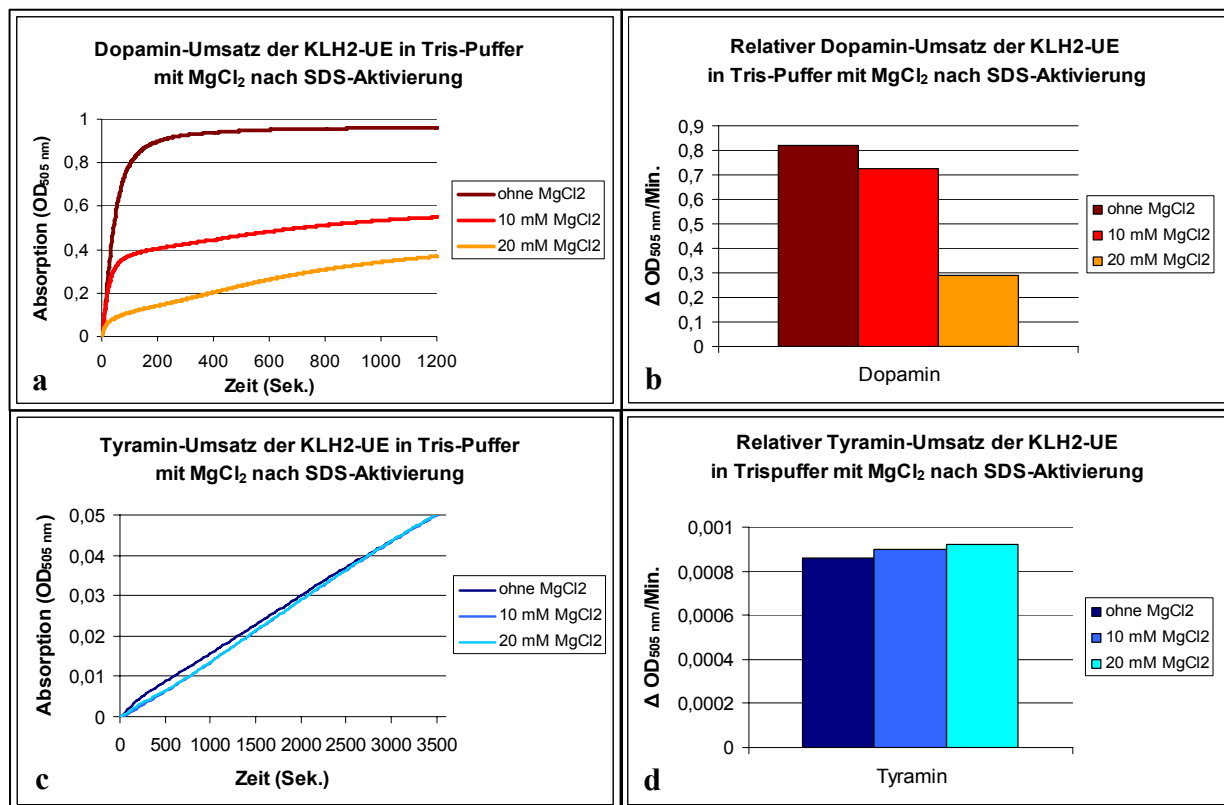


Abb. C66: Vergleich des relativen Dopamin- und Tyramin-Umsatzes in Tris-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂ (s. Tab. C9).

a, c) Messung der Absorption bei 505 nm nach Zugabe von Dopamin (a) und Tyramin (c) zu den aktivierten KLH2-UE in Tris-Puffer mit verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen. b, d) Aus a) und c) ermittelte relative Substrat-Umsätze (Änderung der OD_{505nm}/Min.) der KLH2-UE im *steady state* nach Zugabe der entsprechenden Substrate in Tris-Puffer mit verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen. Die photometrischen Messungen des MBTH-Assays erfolgten für 20 Min (a, b) bzw. eine Std. in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bei 25 °C. Die Ansätze enthielten 4 mM Substrat, 0,2 mM MBTH, 2 mM SDS und 0,2 mg/ml (a, b) bzw. 1,0 mg/ml (c, d) Protein. Bei allen Messungen wurde der Leerwert bzw. die Autooxidation (ohne Protein/Enzym) abgezogen. Als Puffersubstanz diente 50 mM Tris, pH 7,0, mit 0/10/20 mM MgCl₂. Erläuterungen im Text.

Protein	Substrat	OD _{505nm} /Min ohne MgCl ₂	OD _{505nm} /Min. 10 mm MgCl ₂	OD _{505nm} /Min. 20 mm MgCl ₂	Faktor der rel. Steigerung/Hemmung
KLH2UE	Dopamin	0,8199	0,7269	0,2916	1,3/2,8
	Tyramin	0,00086	0,0009	0,00092	1,05/1,07

Tab. C9: Vergleich des relativen Dopamin- und Tyramin-Umsatzes in Tris-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂ (s. Abb. C66).

Eine MgCl₂-induzierte Steigerung des relativen Substrat-Umsatzes ist violett, eine Hemmung blau gekennzeichnet.

Beim Umsatz des diphenolischen Dopamins zeigte sich in 50 mM Tris-Puffer ohne MgCl_2 , wie bereits in Abb. C65 b (Kap. C13.6.1) unter gleichen Bedingungen, ein sehr starker relativer Substrat-Umsatz durch die aktivierten KLH2-UE in der ersten Minute. Bereits nach drei Minuten war die *Plateauphase* erreicht, und es fand keine Produktbildung mehr statt (Abb. C66 a). Nach Zugabe von 10 mM MgCl_2 nahm der relative Substrat-Umsatz, bei ansonsten vergleichbarem Kurvenverlauf, um den Faktor 1,3 ab. Bis zum Messende nach 20 Minuten wurde hier nur noch etwa die Hälfte an MBTH-Produkt gebildet (Abb. C66 a, b, Tab. C9). Nach einer Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration auf 20 mM, kam es zu einer weiteren Inhibition der enzymatischen Aktivität, so dass die relativen Umsatzraten im Vergleich zum Puffer ohne MgCl_2 , insgesamt um den Faktor 2,8 zurückgingen. Entsprechend konnte bei der Messung der Zunahme der $\text{OD}_{505\text{nm}}$ ein deutlich flacherer Kurvenverlauf beobachtet werden (Abb. C66 a). Eine vollständige Kompensation des beim Dopamin-Umsatz festgestellten aktivitätsfördernden Effekts des Tris-Puffers (Kap. C13.6.1, Abb. C65) durch den inhibitorischen Effekt des MgCl_2 (Abb. C66 a, b) kann jedoch ausgeschlossen werden, da das Salz bei den Messungen der Didekamere nur in einer Konzentration von 5 mM im Stabilisierungs-Puffer vorlag.

Beim Monophenol Tyramin konnte für die Mg^{2+} -Ionen hingegen kein inhibitorischer Einfluss nachgewiesen werden. Nach Messung der Absorption bei 505 nm lieferten alle Kinetiken, sowohl ohne MgCl_2 , als auch mit 10 mM oder 20 mM MgCl_2 , ein ähnliches Resultat. Nach der für Monophenole typischen *Lagphase* von ~ 90 Sekunden kam es zu einem linearen Anstieg des Tyramin-Umsatzes, wobei keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Umsatzraten zu verzeichnen war (Abb. C66 c, d). In Tris-Puffer ohne MgCl_2 kam es zunächst zu einem etwas stärkeren Anstieg der Aktivität, die jedoch nach etwa 10 Minuten wieder zurückging und dann einen im Vergleich zu den Messungen mit 10 mM bzw. 20 mM MgCl_2 geringeren relativen Substrat-Umsatz zeigte. Somit kann eventuell von einer minimalen Steigerung der Monophenolase-Aktivität durch Zugabe von zweiwertigen Kationen ausgegangen werden. Um von einer signifikanten Aktivitätssteigerung zu sprechen, müsste der SDS-induzierte Tyramin-Umsatz vermutlich generell höher sein, als er bisher in dieser Arbeit beim KLH beobachtet werden konnte (Kap. C13.4.5, Abb. C61). Nichtsdestotrotz blieb ein inhibitorischer Effekt, wie er beim diphenolischen Dopamin auftrat (Abb. C66 a, b), hier gänzlich aus. Die Verwendung von noch höheren Konzentrationen an zweiwertigen Kationen (> 20 mM) im Tris-Puffer resultierte in einer starken Streuung der Ansätze im Photometer. Dies lässt sich vermutlich auf das Ausfallen des KLH zurückführen, da es unter ansonsten gleichen Bedingungen ohne Protein zu keiner Trübung der Ansätze kam.

Bei den Messungen mit CaCl_2 kam es schon bei Konzentrationen von 10 mM CaCl_2 zu einer Zunahme der Streuung, da Calcium in Verbindung mit SDS Kalkseife ($\text{Ca}(\text{DS})_2$) bildet, die unter den Reaktionsbedingungen ausfällt. Der Einfluss dieses Effektors konnte daher nicht ermittelt werden.

14 Thermodynamische Charakterisierungen des KLH

Bei den thermodynamischen Studien am KLH standen zwei unterschiedliche Aspekte im Mittelpunkt des Interesses. Zunächst sollte die temperaturabhängige Stabilität dieses komplexen Moleküls auf der Ebene der Quartär-, Tertiär und Sekundärstrukturebene untersucht werden und diese Ergebnisse schließlich auf den funktionellen Aspekt des Proteins übertragen werden. Die Erhaltung der biologischen Funktion als Sauerstofftransportprotein ist besonders bezüglich der Anwendung des Mollusken-Hämocyanins (speziell des KLH) in der experimentellen Biochemie, Immunologie und Medizin von entscheidender Bedeutung. Sequenzdaten, Röntgenstrukturen und Cryo-TEM-Daten konnten in den letzten Jahren bereits einen detaillierten Einblick in die Struktur, Funktion und Topologie der UE und FUs der Mollusken-Hämocyanine geben und auch das Dissoziations- bzw. Reassoziationsverhalten ist bekannt (Orlova *et al.*, 1997; Cuff *et al.*, 1998; Lieb *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2004; Gebauer *et al.*, 2002; Dolashka-Angelova *et al.*, 2003; Perbandt *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2000, 2007; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften wie der Erhaltung des nativen Konformationszustand unter Hitzeeinwirkung sind bisher jedoch nur wenige Informationen verfügbar. Diese sind jedoch speziell beim KLH als Immunstimulator und Vazincarrier von entscheidender Bedeutung und wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Auch der Einfluss des Oligomerisierungszustands sowie verschiedener Effektoren auf die thermische Stabilität war Bestandteil dieses Themas.

14.1 Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener Oligomerisierungszustände des KLH mittels Differenz Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Bevor mittels Differenz Scanning-Kalorimetrie (DSC) die Schmelzpunkte (Halbumwandlungstemperaturen, T_m) von (Di)dekameren, UE und einigen FUs beider KLH-Isoformen ermittelt werden konnten (Abb. C68), musste zunächst eine geeignete Puffersubstanz gefunden werden. Diese sollte während der starken Erhitzung nur eine geringfügige Änderung des pH-Wertes zeigen, mit optimaler Pufferung bei neutralem pH-Wert (Tab. C10).

Puffersubstanz	pK	d(pH)/dT
Acetat	4,75	0
Glycin (-NH ₃ ⁺)	9,8	-0,026
Hepes	7,5	-0,012
MOPS	7,2	-0,012
MOPS*	7,2	-0,009
Phosphat	7,2	-0,002
Pipes	6,9	-0,007
Tris	8,0	-0,028

Tab. C10: Häufig eingesetzte Puffer mit pK (25 °C) und Änderung des pH-Wertes je Grad Celsius. Die blau unterlegten Angaben zu d(pH)/dT von MOPS* wurden experimentell bestimmt (Abb. C67) und waren geringfügig niedriger als bei den Literaturangaben. Quelle: M. Holtzhauer, „Methoden der Proteinanalytik“, 1996.

Da die experimentell ermittelte Änderung des pH-Wertes für die Puffersubstanz MOPS mit $-0,009/^\circ\text{C}$ niedriger lag als bei anderen Puffersubstanzen mit vergleichbarem pK (Tab. C11) und Phosphat-Puffer aufgrund des Einsatzes von NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ nicht verwendet werden konnte, wurden die Proteinproben in MOPS-Puffer pH 7,2 gelöst. Die Salze waren bei den Messungen der (Di)dekamere essenziell, um eine frühzeitige Dissoziation der oligomeren Moleküle zu verhindern. Ein zusätzlicher Einfluss derselben auf $d(\text{pH})/dT$ konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. C67).

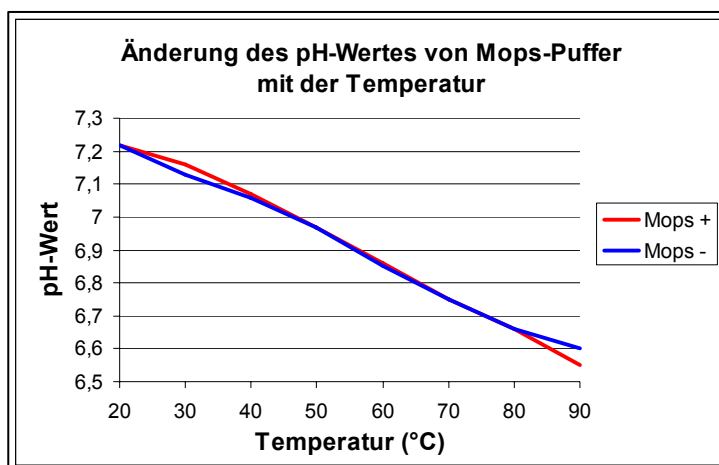


Abb. C67: Änderung des pH-Wertes von MOPS-Puffer mit der Temperatur.

Der pH-Wert von MOPS-Puffer mit (MOPS+) und ohne NaCl, MgCl₂, CaCl₂ (MOPS-) nahm bei Erhitzung von 20 °C - 90 °C in ähnlicher Weise ab. Da $d(\text{pH})/dT$ mit $-0,009/^\circ\text{C}$ niedriger lag, als bei anderen Puffersubstanzen mit vergleichbarem pK (Tab. C10), wurden die Proben für die DSC-Messungen in MOPS-Puffer pH 7,2 gelöst.

Bei den UE beider Isoformen wurde auf die Zugabe von NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ verzichtet, da die Salze bei neutralem pH eine Reassoziaton zu größeren Molekülaggregaten begünstigen. Die Messung der Dekamere erfolgte bei einem erhöhten pH-Wert von 8,5, um eine Reassoziaton zu Didekameren zu verhindern. Die Proteinkonzentrationen der Proben lagen bei den DSC-Messungen zwischen $\sim 1 - 2$ mg/ml. Lediglich die FU KLH2-c und das Fragment KLH1-abc waren nicht in größeren Mengen rein zu isolieren, so dass sich eine geringere Proteinkonzentration ergab (Tab. C11). Die Erhitzung der Proben erfolgte jeweils von 20 ° - 90 °C mit einer Scanrate von 90 °C/Stunde.

Protein	Proteinkonz.	Puffer	Scanrate	Temperatur
KLH1-Didekamere	1,1 mg/ml	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH2- Didekamere	1,5 mg/ml	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH1-Dekamere	2 mg/ml	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 8,5	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH1-UE	1 mg/ml	20 mM MOPS pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH2-UE	2 mg/ml	20 mM MOPS pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH1-abc	0,2 mg/ml	20 mM MOPS pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH1-h	0,8 mg/ml	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C
KLH2-c	0,02 mg/ml	20 mM MOPS 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂ pH 7,2	90 °C/Std.	20 ° - 90 °C

Tab. C11: Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener KLH-Proteine mittels DSC.

Von den regulären Versuchsbedingungen abweichende Bedingungen sind blau markiert.

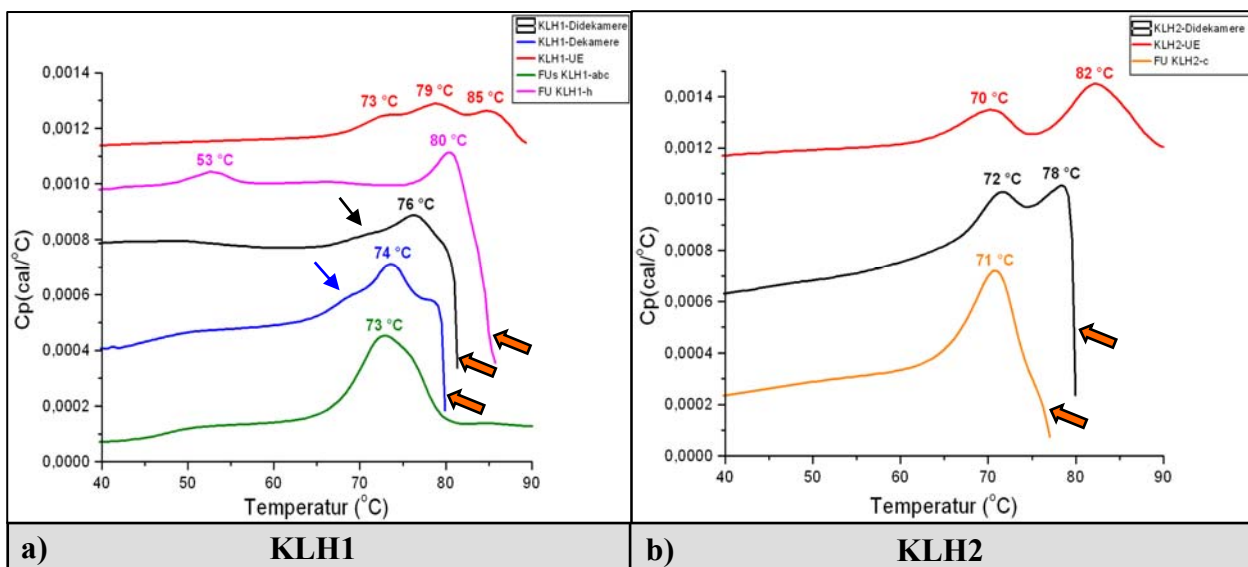


Abb. C68: Schmelzpunktbestimmung verschiedener KLH-Proteine mittels DSC.

a) Schmelzkurven der KLH1-Didekamere (schwarz), KLH1-Dekamere (blau), KLH1-UE (rot) sowie der FUs KLH1-abc (grün) und KLH1-h (rosa). Der blaue bzw. schwarze Pfeil deutet auf einen eventuell zusätzlichen Schmelzpunkt hin, der vom Hauptgipfel überdeckt wurde. b) Schmelzkurven der KLH2-Didekamere (schwarz), KLH2-UE (rot) und der FU KLH2-c (orange). Die Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2 bzw. 8,5 (Dekamere), der mit Ausnahme des Fragments KLH1-abc und der KLH-UE zusätzlich NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ enthielt. Die orangefarbenen Pfeile deuten auf eine Präzipitation, die bei hohen Temperaturen in Proben mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ auftrat. Gemessen wurde von 20 ° – 90 °C mit einer Scanrate von 90 °C/Std. Die Schmelzpunkte sind über den jeweiligen Gipfeln angegeben. Erläuterungen im Text.

Die Messungen der Schmelzkurven ergaben für die Didekamere des KLH1 einen T_m von 76 °C (schwarze Kurve in Abb. C68 a). Bei den geringer oligomerisierten Dekameren lag er mit 74 °C etwa gleich hoch (blaue Kurve). Ein bei beiden Messungen kaum sichtbarer kleinerer Gipfel bei etwa 70 °C, ließ auf eine bereits beginnende Proteinfaltung schließen, deren Gipfel im Thermogramm allerdings durch den Hauptgipfel verdeckt wurde (schwarzer und blauer Pfeil in Abb. C68 a). Die FU KLH1-h zeigte einen kleineren Gipfel bei 53 °C und einen T_m bei 80 °C (rosafarbene Kurve), was auf eine im Vergleich zu den (Di)dekameren höhere Thermostabilität der kragenbildenden FU schließen ließ. Der Gipfel bei 53 °C ließ sich vermutlich auf proteolytisch beeinträchtigte und weniger stabile Abbauprodukte der Probe zurückführen, die speziell bei der Aufreinigung der FU-h vermehrt auftraten (Kap. C8). Bei diesen drei Messungen mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ im Puffer fiel auf, dass es nach Erreichen des T_m ab ca. 80 °C zu einem steilen Abfall der Wärmekapazität in Verbindung mit einer Präzipitation des Proteins kam (orangefarbene Pfeile). Nach Messung der KLH1-UE in MOPS-Puffer ohne diese Salze, lieferte das Thermogramm drei Schmelzpunkte bei 73 °, 79 ° und 85 °C, ohne eine solche Präzipitation (rote Kurve in Abb. C68 a). Der T_m des Fragments KLH1-abc lag mit 73 °C in der Größenordnung der Didekamere und Dekamere, war allerdings deutlich niedriger als bei der kragenbildenden FU KLH1-h mit 80 °C (grüne Kurve in Abb. C68 a). Auch hier blieb ein starker Abfall der Wärmekapazität ab 80 °C aus, da im Gegensatz zur Messung der FU-h, keine Salze in der Probe vorhanden waren. Für die Didekamere des KLH2 ließen sich im Thermogramm zwei Schmelzpunkte bei 72 ° und 78 °C

ablesen (schwarze Kurve in Abb. C68 b). Die Messung der FU KLH2-c lieferte mit einem T_m von nur 71 °C den geringsten Schmelzpunkt aller getesteten KLH-Proteine (orangefarbene Kurve). Die KLH2-UE zeigten im Gegensatz zu den KLH1-UE nur zwei Gipfel, die allerdings mit 70 °C und 82 °C in einem ähnlichen Temperaturbereich angesiedelt waren (rote Kurve in Abb. C68 b). Auch hier wurde in Proben mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ eine unerwünschte Präzipitation beobachtet. Aufgrund des oftmals auftretenden steilen Abfalls der Wärmekapazität, war es vor allem bei den Messungen der (Di)dekamere beider Isoformen schwierig, einen festen T_m zu bestimmen oder eventuell zusätzliche endotherme Reaktionen bei höheren Temperaturen zu detektieren. Letztere konnten bei den Untereinheiten ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ z.B. noch bei 79 °, 82 ° und sogar 85 °C gemessen werden. Entsprechend konnte ΔC_p und ΔH bei den Messungen nicht ermittelt werden.

14.2 Nachweis der Irreversibilität der thermischen Entfaltung des KLH

Für zahlreiche andere Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei der Hitzedenaturierung um eine irreversible Kinetik handelt, da sich nach Abkühlung der denaturierten Probe und erneuter Erhitzung keine endotherme Reaktionen mehr feststellen ließen (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995; Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Idakieva *et al.*, 2005, 2006). Auch für das KLH konnte mittels DSC keine Reversibilität der Denaturierung gemessen werden (Abb. C69).

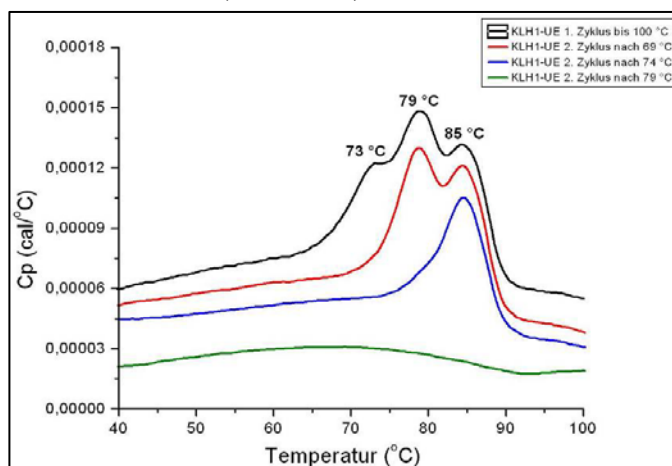


Abb. C69: Nachweis der irreversiblen thermischen Entfaltung der KLH1-UE mittels DSC.

Nach einmaligem Erhitzen der KLH1-UE auf 100 °C zeigten sich die bereits in Abb. C68 ermittelten Schmelzpunkte bei 73 °, 79 ° und 85 °C (schwarz). Ein weiterer Heizzyklus dieser Probe nach vorherigem Abkühlen auf 20 °C resultierte in keiner erneuten endothermen Reaktion (grün). Wurde die KLH1-UE jedoch im ersten Zyklus nur auf 69 °C erhitzt, kam es im nächsten Heizzyklus auf 100 °C, nach vorherigem Abkühlen, zu einem Verschwinden des ersten Gipfels, während die zweite und dritte Kurve mit Schmelzpunkten von 79 ° und 85 °C erhalten blieben (rot). Durch ein Erhitzen auf 74 °C verschwand entsprechend im nächsten Zyklus auch der zweite Gipfel, so dass nur noch der dritte Peak mit einem T_m von 85 °C im Thermogramm aufgezeichnet wurde (blau). Nach Überschreitung der 79 °C war im nächsten Zyklus der DSC keine endotherme Reaktion mehr nachweisbar (grün), und die Kurve glich derjenigen nach Erhitzung auf 100 °C. Somit konnte zwar nachgewiesen werden, dass sich die gesamte Schmelzkurve der KLH1-UE tatsächlich aus drei individuellen Gipfeln zusammensetzte, allerdings lieferten die Messungen auch den eindeutigen Beweis einer irreversiblen thermischen Denaturierung des KLH. Die Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2 ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ bei einer Scanrate von 90 °C/Std. Die Versuche wurden freundlicherweise von HD Dr. ██████████ durchgeführt.

Nach Abkühlung des ersten Heizzyklus (20 ° - 100 °C) auf 20 °C, resultierte eine erneute Aufheizung der KLH1-UE in keiner sichtbaren endothermen Reaktion (grüne Kurve in Abb. C69). Durch eine schrittweise Erhitzung auf Temperaturen, die jeweils etwas unterhalb der drei Schmelzpunkte der KLH1-UE lagen (Abb. C68), konnte nachgewiesen werden, dass sich die gesamte Schmelzkurve der UE aus drei individuellen, endothermen Schmelzgipfeln zusammensetzte (rote und blaue Kurve in Abb. C69). Allerdings resultierte jede Aufheizung bis annähernd zum jeweiligen T_m , in einem Verschwinden des entsprechenden Gipfels, beim erneuten Erhitzen auf 100 °C nach vorherigem Abkühlen auf 20 °C. So zeigte sich bei einem erneuten Heizzyklus auf 69 °C, keine endotherme Schmelzkurve mehr mit einem T_m von 73 °C (rote Kurve). Entsprechendes konnte nach Erhitzung auf 74 °C für den zweiten Gipfel mit einem Schmelzpunkt von 79 °C beobachtet werden, so dass schließlich nur noch der letzte endotherme Peak mit einem T_m von 85 °C aufgezeichnet wurde (blaue Kurve). Nach Überschreitung der 79 °C war im nächsten Zyklus der DSC keine endotherme Reaktion mehr nachweisbar (grüne Kurve), und die Schmelzkurve ähnelte derjenigen nach Erhitzung auf 100 °C. Diese Ergebnisse lassen sich somit als Folge einer irreversiblen Auffaltung verstehen. Irreversible thermische Denaturierungen sind kinetisch kontrollierte Prozesse, die somit von der Scanrate abhängig sind. Diese Abhängigkeit konnte, als zusätzlicher Beweis einer irreversiblen Denaturierungskinetik, auch anhand des KLH belegt werden (Abb. C70). Hierzu wurden die KLH1-UE in MOPS-Puffer pH 7,2, mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml jeweils von 20 ° - 90 °C mit Scanraten von 15 °, 30 ° und 90 °C in der DSC erhitzt, um eventuelle Unterschiede in den T_m -Werten zu ermitteln.

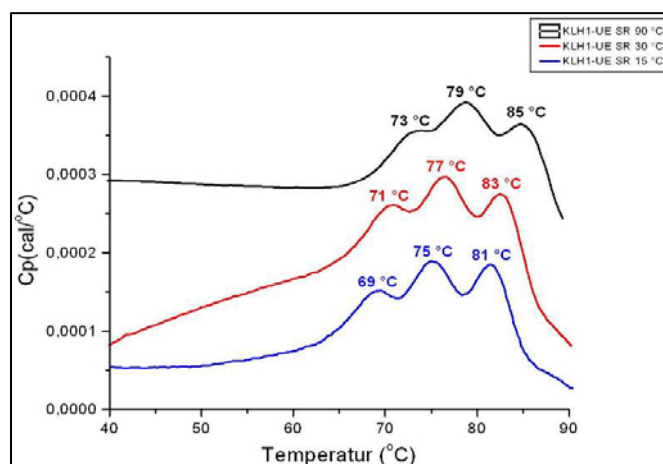


Abb. C70: Abhängigkeit der thermischen Denaturierung der KLH1-UE von der Scanrate.

Da irreversible thermische Denaturierungen kinetisch kontrollierte Prozesse sind, zeigen sie eine Abhängigkeit von der Scanrate. Eine Erhitzung der KLH1-UE in der DSC von jeweils 20 ° - 90 °C, mit Scanraten von 15 °C (rot), 30 °C (blau) und 90 °C (schwarz), resultierte in einem Anstieg der Schmelzpunkte um jeweils 2 °C. Dies deutete somit eindeutig auf eine zeitabhängige und damit irreversible thermische Denaturierung des KLH hin. Die Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2 ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂. Die Schmelzpunkte sind über den jeweiligen Gipfeln angegeben.

Durch eine Variation der Scanraten konnte exemplarisch anhand der KLH1-UE eindeutig gezeigt werden, dass die thermische Entfaltung bzw. Denaturierung eine zeitabhängige und damit irreversible, endotherme Reaktion war. So fielen die bereits in Abb. C 68 a) ermittelten

Schmelzpunkte der KLH1-UE von 73 °, 79 ° und 85 °C bei einer Scanrate von 90 °C/Std., um jeweils 2 °C bei einer Erhitzung mit 30 °C/Std. und um weitere 2 °C bei einer Aufheizung mit nur noch 15 °C/Std. (Abb. C70). Aufgrund dieser Abhängigkeit von der Scanrate denaturierte das KLH bei einer nur langsamen Erhitzung bereits deutlich früher und ließ sich durch Abkühlung nicht wieder reversibel zurückfalten.

14.3 Einfluss von SDS auf die thermische Stabilität des KLH

Zur Induzierung einer Phenoloxidase-Aktivität des KLH war SDS als Aktivator größtenteils essenziell bzw. konnte die Aktivität beträchtlich steigern (Kap. C8). Die Ursachen hierfür liegen in einer SDS-induzierten, leichten Auffaltung des Proteins begründet, die somit einen Substratzugang verbessern oder sogar erst ermöglichen. Dass die native Quartärstruktur des KLH dennoch erhalten bleibt, konnte bereits mittels TEM und DLS gezeigt werden (Kap. C13.4.1, Abb. C57). Um den Einfluss des Detergenz SDS auch hinsichtlich der thermischen Stabilität des KLH zu untersuchen, wurden die KLH1-UE ohne Aktivator, sowie mit 1 mM bzw. 2 mM SDS inkubiert und anschließend in der DSC von 20 ° - 90 °C, bei einer Scanrate von 90 °C/Std. gemessen (Abb. C71). Die KLH1-UE waren in MOPS-Puffer pH 7,2 ohne CaCl₂, MgCl₂ und NaCl₂ gelöst, bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml.

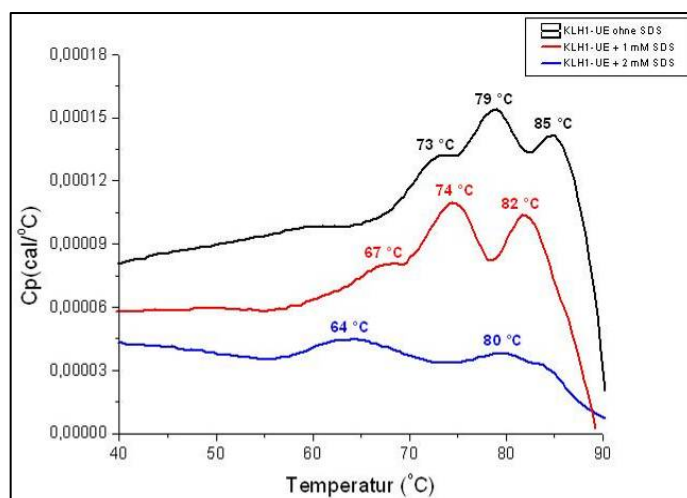


Abb. C71: Einfluss von SDS auf die thermische Stabilität der KLH1-UE.

Die KLH1-UE wurden ohne und mit 1 mM bzw. 2 mM SDS inkubiert und anschließend von 20 ° - 90 °C in der DSC gemessen. Ohne Detergenz ergab sich ein typisches DSC-Thermogramm (schwarz) mit drei Schmelzpunkten bei 73 °, 79 ° und 85 °C (vgl. Abb. C68 – 70). Nach Zugabe von 1 mM SDS nahm die thermische Stabilität der UE bereits etwas ab, wobei die T_m-Werte auf 67 °, 74 ° und 82 °C fielen (rot). Der typische Kurvenverlauf mit drei Schmelzpunkten blieb allerdings erhalten. Eine Applikation von 2 mM SDS resultierte in einer noch geringeren Stabilität der Proteine, wobei nur noch zwei sehr schwache, endotherme Reaktionen bei 64 °C und 80 °C aufgezeichnet wurden. Die Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2 ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂.

Die DSC-Messung ohne SDS lieferte ein für die KLH1-UE typisches Thermogramm mit drei Schmelzpunkten bei 73 °, 79 ° und 85 °C (schwarze Kurve in Abb. C71). Nach Zugabe von 1 mM des Detergenz nahm die thermische Stabilität bereits ab, mit T_m-Werten von nur noch 67 °, 74 ° und 82 °C (rote Kurve). Der Kurvenverlauf blieb allerdings in gleicher Form

erhalten, wie bei der Messung ohne Aktivator. Eine Applikation von 2 mM SDS resultierte hingegen in einer starken Destabilisierung der KLH1-UE, so dass nur noch zwei sehr schwache, endotherme Reaktionen messbar waren. Die Schmelzpunkte lagen etwa bei 64 °C und 80 °C (blaue Kurve). Somit war eine Konzentration von 1 mM SDS eine kritische Grenze, bei der die Struktur des KLH zumindest aus thermodynamischen Gesichtspunkten bei Erhitzung noch weitestgehend erhalten blieb, die Stabilität aufgrund der niedrigeren Schmelzpunkte jedoch schon beeinträchtigt war.

14.4 Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Quartärstruktur der KLH1-Didekamere im TEM

Die DSC-Messungen gaben bereits einen ersten Einblick in die endothermen Reaktionen während der irreversiblen Denaturierung der verschiedenen Oligomerisierungszustände des KLH. Zusätzlich konnten anhand der aufgezeichneten Schmelzpunkte Rückschlüsse über die thermischen Stabilitäten der unterschiedlichen Proteine gezogen werden (Kap. C14.1). Allerdings konnten die DSC-Kurven keinen unmittelbaren Aufschluss darüber geben, in welchem Grad der Auffaltung oder Denaturierung sich die Proteine bei der jeweiligen Temperatur befanden. Besonderes Interesse galt diesbezüglich dem Verhalten der KLH-Didekamere, da diese im DSC-Thermogramm zwei Schmelzpunkte bzw. endotherme Reaktionen bei ca. 72 ° und 76 ° – 78 °C zeigten (schwarze Kurven in Abb. C68). Eventuell könnte der erste Gipfel das Ergebnis eines Zerfalls der Didekamere in kleinere Dekamere oder UE gewesen sein. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, wurden die KLH1-Didekamere in MOPS-Puffer pH 7,2 mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ für 20 Minuten im Heizblock auf Temperaturen von 25 °, 40 °, 60 ° und 70 °C erhitzt und dessen Zustand anschließend im TEM überprüft. Um zusätzlich den Einfluss der Salze auf die thermische Stabilität zu untersuchen, erfolgten parallel Ansätze in MOPS-Puffer ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ (Abb. C72).

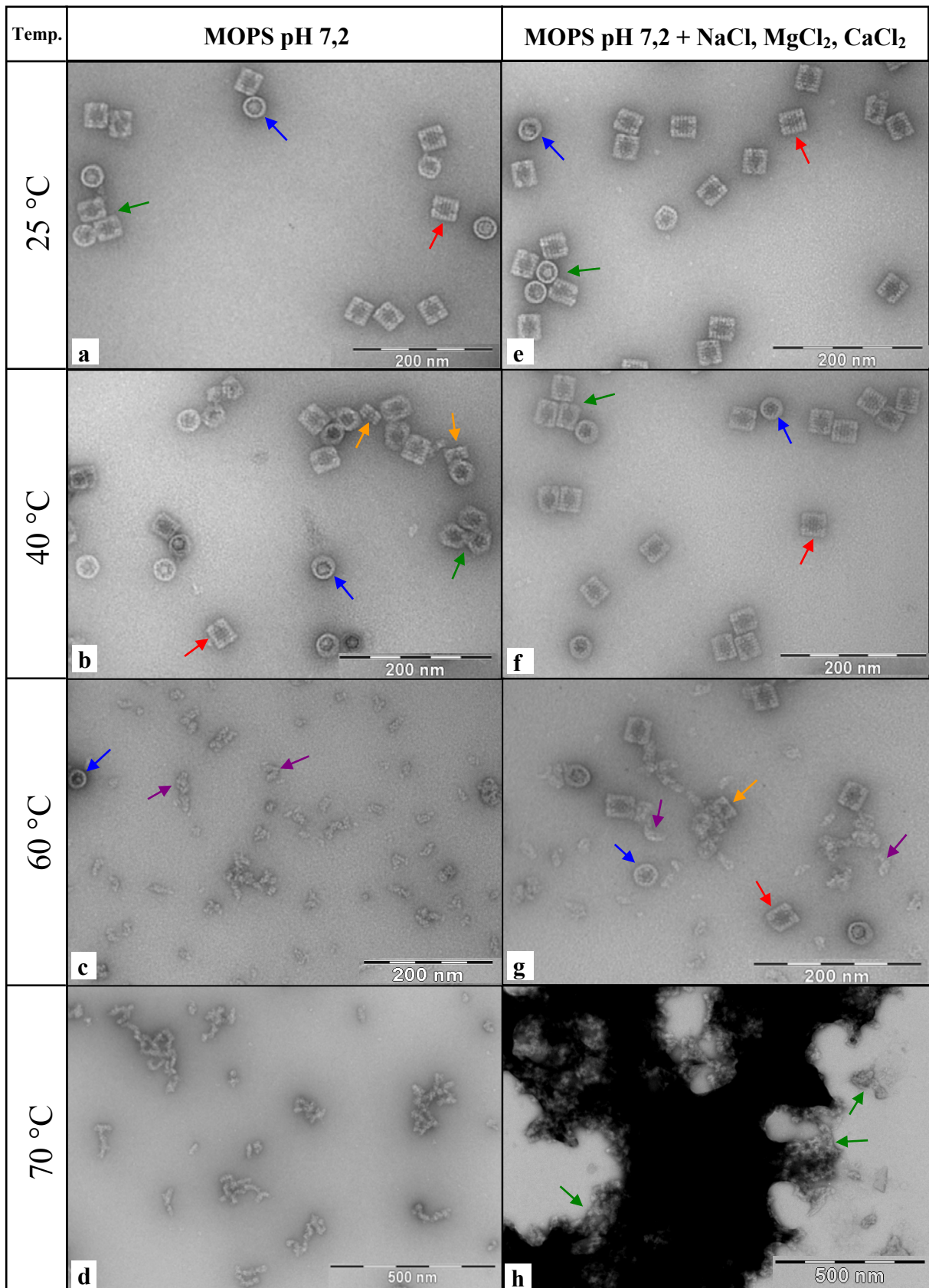


Abb. C72: Bestimmung der thermischen Stabilität der KLH1-Didekamere im TEM.

a – d) TEM-Aufnahmen nach 20-minütiger Erhitzung der KLH1-Didekamere bei 25 ° (a), 40 ° (b), 60 ° (c) und 70 °C (d) in MOPS-Puffer pH 7,2. e – h) TEM-Aufnahmen unter gleichen Bedingungen wie a) – d), allerdings in MOPS-Puffer pH 7,2 mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂. blaue Pfeile: Aufsicht; rote Pfeile: Seitenansicht; grüne Pfeile: Didekamer-Cluster; orangefarbene Pfeile: Dekamere in Seitenansicht; violette Pfeile: UE. Erläuterungen im Text.

Bei Raumtemperatur (25 °C) zeigten sich im TEM, sowohl in MOPS-Puffer mit, als auch ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂, die typischen nativen Quärtärstrukturen des KLH1 in Form von einzelnen Didekameren und kleineren Clustern (Abb. C72 a, e). Bei dieser niedrigen Temperatur konnten noch keine Unterschiede bezüglich der thermischen Stabilität der Moleküle festgestellt werden. Erst ab 40 °C war im Puffer ohne Salze eine beginnende Auffaltung der Didekamere zu erkennen (Abb. C72 b), während im Ansatz mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ alle Moleküle nach wie vor intakt zu sein schienen und denen bei 25 °C ähnelten (Abb. C72 f). Zudem fiel auf, dass in den Proben ohne Salze, bei dieser Temperatur mehr Dekamere sichtbar waren, als im Ansatz mit zweiwertigen Kationen im Puffer (orange-farbene Pfeile in Abb. C72 b). Eine Temperaturerhöhung der salzfreien Proben auf 60 °C resultierte in einem nahezu vollständigen Zerfall der (Di)dekamere in kleinere Bruchstücke, wobei es sich vermutlich um UE handelte, die teilweise auch schon in einen Denaturierungszustand übergegangen waren (violette Pfeile in Abb. C72 c). Didekamere waren nur noch sehr vereinzelt im TEM auszumachen (blauer Pfeil in Abb. C72 c). Ein gänzlich anderes Bild zeigte sich in den Proben mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂. Zwar kam es auch hier zu einem Zerfall der Hohlzylinder in eine Vielzahl von Bruchstücken/UE, allerdings war die Anzahl an sichtbaren Didekameren beträchtlich höher, als in den Proben ohne Salze (Abb. C72 g). Dass es bei Temperaturen um die 60 °C auch mit zweiwertigen Kationen bereits zu einer Destabilisierung der Didekameren kam, zeigte sich einerseits anhand der beginnenden Auffaltung der Moleküle, andererseits an dem vermehrten Vorkommen von Dekameren in der Probe. Dieser Zustand der Moleküle entspricht somit, mit Ausnahme der zahlreichen Bruchstücke, den Beobachtungen in MOPS-Puffer ohne Salze bei nur 40 °C. Eine Erhitzung des KLH ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ auf 70 °C, führte zu einer vollständigen Denaturierung auch der UE, die bei dieser hohen Temperatur zu größeren Aggregaten „verklebten“ (Abb. C72 d). Auffällig war die Beobachtung nach Inkubation des KLH bei diesen Temperaturen mit Salzen. Scheinbar kam es durch die zweiwertigen Kationen zu einer Clusterbildung der Didekamere riesigen Ausmaßes, die schließlich im Zentrum bei 70 °C komplett verbrannten und im TEM nur noch als schwarze Flächen zu erkennen waren (Abb. C73 h). An den Rändern dieser Flächen ließen sich jedoch teilweise noch Didekamer-ähnliche Strukturen nachweisen (grüne Pfeile in Abb. C72 h). Somit ließ sich der steile Abfall der Hitzekapazität in der DSC (Abb. C68), auch im TEM als salzinduzierte Präzipitation riesiger Didekamer-Cluster nachweisen.

14.5 Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH mittels CD-Spektroskopie

Nach Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener Oligomerisierungsformen des KLH in der DSC, sowie der Visualisierung der thermischen Stabilität der KLH1-Didekamere im TEM, stellte sich die Frage, inwiefern die Sekundärstrukturelemente der Proteine nach Erhitzung erhalten blieben. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte zwar ab 60 °C ein Zerfall der Didekamere in kleinere Bruchstücke beobachtet werden (Abb. C72 c, g), allerdings war es anhand dieser Methoden nicht möglich festzustellen, ob es bei diesen Temperaturen bereits zu einer Denaturierung kommt, die in einer Zerstörung der Sekundärstrukturelemente resultierte, bzw. bis zu welchem Temperaturbereich diese intakt blieben. Aus diesem Grund wurden sowohl die Didekamere, als auch die UE des KLH1 im Wasserbad für jeweils 10 Minuten auf Temperaturen zwischen 40 ° - 90 °C erhitzt und anschließend CD-Spektren aufgenommen, um diese mit Spektren der Proteine bei Raumtemperatur (20 °C) bezüglich der Anteile an Sekundärstrukturelementen zu vergleichen (Abb. C73). Eine Auffaltung der Proteine sollte sich anhand eines steigenden Anteils an Zufallsknäueln entsprechend spektroskopisch messen lassen (Abb. B19). Die Protein-konzentration der Proben lag bei 0,3 mg/ ml, wobei die Didekamere in MOPS-Puffer pH 7,2 mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ gelöst waren, während bei den Messungen der UE auf eine Zugabe der Salze verzichtet wurde, um einen etwaigen stabilisierenden Einfluss zweiwertiger Kationen, auch auf der Ebene der Sekundärstrukturen, nachweisen zu können.

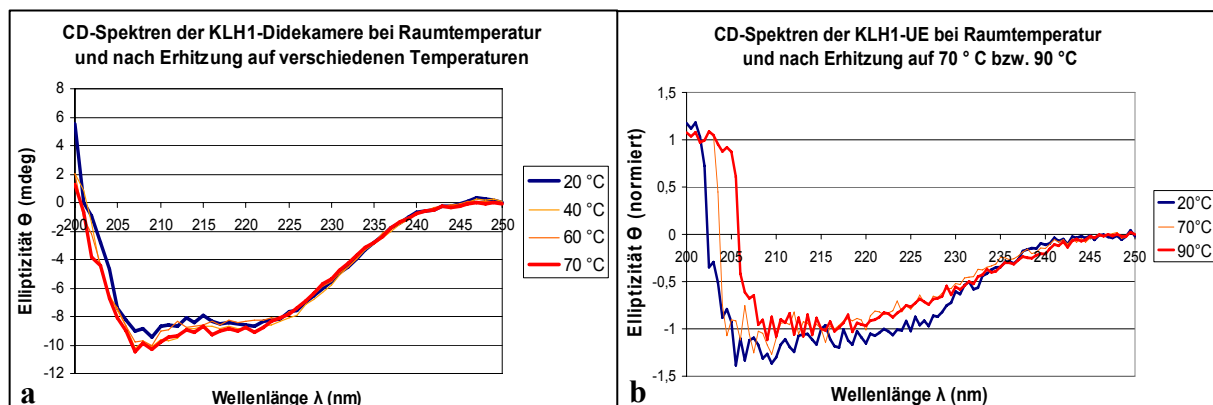


Abb. C73: Bestimmung der thermischen Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH mittels CD-Spektroskopie.

a) CD-Spektren der KLH1-Didekamere in MOPS-Puffer pH 7,2 mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ bei Raumtemperatur sowie nach Erhitzung auf 40 °, 60 ° und 70 °C. b) CD-Spektren der KLH1-UE in MOPS-Puffer pH 7,2 ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ bei Raumtemperatur sowie nach Erhitzung auf 70 ° bzw. 90 °C. Als Folge von Konzentrationserhöhungen durch Verdunstungsverluste beim Heizen, kam es in b) zu Änderungen in der Intensität der gemessenen Absorptionsdifferenzen. Daher wurden die Graphen bei 215 nm auf den Wert 1 normiert, um einen Formvergleich anstellen zu können. Erläuterungen im Text.

Die Messungen der CD-Spektren der Didekamere und UE bei Raumtemperatur zeigten die typischen Formen eines α -Helix-Spektrums, da diese beim KLH das Spektrum dominieren (Abb. C73). Nach Erhitzung der KLH1-Didekamere auf 40°, 60 ° oder sogar 70 °C ergaben sich keine signifikanten Änderungen in den Absorptionsdifferenzen der jeweiligen Spektren

(Abb. C73 a). Eine zu erwartende deutliche Verminderung von $\Delta\epsilon$ sowie eine Veränderung der Form des Spektrums, als Folge der Zunahme an Zufallsknäueln durch beginnende Denaturierung, war nicht festzustellen. Auch bei den UE des KLH1 ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ im Puffer, ließ sich im CD-Spektrum selbst nach Erhitzung auf 90 °C noch das typische α -Helix-Spektrum erkennen (Abb. C73 b). Allerdings kam es bei diesen Messungen als Folge von Konzentrationserhöhungen durch Verdunstungsverluste beim Heizen zu Änderungen in der Intensität der gemessenen Absorptionsdifferenzen. Daher wurden die Graphen bei 215 nm auf den Wert 1 normiert, um einen Formvergleich anstellen zu können. Dieser ergab, im Vergleich zu den Didekameran, ein geringfügig flacheres CD-Spektrum nach Erhitzung auf 70 ° bzw. 90 °C. Dieser Effekt könnte als Folge der geringeren Stabilität ohne zweiwertige Kationen interpretiert werden, die wiederum in einer früheren Denaturierung bzw. Ausbildung von Zufallsknäueln des Proteins resultierte. Des Weiteren fiel bei jeder Messung mit höherer Temperatur eine Verschiebung der Spektren in Richtung größerer Wellenlängen auf. Dies lässt sich durch zunehmende Streuung erklären, die durch die mit steigender Temperatur ebenfalls zunehmende Aggregation denaturierter Proteine aufkommt. Auch dies spricht somit für eine geringere thermische Stabilität der Sekundärstrukturen ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂.

14.6 Untersuchungen zur Sauerstoffbeladung des KLH mit zunehmender Temperatur mittels Absorptionsspektroskopie

Da mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, dass auch die Sekundärstrukturelemente des KLH noch bis deutlich über 70 °C intakt blieben (Kap. C14.5), stellte sich vor allem im Hinblick auf die biologische Bedeutung des Hämocyanins als Sauerstofftransporter die Frage nach dem Grad der Oxygenierung der aktiven Zentren mit zunehmender Temperatur. Daher wurden die KLH1-Didekamere in MOPS-Puffer pH 7,2 mit NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ sowie die FUs KLH1-h und KLH2-c im gleichen Puffer ohne Salze, im Wasserbad auf Temperaturen zwischen 40 ° - 70 °C erhitzt und anschließend Absorptionsspektren von 250 – 500 nm im *Cary 300 Spektrometer* (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) gemessen (Abb. C74). Die Aufheizung erfolgte mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten je Temperaturintervall. Bei den FUs dienten Spektren bei Raumtemperatur als Vergleich, um eine etwaige Deoxygenierung anhand der Abnahme der Absorptionsintensität bei 345 nm feststellen zu können. Die Proteinkonzentrationen lagen bei 0,5 mg/ml bei den Didekameran sowie 0,2 mg/ml bei den FUs KLH1-h und KLH2-c.

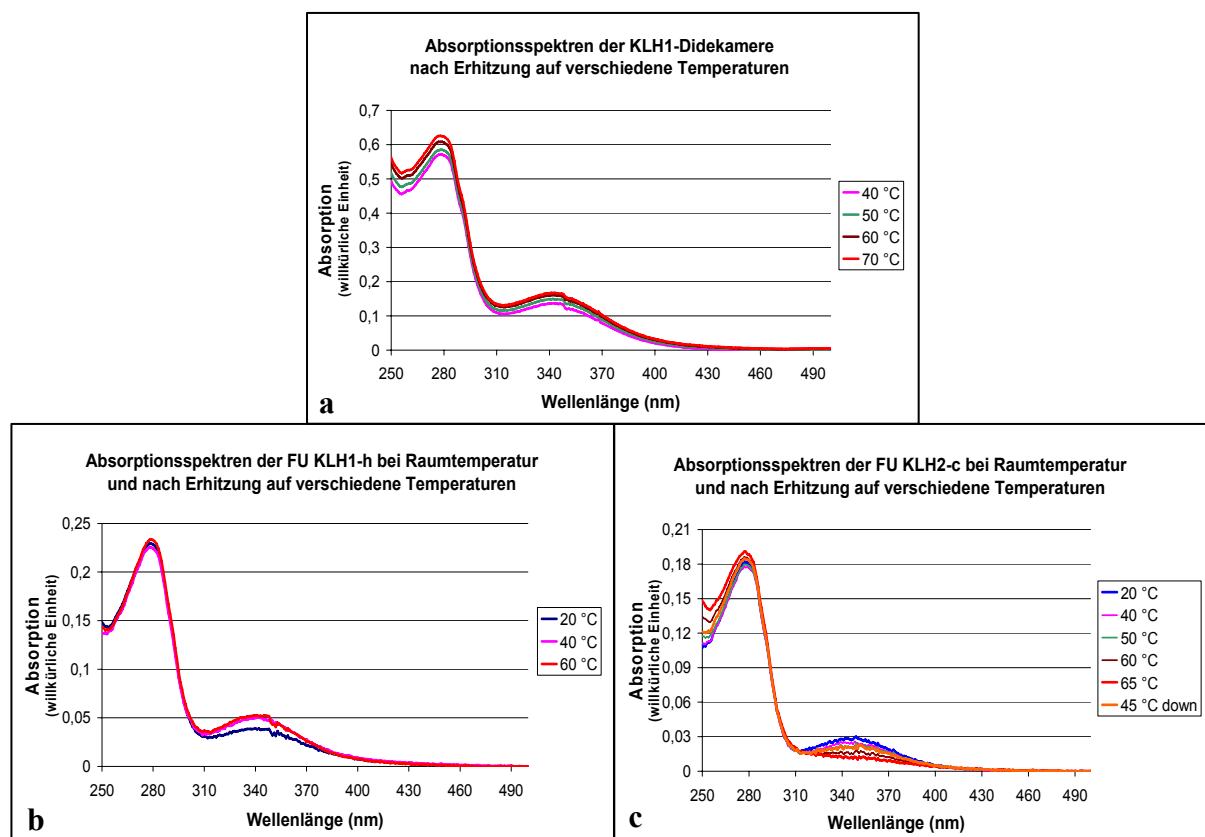


Abb. C74: Bestimmung der Sauerstoffbeladung verschiedener KLH-Proteine mit zunehmender Temperatur mittels Absorptionsspektroskopie.

a) Absorptionsspektren der KLH1-Didekamere nach Erhitzung auf 40 °, 50 °, 60 ° und 70 °C. b) Absorptionsspektren der FU KLH1-h bei Raumtemperatur (20 °C) sowie nach Erhitzung auf 40 ° und 60 °C. c) Absorptionsspektren der FU KLH2-c bei Raumtemperatur (20 °C) sowie nach Erhitzung auf 40 °, 50 °, 60 und 65 °C. Zusätzlich wurde ein Spektrum nach Abkühlung von 65 ° auf 45 °C gemessen (45 °C „down“). Die Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2, der bei den Didekameren zur Stabilisierung zusätzlich NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ enthält. Als Folge von Konzentrationserhöhungen durch Verdunstungsverluste beim Heizen kam es zu einer Absorptionzunahme, so dass die Spektren bei 500 nm durch Abzug des *Offsets* auf Null gesetzt wurden, um die Absorptionsmaxima bei 345 nm vergleichen zu können. Der bei allen Graphen sichtbare Sprung bei 350 nm resultierte aus dem Umschalten der Lampe im Photometer (UV→Vis). Erläuterungen im Text.

Die Absorptionsspektren der KLH1-Didekamere zeigten eine mit der Temperaturerhöhung leicht steigende Absorptionsintensität. Dies lässt sich als Folge von Konzentrationserhöhungen durch Verdunstungsverluste beim Heizen erklären. Um die Absorptionsmaxima bei 345 nm dennoch vergleichen zu können, wurden die Spektren bei 500 nm durch Abzug des *Offsets* auf Null gesetzt. So war bei den KLH1-Didekamern selbst bei 70 °C noch eine signifikante Sauerstoffbeladung vorhanden, da es zu keiner Abnahme der Absorptionsintensität des Sauerstoffbindungs-zentrums bei 345 nm kam (Abb. C74 a). Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Messungen der FU KLH1-h. Nachdem die hohe thermische Stabilität dieser FU bereits mittels DSC-Messungen anhand des hohen Schmelzpunktes festgestellt werden konnte (Abb. C68 a), lieferte die Absorptionsspektroskopie nun auch den Nachweis, dass die FU-h selbst bei 60 °C noch uneingeschränkt seine physiologische Funktion als Sauerstofftransportprotein ausüben kann. Ein Vergleich mit den Messungen bei Raumtemperatur zeigte kein Absinken der Absorptionsintensität bei 345 nm bei diesen Temperaturen (Abb. C74 b). Die Spektren der FU-c des KLH2 ergaben hingegen eine mit

steigender Temperatur fortschreitende Deoxygenierung (Abb. C74 c). Bei etwa 65 °C war keine Absorption mehr bei 345 nm messbar, so dass von einer vollständigen Deoxygenierung ausgegangen werden konnte. Um festzustellen, ob eine Abkühlung der erhitzten Probe in einer reversiblen Oxygenierung resultierte, wurde bei 45 °C erneut ein Spektrum der FU-c im Photometer gemessen. Die Absorptionsintensität dieser Probe bei 345 nm erreichte hierbei annähernd Werte, wie sie bei der ersten Erhitzung auf 50 °C gemessen wurden, so dass die Abkühlung in einer erneuten Sauerstoffbeladung resultierte. Der bei allen Graphen sichtbare Sprung bei 350 nm resultierte aus dem Umschalten der Lampe im Photometer (UV→Vis).

14.7 Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Tertiärstrukturen des KLH mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Absorptionsspektren der KLH1-Didekamere und der FU KLH1-h zeigten selbst bei Temperaturen über 60 °C, im Vergleich zur Messung bei 20 °C, keine Abnahme der Absorption bei 345 nm (Abb. C74 a, b). Dies deutete bereits auf eine nach wie vor uneingeschränkte Oxygenierung des aktiven Zentrums bei solch hohen Temperaturen hin. Eine Sauerstoffbeladung bei hohen Temperaturen bedarf allerdings auch einer nach wie vor intakten Tertiärstruktur der in unmittelbarer Nachbarschaft des katalytischen Zentrums befindlichen Reste des KLH. Da ein Fluoreszenzspektrum erheblich sensitiver für die unmittelbare Umgebung der chromophoren Gruppe ist als ein Absorptionsspektrum, kann die Änderung der Trp-Fluoreszenz daher sehr gut für das Verfolgen von Denaturierungsreaktionen verwendet werden. Um die thermische Stabilität der Tertiärstrukturen zu untersuchen, wurden anhand der KLH1-Didekamere, -UE sowie der FU KLH1-h, Fluoreszenzspektren von 300 – 450 nm im *Hitachi F 4500 Fluoreszenz-Spektrometer* (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd) bei Raumtemperatur und nach Erhitzung auf Temperaturen zwischen 40 ° - 85 °C gemessen (Abb. C75). Die Proben waren hierbei in MOPS-Puffer pH 7,2 gelöst, bei einer Proteinkonzentration zwischen 0,15 - 0,25 mg/ml. Bei den Messungen der Didekamere wurde dem Puffer zusätzlich NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ hinzugefügt, um eine höhere Stabilität der oligomeren Moleküle nach Erhitzung zu gewährleisten. Allerdings konnte die Probe mit diesen Salzen nicht über 70 °C erhitzt werden, da es ansonsten zu einer Präzipitation des Proteins gekommen wäre (Kap. C14.4, Abb. C72). Die Aufheizung erfolgte jeweils mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten je Temperaturintervall.

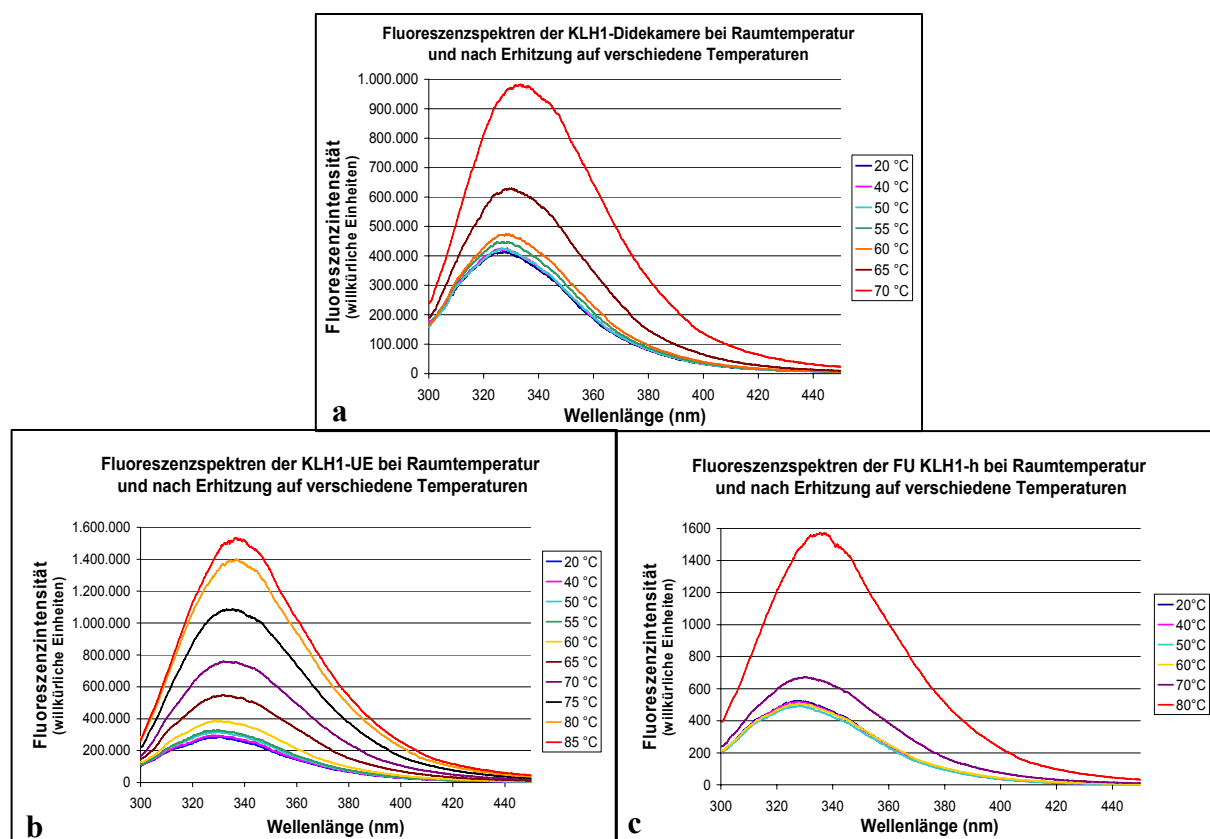


Abb. C75: Bestimmung der thermischen Stabilität der Tertiärstruktur verschiedener KLH-Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie.

a) Fluoreszenzspektren der KLH1-Didekamere bei Raumtemperatur und nach Erhitzung auf 40 ° - 70 °C. b) Fluoreszenzspektren der KLH1-UE bei Raumtemperatur und nach Erhitzung auf 40 ° - 85 °C. c) Fluoreszenzspektren der FU KLH1-h bei Raumtemperatur und nach Erhitzung auf 40 ° - 80 °C. Alle Messungen erfolgten in MOPS-Puffer pH 7,2. Zur Stabilisierung der Didekamere wurde dem Puffer zusätzlich NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ hinzugefügt. Erläuterungen im Text.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der KLH1-Didekamere blieben bis 50 °C nahezu konstant. Innerhalb einer Temperaturspanne von 50 ° - 60 °C konnte ein leichter Anstieg der Intensitäten beobachtet werden, die von 65 ° - 70 °C schließlich sprunghaft anstiegen. Diese Ergebnisse sprachen für eine nach wie vor vorhandene Sauerstoffbindung bis etwa 60 °C, während die starke Zunahme der ursprünglich vom Cu₂-O₂-Komplex über Förster-Transfer gequenchten Tryptophan-Fluoreszenz ab 65 °C auf eine stetig fortschreitende Deoxygenierung der Didekamere hindeutete (Abb. C75 a).

Bei den KLH1-UE lieferten die Fluoreszenzspektren ein vergleichbares Ergebnis, auch wenn es hier bereits ab 40 °C zu einem geringfügigen Anstieg der Emissionsintensitäten kam. Ab einer Temperatur von 55 °C zeigte sich jedoch auch hier ein stetiger und starker Anstieg der Intensitäten, was für eine zunehmende Deoxygenierung der UE sprach (Abb. C75 b).

Die abschließende Messung der FU KLH1-h resultierte in Fluoreszenzspektren, die eine besondere Resistenz der kragenbildenden FU bezüglich einer thermisch induzierten Deoxygenierung aufzeigte. So konnte bei der FU-h sogar eine Kontinuität der Fluoreszenzintensitäten bis 60 °C beobachtet werden. Erst oberhalb dieser Temperatur kam es zu einer beginnenden Deoxygenierung, die sich schließlich bis 80 °C immer weiter fortsetzte (Abb. C75 c).

Um sowohl die thermischen Stabilität, als auch die temperaturinduzierte Deoxygenierung der KLH1-Didekamere, -UE und der FU KLH1-h direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Änderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten sowie die Rotverschiebungen der Fluoreszenzmaxima aller Messungen in einem Diagramm zusammenfassend dargestellt (Abb. C76 a, b). Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten erfolgte hierbei durch Normierung der jeweils bei 20 °C gemessenen Fluoreszenzmaxima auf den Wert 1.

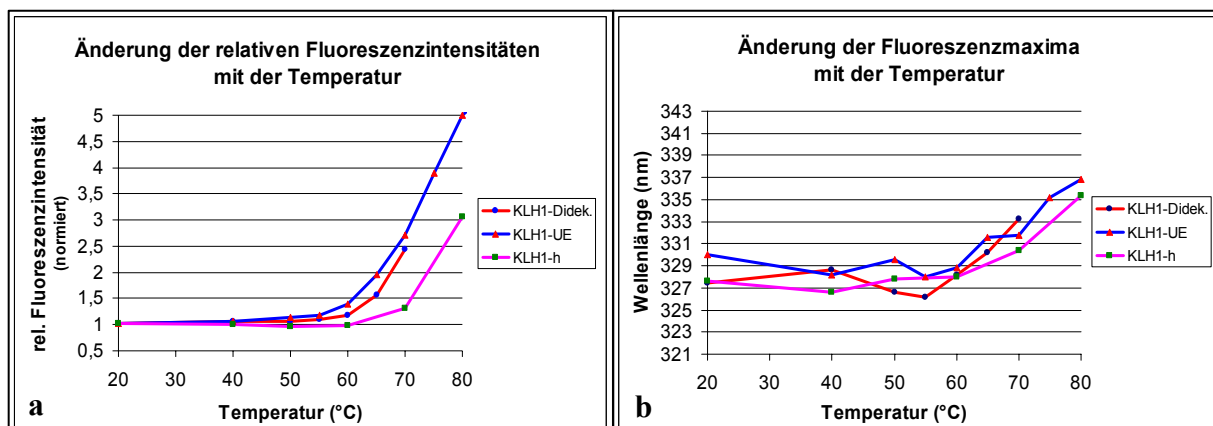


Abb. C76: Temperaturinduzierte Deoxygenierung und thermische Stabilität der Tertiärstrukturen verschiedener KLH-Proteine.

a) Änderung der relativen Fluoreszenzintensitäten von KLH1-Didekameran, -UE sowie der FU KLH1-h mit der Temperatur. Die Bestimmung der relativen Intensitäten erfolgte durch Normierung der Fluoreszenzmaxima aller Messungen (Abb. C75) bei 20 °C auf den Wert 1. b) Änderung der Fluoreszenzmaxima von KLH1-Didekameran, -UE sowie der FU KLH1-h mit der Temperatur. Erläuterungen im Text.

Der direkte Vergleich der temperaturabhängigen Zunahme der relativen Fluoreszenzintensitäten aller gemessenen Proteine, ergab für die UE bereits einen beginnenden Anstieg der Emissionen ab 40 °C, gefolgt von den Didekameran ab 50 °C und der FU-h ab 60 °C. Eine stark fortschreitende Deoxygenierung zeigte sich entsprechend bei der FU-h erst ab 70 °C, während diese bei den UE schon ab 60 °C einsetzte (Abb. C76 a). Betrachtet man hingegen die temperaturinduzierte Änderung der Fluoreszenzmaxima, konnte bei allen gemessenen Proben eine vergleichbare Rotverschiebung beobachtet werden. Generell lagen die Emissionsmaxima der nativen Proteine bei 20 °C, alle im Bereich zwischen 327 – 330 nm. Dies entsprach somit den für Hämocyaninen veröffentlichten Literaturwerten zwischen 321 – 331 nm und ist typisch für Trp-Reste, die sich in den inneren hydrophoben Regionen eines Proteins befinden (Teale, 1960; Burstein *et al.*, 1973). Eine Denaturierung des Proteins äußert sich durch eine Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima bis oberhalb von 340 nm, da die Trp-Reste der inneren hydrophoben Proteinbereiche in wässrige Umgebung gelangen. Da die Emissionsmaxima jedoch selbst bei Temperaturen von 80 °C noch deutlich unterhalb von 340 nm lagen, konnte man nicht von einer vollständigen Denaturierung der Proteine ausgehen, die eine Deoxygenierung hätten induzieren können (Abb. C76 b). Letztere könnte vielmehr das Ergebnis des temperaturinduzierten und irreversiblen Verlustes der Kupferatome aus dem aktiven Zentrum sein, was schließlich mit einer Deoxygenierung einhergeht. Die größte Rotverschiebung ergab sich bei 80 °C mit 337 nm bei den KLH1-UE, die somit

thermisch weniger stabil zu sein schienen als die FU-h mit 335 nm bei gleich hoher Temperatur. Auch der Verlauf der Kurve war bei der FU-h geringfügig flacher, und das Maximum verschob sich im Vergleich zu den Didekameran erst ab 70 °C deutlich in Richtung größerer Wellenlängen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen stehen somit im Einklang mit den DSC- und Absorptionsmessungen, wo sich bereits eine besondere thermische Stabilität sowie eine lang anhaltende Sauerstoffbindung für die FU KLH1-h bei hohen Temperaturen andeutete (Abb. C68 a und C74 b). Bei den KLH1-Didekameran konnten keine Emissionsmaxima bei 80 °C bestimmt werden, da es ab 70 °C zu einer Präzipitation des Proteins aufgrund der zusätzlichen Salze im Puffer kam. Bis zu einer Temperatur von 70 °C wurde bei den Didekameran jedoch, eine im Vergleich zu den UE, vergleichbare Rotverschiebung der Maxima beobachtet (Abb. C76 b). Allerdings kam es bei den KLH1-Didekamere erst ab Temperaturen von 65 °C zu einem stärkeren Anstieg der relativen Fluoreszenzintensitäten, während dies bei den UE schon bei 55 °C der Fall war. Die Ursachen hierfür lagen vermutlich im höheren Oligomerisierungsgrad der Didekamere begründet, was somit in Verbindung mit dem stabilisierenden Einfluss der zweiwertigen Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} erst bei höheren Temperaturen in einer Deoxygenierung resultierte.

D Diskussion

1 Röntgenstrukturanalyse der FU KLH1-h

1.1 Isolierung der FU KLH1-h

Eine Grundvoraussetzung für das Wachstum von Proteinkristallen ist eine sehr hohe Reinheit der Proteinprobe. Zudem muss das Protein in einer entsprechend großen Menge verfügbar sein, um zahlreiche Kristallisationsbedingungen austesten zu können. Die Strategien zur Isolierung der FU-h des KLH1 basierten auf vorhergehenden Studien von Söhngen *et al.* (1997), Gebauer & Harris (1999) und den Daten meiner Diplomarbeit (Büchler, 2004). Hier konnte bereits gezeigt werden, dass eine Spaltung der zuvor aufgereinigten KLH1-UE (Harris *et al.*, 1995) mit V8-Protease, in den Spaltprodukten KLH1-abc, -defg(h), -g, und -h resultiert. Der entscheidende Vorteil der Endoproteinase aus *Staphylococcus aureus* besteht darin, dass dieses Enzym sehr spezifisch, C-terminal nach Glutamat- und Aspartatseitenketten spaltet (Drapeau *et al.*, 1972; Houmard & Drapeau, 1972). Aufgrund der globulären Struktur der funktionellen Einheiten, resultieren limitierende Mengen des Enzyms daher überwiegend in einer Spaltung innerhalb der Linkerregionen, falls dort entsprechende Aminosäurereste vorhanden sind. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration konnte die Menge an abgespaltener FU-h, bei gleichzeitiger Abnahme der Anzahl an -defgh-Fragmenten, gesteigert werden (Gebauer & Harris, 1999). Eine Abtrennung der Spaltprodukte erfolgte mit Hilfe des starken Anionenaustauschers Q-Sepharose, wobei die FU-h nach Anwendung eines linear ansteigenden Cl⁻-Ionengradienten, rein in den Fraktionen des ersten Gipfels von der Säule eluierte. Die so erzielte Ausbeute an reiner FU-h war jedoch zu gering, um zahlreiche Kristallisationsbedingungen austesten zu können. Folglich musste eine Strategie entwickelt werden, um relativ einfach, möglichst viel der kragenformenden FU zu isolieren. Hierbei wurde die Trennmethode der Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) beibehalten, allerdings die Parameter Proteinmenge, Enzymkonzentration, Spaltdauer, pH-Wert, Elutionsgradient, Säulenmatrix und Säulenbettvolumen variiert. Bei einem isoelektrischen Punkt des KLH von ~ 5,7 (Produktbeschreibung VACMUNE[®] GMP-KLH Subunits Kit), musste ein entsprechend alkalischer pH-Wert von 8,0 gewählt werden, um eine optimale Bindung der Proteine an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Als Pufferion kam Tris zum Einsatz, da dieses die gleiche Ladung trägt, wie die stationäre Phase. Lokale pH-Störungen können so vermieden werden. Zur Optimierung der Aufreinigung wurden zunächst geringe Mengen an KLH1-UE proteolytisch gespalten und bei einem Gradienten von 0,16 - 0,5 M NaCl aufgetrennt. Hierbei ergaben sich zunächst nur sehr geringe Ausbeuten der FU-KLH1-h, die zudem noch stark mit anderen Fragmenten verunreinigt waren (Kap. C8, Abb. C26 a). Hohe Enzymmengen führten, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Söhngen *et al.* (1997) und Gebauer & Harris (1999), zu keiner Abspaltung von signifikant größeren Mengen an dieser

FU. Die Fraktionen waren zudem vermehrt mit kleineren Bruchstücken verunreinigt, die mit der FU-h co-eluierten. Man kann daher davon ausgehen, dass durch höhere Proteasekonzentrationen zunehmend auch Glu- und Asp-Reste innerhalb der globulären FUs gespalten werden und entsprechend mehr kleinere Fragmente entstehen. Die Anzahl der letzteren ließ sich durch deutlich geringere Proteasemengen verringern. Drapeau *et al.* (1972) konnten zeigen, dass die V8-Protease, neben pH 4,0, auch bei pH 7,8 ein Aktivitätsmaximum besitzt. Um trotz der geringeren Enzymmenge dennoch eine hohe Ausbeute zu erreichen, wurde der pH-Wert der Proteinlösung entsprechend von pH 9,6, auf 8,0 reduziert. Die Verwendung eines flacheren Elutionsgradienten von 0,16 - 0,4 M NaCl, führte zu einer weiteren Verbesserung des Reinheitsgrades und folglich gesteigerten Ausbeuten der FU-h (Kap. C8, Abb. C26 und Tab. C1). Nach Spaltung von größeren Mengen an KLH1-UE, die eine Säule mit höheren Säulenbettvolumina bedingen, konnten folglich mit nur einem Aufreinigungsschritt bis zu 9 mg (65 %) des ~ 60 kDa großen Proteins isoliert werden. Der Einsatz des schwächeren Anionenaustauschers DEAE führte zwar zur besseren Abtrennung der FU-h von größeren Fragmenten, allerdings waren die Fraktionen auch hier noch mit zahlreichen kleineren Bruchstücken kontaminiert (Kap. C8, Abb. C26 e, f). Dies kann durch den gewählten pH-Wert von 8,0 erklärt werden. DEAE (Diethylaminoethyl) ist ein schwacher Anionenaustauscher und bedarf einer vorherigen Protonierung, um negativ geladene Proteine optimal zu binden. Eine optimale Protonierung, wie im Falle des starken Anionenaustauschers Q-Sepharose, ist bei leicht alkalischen Bedingungen nicht gewährleistet. Daher binden bevorzugt größere Fragmente mit einer höheren negativen Gesamtladung, während kleinere Bruchstücke nach wie vor mit der FU-h co-eluieren. Um eine vollständige Entfernung der Bruchstücke zu erzielen, wurde daher die Methode der Gelfiltration angewandt, was in einer nahezu vollständigen Abtrennung der 60 kDa großen FU-h von den kleineren Fragmenten durch Größenfraktionierung resultierte (Kap. C11.2, Abb. C40 und C45). Da die nur 27 kDa große V8-Protease auf diesem Weg ebenfalls entfernt werden konnte, ergab sich im Gegensatz zu den verunreinigten und proteasehaltigen Proben (Kap. C11, Abb. C38 und C39) keine nachträgliche Kontamination der Probe durch anhaltende proteolytische Aktivität.

Bei den bereits verfügbaren Röntgenstrukturen der OdH-g und Rth2-e (Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2001) erfolgte die Aufreinigung der FUs ebenfalls mit Hilfe von limitierten proteolytischen Spaltungen. Die FU-g von *Octopus dofleini* wurde nach Miller *et al.* (1988) zunächst durch tryptischen Verdau in 0,05 M Ammoniumcarbonat-Puffer pH 8,0 abgespalten und anschließend über Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose) mit einem Gradienten von 0 – 0,5 M NaCl eluiert. Restliche Verunreinigungen konnten mittels Immunitäts-Chromatographie nach Lamy *et al.* (1979a, b) entfernt werden. Die Ausbeute von 25 mg der FU OdH-g bei 500 mg Ausgangsmaterial, war vergleichbar mit der Menge an rein isolierter FU KLH1-h dieser Arbeit. Zur Spaltung der Rth2-UE wurden die Proteasen Trypsin, Endopeptidase Glu-C und Plasmin verwendet (Perbandt *et al.*, 2001). Die Abtrennung der so gewonnen Mehrdomänen-Fragmente erfolgte mittels FPLC. Einzelne FUs konnten durch Hydrolyse der Fragmente mit Subtilisin DY und nachfolgender Aufreinigung

gewonnen werden. Zur Identifizierung der FUs von OdH und RtH wurden diese entweder N-Terminal sequenziert, oder immunologische Methoden eingesetzt. Die Strategien zur Isolierung der verschiedenen FUs sind somit mit denen der Aufreinigung der FU KLH1-h dieser Arbeit vergleichbar. Lediglich die Art der proteolytischen Spaltungen unterscheidet sich. Der Einsatz der bei OdH und RtH verwendeten Proteasen wie Trypsin wäre beim KLH zur Isolierung der FU-h von großem Vorteil, da diese sich sehr effizient durch Sulfonsäurefluoride wie PMSF oder *Pefabloc*[®] *SC* irreversibel inhibieren lassen (Kap. D1.3.2). Versuche zur homogenen Isolierung der FU KLH1-h mittels anderer Proteasen wie Trypsin, Papain oder Elastase waren bis heute allerdings nicht erfolgreich (Söhngen *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1999; Gebauer & Harris, 1999; Harris & Markl, 1999; Diplomarbeit Büchler, 2004).

1.2 Kristallisation der FU KLH1-h

Die Kristalle des *Hauptmann-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)* konnten am *Institut für Molekulare Biophysik* (Jun.-Prof. Dr. [REDACTED]) anhand der ermittelten Kristallisationsbedingungen reproduziert werden. Allerdings kam es bereits nach kurzer Zeit zu einer Auflösung der Kristalle, in Verbindung mit einer diffusen Niederschlagsbildung in den Ansätzen. Anhand eines Azocasein-Assay konnte nachgewiesen werden, dass in der Probe der isolierten FU KLH1-h, nach wie vor eine hohe proteolytische Aktivität vorhanden war (Kap. C11, Abb. C36; Kap. C11.2, Abb. C38 und C39). Dies führte dazu, dass ab einer bestimmten Lagerungszeit der Probe keine Kristallisation des Proteins mehr erreicht werden konnte. Die Ursachen liegen in einer zunehmenden Degradation des Proteins begründet, die schließlich in einer Verunreinigung der Probe mit zahlreichen Proteinfragmenten resultierte. Zur Kristallisation ist eine sehr hohe Proteinreinheit jedoch unabdingbar. Da die Lagerung der Probe außerhalb des Temperaturoptimums der *Staphylococcus aureus* V8-Protease bei 4 °C erfolgte, dauerte es entsprechend einige Zeit, bis die FU-h proteolytisch abgebaut war (Kap. C11, Abb. C36). Der pH-Wert der Proteinlösung von 8,0 könnte den Abbauprozess allerdings dennoch beschleunigt haben, da die V8-Protease hier ihr Aktivitätsmaximum besitzt (Sørensen *et al.*, 1991). Die sehr schnelle Auflösung der Proteinkristalle innerhalb weniger Tage, ist das Ergebnis einer schnellen Proteolyse aufgrund von deutlich höheren Temperaturen (20 °C) sowie eventuell auch des pH-Werts der Fällungsmittellösung von 4,0 (Kap. D1.3). Für diesen pH-Wert konnten Drapeau *et al.* (1972), bei Verwendung von Hämoglobin als Substrat, die höchste Aktivität der V8-Protease nachweisen. Um dennoch eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen, erfolgte die Aufnahme der Daten daher unmittelbar nach dem Wachstum der Kristalle. Eine nachfolgende proteolytische Zerstörung der Kristalle wurde durch Einfrieren derselben in flüssigem Stickstoff unterbunden. Anhand der Kristalle konnte an der Drehanode jedoch zunächst nur eine Auflösung der Röntgenstruktur von 8 Å bestimmt werden. Diese ließ sich am Synchrotron zwar bis auf 4 Å steigern (Kap. C10, Abb. C30), allerdings war die Auflösung noch immer zu niedrig, um einzelne Aminosäuren unterscheiden zu können (Kap. C10, Abb. C32). Zunächst

konnte man davon ausgehen, dass die in den Proben nach wie vor vorhandene V8-Protease bzw. die von ihr stammenden Verunreinigungen an kleineren proteolytischen Spaltprodukten, für die geringe Auflösung verantwortlich sein könnten. Dass die Kristallisation jedoch trotz dieser Fragmente erfolgreich war, könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche Reinigung der Probe als Folge der Kristallbildung sein. Die Ansätze zeigten häufig zunächst die Bildung eines diffusen Niederschlags, aus dem schließlich die Kristalle hervorgingen. Unter den gegebenen Bedingungen kam es daher vermutlich zunächst zu einer Abtrennung der verschiedenen großen und nicht kristallisierbaren Fragmente durch deren Präzipitation. Die nun ausreichend hohe Reinheit an homogener FU-h resultierte nachfolgend in deren Kristallisation. Durch weitere Aktivität der V8-Protease wurden die Kristalle schließlich zunehmend proteolytisch abgebaut, und die entstandenen Fragmente fielen ebenfalls aus. Die Abtrennung der kleineren Spaltprodukte und der V8-Protease mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC), führte zur Aufreinigung einer homogenen Probe der FU-h ohne proteolytische Aktivität (Kap. C11.2, Abb. C40 – 45). Nach Anwendung der ursprünglichen Kristallisationsbedingungen (mit V8-Protease und Verunreinigungen) konnte allerdings kein Kristallwachstum mehr beobachtet werden (Kap. C12, Abb. C47 b). Das Vorhandensein der V8-Protease und/oder der proteolytischen Fragmente war demnach essenziell, um unter den vom *HWI* ermittelten Bedingungen eine Kristallisation zu ermöglichen. Ein erneutes *Screening* der Probe ohne proteolytische Aktivität ergab jedoch vergleichbare Bedingungen einer Kristallisation (Kap. C12, Abb. C47 d). Eine Aufnahme von Röntgenstrukturdaten war anhand der zahlreichen und nur sehr kleinen Kristalle allerdings nicht möglich. Dass die Größe der Kristalle nach mehreren Wochen nicht zunahm, könnte ein Hinweis auf ungeordnete Proteinstrukturen innerhalb der Einheitszellen der Kristalle sein. Bei den größeren Kristallen der proteasehaltigen Probe sprechen die hohen Temperaturfaktoren, die sich aus der geringen Auflösung der Röntgenstruktur ergeben, ebenfalls für eine geringere Ordnung der Proteinstrukturen (Kap. C10, Abb. C34). Letztere könnte aus der Kristallisation einer inhomogenen Probe, mit unterschiedlich großen Spaltprodukten der FU-h, hervorgehen (Kap. D1.3, Abb. D2 – D3). Die sehr hohen B-Faktoren der C-terminalen Cupredoxin-Domäne der FU-h von bis zu 370 \AA^2 sprechen für eine hohe Flexibilität dieser Domäne innerhalb des Kristalls, der eventuell sogar eine biologische Funktion zu Grunde liegt.

1.3 Problematik der proteolytischen Aktivität der V8-Protease bei der Röntgenstrukturanalyse der FU KLH1-h

Die proteolytische Aktivität der V8-Protease innerhalb der aufgereinigten Probe der FU KLH1-h stellte sowohl bei der Kristallisation, als auch der Auswertung der Röntgenstrukturdaten (maximal zu erzielende Auflösung) das größte Problem dieser Arbeit dar. Daher soll in den nächsten beiden Kapiteln näher auf die Spezifität dieser Protease sowie die Möglichkeiten der Inhibition eingegangen werden, um in Hinblick auf nachfolgenden Studien bessere Lösungsansätze und Versuchsbedingungen etablieren zu können.

1.3.1 Spezifität der V8-Protease

Die V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* schneidet spezifisch nach Glutamat- und Aspartatresten und kann aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums als Serinprotease klassifiziert werden (Houmard & Drapeau, 1972; Drapeau, 1972, 1977; Prasad *et al.*, 2003). Sie besitzt zudem eine nahe Verwandtschaft mit pankreatischen Serinproteasen und kann durch spezifische Serinprotease-Inhibitoren wie DFP (Diisopropylfluorophosphat) in ihrer Aktivität gehemmt werden (Kap. D1.4). Die Besonderheiten der V8-Protease bestehen allerdings in der Abwesenheit von Disulfidbrücken sowie einem einzigartigen, positiv geladenen N-Terminus. Letzterer ist für die hohe Substratspezifität verantwortlich und resultiert entsprechend in einem alkalischen pH-Optimum der Protease. Anhand von Sequenz- und Röntgenstrukturdaten sowie vergleichenden Mutagenese-, Modellierungs- und Inhibitionsstudien konnte der Mechanismus der enzymatischen Reaktion der Serinproteasen bereits in zahlreichen Details aufgeklärt werden (Hartley, 1970; Murphy *et al.*, 1988; Corey & Craik, 1992; Nienaber *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 1993, 1996; Prasad *et al.*, 2003). Das katalytische Zentrum ist bei allen Serinproteasen hoch konserviert (Abb. D1) und besteht aus einer Asp-His-Ser-Triade (Blow *et al.*, 1969). Bei der V8-Protease geht man davon aus, dass das negativ geladene Substrat zunächst über ionische Wechselwirkungen an den positiv geladenen N-Terminus bindet, und dieser so zu einer korrekten Positionierung des Substrats zum aktiven Zentrum beiträgt (Abb. D1). Hierdurch wird die Spaltung der Peptidbindung durch nukleophilen Angriff des Ser169 (Prasad *et al.*, 2003) ermöglicht. Das Asp-His-Paar des katalytischen Zentrums kann den Angriff womöglich zusätzlich erleichtern, der in einem Ein-Protonen-Transfer vom Serin zum Histidin resultiert (Warshel *et al.*, 1989).



Abb. D1: Röntgenstruktur der V8-Protease aus *Staphylococcus aureus*.

Die V8-Protease spaltet bei einem pH-Optimum von 7,8 spezifisch nach Glutamat- und Aspartatresten. Die negativ geladenen Reste binden zunächst über ionische Wechselwirkungen an die Aminosäuren Asn193, Val1 und Thr164 des positiv geladenen N-Terminus (blau). Dieser ist für die Substratspezifität der Protease verantwortlich. Die Spaltung der Peptidbindung erfolgt schließlich durch nukleophilen Angriff des Ser169 der Asp-His-Ser-Triade des katalytischen Zentrums (violett). (Nach Prasad *et al.*, 2003, PDB-ID-Code: 1qy6).

Nach V8-Spaltung der KLH1-UE und anschließender Aufreinigung der FU-h mittels AEC und/oder SEC, konnte in der SDS-PAGE stets eine Doppelbande bei ~ 60 kDa beobachtet

werden. Dies deutet auf zwei unterschiedlich große Spaltstücke hin, deren molekulare Massen sich um ~ 5 kDa unterscheiden (Abb. D2). Dass es sich bei dem etwas kleineren Protein um Teile einer anderen FU handeln könnte, ließ sich sowohl immunologisch mittels *Crossed IE*, als auch anhand der molekularen Masse des Fragments ausschließen (Kap. C6.2, Abb. C21 und Abb. C22).

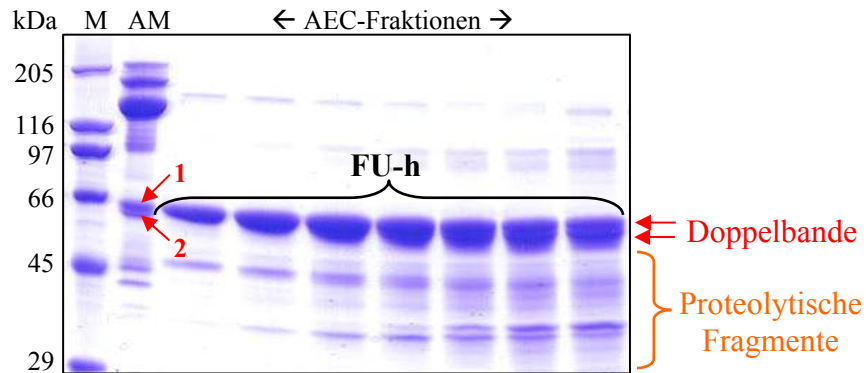


Abb. D2: SDS-Page der über AEC abgetrennten Fraktionen der FU KLH1-h.

Nach Abtrennung der Fraktionen der FU KLH1-h über AEC zeigten sich im 10%-igen SDS-Gel stets Doppelbanden (rote Pfeile) mit einer molekularen Masse von ~ 60 kDa (1) und ~ 55 kDa (2). Entsprechende Banden konnten im Gel bereits vor dem AEC-Lauf, nach Spaltung der KLH1-UE beobachtet werden (AM, rote Pfeile). Bei den zahlreichen kleineren Fragmenten handelt es sich um proteolytische Fragmente, die sich mittels AEC nicht abtrennen ließen. *M*: Proteinmarker; *AM*: Ausgangsmaterial der AEC (mit V8-Protease gespaltene KLH1-UE).

Betrachtet man sich die Sequenz der FU KLH1-h, so fallen neben fünf potenziellen Spaltstellen der N-terminalen Linkerregion (14 Aminosäuren), auch sehr viele Glutamat- und Aspartatreste innerhalb der globulären FU auf (Abb. D3). Trotz der limitierenden Spaltung der KLH1-UE mit nur geringen Proteasemengen, wäre folglich auch eine Abspaltung eines zusätzlichen, kleineren Fragments denkbar. Speziell die FU-h könnte diesbezüglich einen Sonderfall einnehmen, wenn die V8-Protease als Folge des speziellen C-terminalen Typ I-Kupferfaltungsmotivs (Kap. C10, Abb. C35) eine bessere Zugänglichkeit zu den potenziellen, zusätzlichen Spaltmotiven erhält. Aufgrund der Unterschiede der molekularen Massen beider Fragmente von ~ 5 kDa in der SDS-PAGE, müsste die zusätzliche Spaltstelle entweder ~ 40 Aminosäuren vom N- oder C-Terminus innerhalb des globulären Proteins liegen.

der Fall ist, das entsprechende Fragment aber deutlich kleiner als 5 kDa wäre, kann man generell eher von einer Hydrolyse der Glutamylobindungen der FU-h ausgehen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Spezifität der V8-Protease für Glutamat generell höher ist und nach diesem 3000-fach schneller gespalten wird als nach Aspartat (Sørensen *et al.*, 1991). Von Drapeau wurden 1972 anhand des Substrats Hämoglobin zwei Aktivitätsmaxima der V8-Protease bei pH 4,0 und 7,8 bestimmt. Sørensen *et al.* (1991) konnten bei synthetischen Substraten jedoch nur ein Maximum bei pH 7,2 feststellen. Die proteolytische Aktivität und Spezifität des Enzyms ergibt sich aus der Anwesenheit zweier ionisierbarer Gruppen des N-Terminus (Houmard, 1976; Prasad *et al.*, 2003). Um mit den negativ geladenen Glutamat- und Aspartatresten einen Enzym-Substrat-Komplex bilden zu können, müssen diese Gruppen eine positive Ladung tragen. Aufgrund der pK-Werte dieser Gruppen von 6,58 und 8,25, sollten die im Rahmen dieser Arbeit gewählten alkalischen pH-Werte der Proteinlösung von 8,0 und 9,6 eine hohe Spezifität und Aktivität der V8-Protease bedingt haben. Bei beiden pH-Werten ließen sich in der SDS-PAGE entsprechend auch keine Unterschiede bezüglich des Spaltmusters nachweisen. Das von Drapeau (1972) höchste Aktivitätsmaximum bei pH 4,0, begründeten Sørensen *et al.* (1991) mit einem eventuellen pH-Effekt des Hämoglobins. Beim KLH kann ein solcher Einfluss des Substrats ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da die Kristalle sich bei einem pH-Wert von 4,0 bereits nach einigen Tagen auflösten.

Die Art der Puffersubstanz kann neben dem pH-Wert ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf die Substratspezifität haben (Houmard & Drapeau, 1972; Drapeau, 1977). So konnten frühere Studien zeigen, dass die Wahl von Natrium- oder Kaliumphosphat-Puffer bei einem pH von 7,8 in der Hydrolyse von Aspartyl- und Glutamylobindungen resultiert, während in Ammoniumbicarbonat-Puffer pH 7,8 oder Acetat-Puffer pH 4,0 ausschließlich nach Glutamat gespalten wurde. Später konnte jedoch nachgewiesen werden, dass hierfür nicht die Puffersubstanz verantwortlich ist, sondern vielmehr der inhibitorische Effekt der Bicarbonat- und Acetat-Ionen, welche die enzymatische Aktivität auf die bevorzugten Glutamylobindungen reduzieren (Houmard, 1976; Sørensen *et al.*, 1991). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich, unabhängig von der Konzentration der Puffersubstanz, auch in Tris/HCl-Puffer. Die geringere Aktivität konnte auch hier anhand von inhibierenden Chlorid-Ionen erklärt werden (Kap. D1.4). Im Vergleich zu anderen monovalenten Anionen ist der inhibitorische Einfluss der Chlorid-Ionen jedoch eher gering. Dies erklärt somit auch die nach wie vor vorhandene enzymatische Aktivität der V8-Protease in der Probe der aufgereinigten FU-h im Tris/HCl-haltigen Lagerungs-Puffer (Kap. C11, Abb. C36). Über die Spezifität und Effektivität der V8-Protease, die potenziellen Aminosäureverbindungen des KLH bzw. der FU-h in Glycin-Puffer zu spalten, sind derzeit keine Daten verfügbar. Da in diesem Puffer allerdings keine inhibierenden Anionen vorhanden waren, kann bei alkalischen pH-Werten von einer effizienten Spaltung nach Glutamat- und Aspartatresten ausgegangen werden.

1.3.2 Inhibition der V8-Protease

Um den proteolytischen Einfluss der V8-Protease zu unterbinden und somit eine eventuell höhere Auflösung der Röntgenstruktur der FU KLH1-h zu erreichen, wurde die Protease und deren kleinere Spaltstücke mittels Größenausschluss-Chromatographie aus der zur Kristallisation bestimmten Probe entfernt (Kap. C11.2, Abb. C40 – 41). Obwohl anhand dieser Probe neue Kristallisationsbedingungen ermittelt werden konnten, waren die gewachsenen Kristalle zu klein für eine Röntgenstrukturanalyse (Kap. C12, Abb. C47). Der Nachweis einer eventuell höheren Auflösung blieb somit aus. Die Anwesenheit der V8-Protease schien demnach essenziell zu sein, um unter den zuvor bestimmten Bedingungen ein Wachstum ausreichend großer Kristalle zu ermöglichen. Daher wurden zusätzliche Versuche unternommen, die proteolytische Aktivität durch irreversible Inhibition zu unterbinden (Kap. C11.1), die V8-Protease aber nach wie vor in den Proben zu belassen.

Bei den Serinproteasen haben sich seit vielen Jahren irreversible Inhibitoren der Sulfonsäurefluoride wie PMSF, *Pefabloc*[®] SC (4-(2-aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid) oder APMSF (4-Amidinophenyl-methansulfonylfluorid) bewährt (Walsmann *et al.*, 1972; Markwardt *et al.*, 1974). Sie reagieren kovalent mit dem Serinrest des katalytischen Zentrums (Abb. D4), da durch die sogenannte Triade-Anordnung dessen pK_a-Wert wesentlich herabgesetzt und seine Hydroxyfunktion dadurch extrem reaktiv wird (Fersht, 1985).

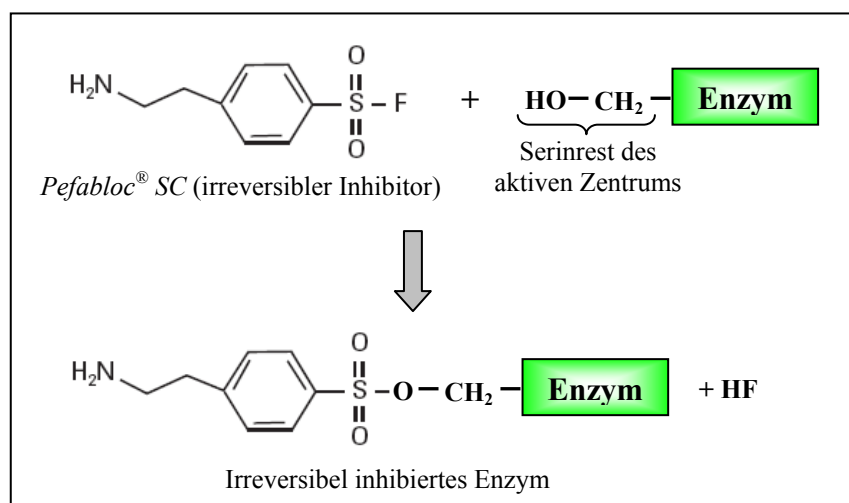


Abb. D4: Mechanismus der irreversiblen Inhibition von Serinproteasen am Beispiel von *Pefabloc*[®] SC.

Irreversible Inhibitoren der Sulfonsäurefluoride reagieren kovalent mit dem Serinrest des katalytischen Zentrums der Serinprotease, da durch die sogenannte Triade-Anordnung dessen pK_a-Wert wesentlich herabgesetzt und seine Hydroxyfunktion dadurch extrem reaktiv wird.

Aufgrund seiner in der Regel potentesten inhibitorischen sowie wasserlöslichen und nicht-toxischen Eigenschaften, wurde in der vorliegenden Arbeit *Pefabloc*[®] SC zur Hemmung der V8-Proteaseaktivität verwendet. Zudem zeigt dieser Inhibitor in leicht basischen, wässrigen Medien eine höhere Stabilität. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Puffern mit pH-Werten von 8,0 bzw. 9,6 kann allerdings nur von einer kurzzeitigen Stabilität von ungebundenem Inhibitor ausgegangen werden. Nach Zugabe von 1mM des Inhibitors waren bei der V8-Protease noch 85 % Restaktivität nachzuweisen, während die Aktivität der Serinprotease

Trypsin vollständig gehemmt war (Kap. C11.1, Abb. C37). Selbst eine Erhöhung der Inhibitormenge auf bis zu 20 mM resultierte noch in einer proteolytischen Aktivität der V8-Protease von 12 %. Zudem trat bei diesen hohen Mengen an Inhibitor eine Trübung der Proteinlösung auf, was sich vermutlich auf die Ausbildung von kovalenten Bindungen am KLH zurückführen lässt. Diese Nebenreaktionen werden insbesondere durch die Umgebung der betreffenden Aminosäuren im Protein, dem pH-Wert des Mediums und dem Konzentrationsverhältnis von Inhibitor zu Protein beeinflusst, wobei vor allem Tyrosin- und Lysinreste sowie der freie N-Terminus betroffen sein können (Patentanmeldung *Roche Molecular Biochemicals*). Vergleichbare Studien zur Inhibition der V8-Protease zeigten ebenfalls eine nur ineffiziente Hemmung der proteolytischen Aktivität. So konnten Moon *et al.* (2001) zeigen, dass die Protease nach Applikation von 1mM *Pefabloc*[®] noch eine Restaktivität von 50 % hatte. Mit PMSF (1 mM) und EDTA (10 mM) war sogar noch eine uneingeschränkte enzymatische Aktivität vorhanden. Eine fast vollständige Inhibition erzielten sie nur durch den Einsatz von 0,1 mM DFP (Diisopropylfluorophosphat). Da DFP jedoch auch die Acetylcholinesterase hemmt, wurde in dieser Arbeit von der Verwendung dieses hoch giftigen Neurotoxins abgesehen. Studien mit verschiedenen synthetischen Inhibitoren konnten eine kompetitive Inhibition der Serinprotease Kallikrein durch Benzamidin- und Benzylamin-Derivate nachweisen. Durch zusätzliche chemisch-reaktive Gruppen am aromatischen Ring konnte eine Umwandlung der reversiblen in irreversible Inhibitoren erreicht werden (Markwardt *et al.*, 1971, 1974; Walsmann *et al.*, 1972). Besonders effizient war die Hemmung bei Aminomethyl- und Amidino-Benzolsulfonylfluoriden (APMSF). Inhibitoren mit längeren chemisch-reaktiven Seitenketten und somit einer größeren Entfernung der Aminogruppe vom aromatischen Ring, hatten einen geringeren inhibitorischen Effekt. Vergleichbares wurde bei acetylierten Aminogruppen festgestellt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der V8-Protease, wurde Kallikrein allerdings stärker durch *Pefabloc*[®] in seiner proteolytischen Aktivität gehemmt als durch DFP oder APMSF. Die Effizienz der Inhibitoren wird zu einem großen Teil durch die Aminosäuren des aktiven Zentrums der Serinprotease bestimmt. Mutageneseexperimente konnten zeigen, dass der Austausch der beteiligten Aminosäuren in einer geänderten Spezifität des Inhibitors resultieren kann (Laskowski & Kato, 1980; Hill *et al.*, 1984; Carrell & Travis, 1985; Hill & Hastie, 1987; Laskowski *et al.*, 1987). Barbosa *et al.* (1996) erklären die unzureichende Inhibition der V8-Protease im Vergleich zu anderen Serinproteasen, mit zahlreichen Aminosäuresubstitutionen sowie der Anwesenheit eines nur sehr kleinen Protein-Loops, der bestimmte Aminosäuren nur bedingt vor dem umgebenden Lösungsmittel schützt. Ein nukleophiler Angriff des Inhibitors wird somit erschwert. Der einzigartige, positiv geladene N-Terminus (Abb. D1) könnte den Zugang der Sulfonsäurefluoride zum katalytischen Zentrum ebenfalls erschweren und somit nur eine sehr langsame Acylierungsreaktion des Serins des aktiven Zentrums bedingen (Abb. D4). DFP ist aufgrund seiner anderen chemischen Struktur vermutlich besser zugänglich und ein entsprechend effizienterer, irreversibler Inhibitor der V8-Protease. Durch Herstellung synthetischer Diphenylphosphonat-Analoga von Aspartat und Glutamat könnte

die Problematik der unspezifischen Inhibition der Protease gelöst werden. Entsprechende Versuche wurden von Hamilton *et al.* (1998) bereits erfolgreich durchgeführt.

Studien an synthetischen Peptiden konnten zudem eine Hemmung der proteolytischen Aktivität der V8-Protease durch monovalente Anionen nachweisen (Houmard, 1976; Sørensen *et al.*, 1991). Die Hydrolyse der entsprechenden Verknüpfungen wurde hierbei in der Reihenfolge $F^- < Cl^-$, $Br^- < CH_3COO^-$, $I^- < NO_3^-$ zunehmend gehemmt. Man geht davon aus, dass die Anionen mit den ebenfalls negativ geladenen Substraten/Aminosäuren konkurrieren und somit die Bindung an den positiven N-Terminus der Protease erschweren. Für Phosphate und Sulfate konnte hingegen ein aktivierender Effekt beobachtet werden. Sørensen *et al.* (1991) begründeten dies mit einer spezifischen Enzyminteraktion, die nur bei den Anionen mit vierflächiger Konfiguration auftritt und nicht bei den planaren Strukturen von Actetat, Borat, Nitrat und Bicarbonat. Nach chromatographischer Isolierung der V8-Protease über DEAE-Cellulose, wurde von Drapeau *et al.* (1972) zudem eine deutliche Abnahme der proteolytischen Aktivität um 50 % festgestellt. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Isolierung der FU KLH1-h erfolgte ebenfalls über DEAE-Sepharose. Zur Elution der Fragmente diente zudem ein bis zu 0,5 M NaCl-Gradient. Da sowohl die AEC-Fraktionen, als auch die längerfristig in Tris/HCl gelagerte Proteinprobe nach wie vor eine hohe proteolytische Aktivität zeigten (Kap. C11.2, Abb. C38 – 39), scheint der inhibitorische Einfluss der Chlorid-Ionen sowie der DEAE-Sepharose allerdings vernachlässigbar gering zu sein. Der ebenfalls häufig angeführte Selbstverdau der V8-Protease kann aufgrund der nach wie vor hohen enzymatischen Aktivität der Probe nach sechsmonatiger Lagerungszeit ebenfalls ausgeschlossen werden.

1.4 Röntgenstruktur der FU KLH1-h und deren C-terminaler Zusatzdomäne

Die Kristalle der FU KLH1-h erzielten am Synchrotron eine Auflösung der Röntgenstruktur von 4 Å (Kap. C10, Abb. C30 – 31). Anhand der ermittelten Kristallstruktur und der verfügbaren Sequenzdaten konnte die Faltung der FU-h modelliert werden (Kap. C10, Abb. C33). Die Überlagerung der Röntgenstrukturen der FUs OdH-g sowie KLH1-h zeigte einen mittleren RMS-Wert von lediglich 0,4 Å an. Dies deutet auf die hohe strukturelle Übereinstimmung der N-terminalen Domäne und der fünfsträngigen β -Sandwich-Domäne, die bei allen FUs sehr ähnlich ist (Kap. C10, Abb. C35). Für die C-terminale Zusatzdomäne der kragenbildenden FU-h von ~ 100 Aminosäuren, die bei den FUs a-g fehlt, konnte eine neue Proteinstruktur ermittelt werden. Die Suche nach ähnlichen Faltungsmotiven ergab eine 15 - 25 %-ige strukturelle Übereinstimmung mit Stellacyanin/Plastocyanin und Azurin-ähnlichen Cupredoxinen (Abb. D5).

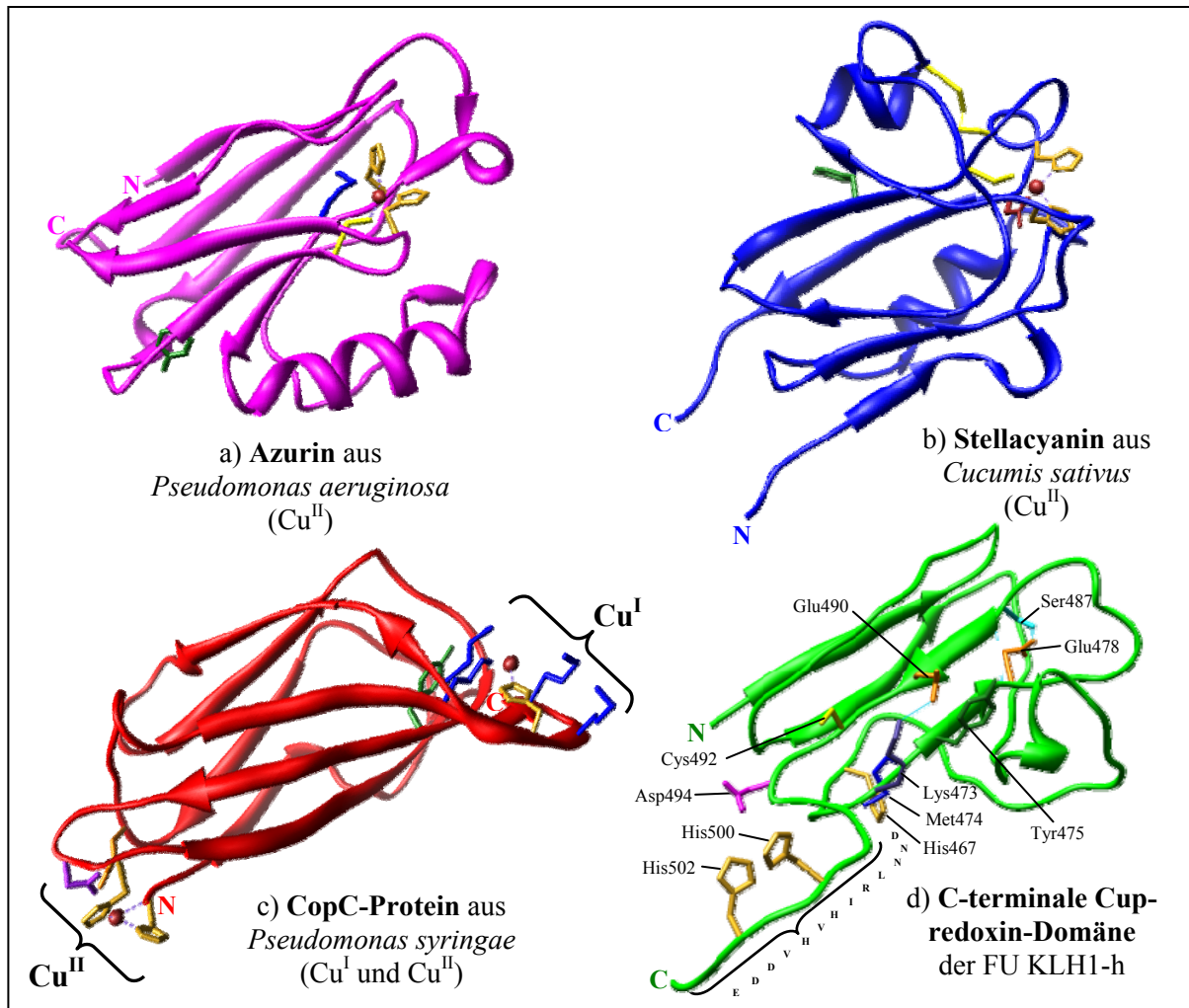


Abb. D5: Bänderstrukturen verschiedener Cupredoxine mit Typ I-Kupferzentrum.

a) Azurin aus *Pseudomonas aeruginosa*. b) Stellacyanin aus *Cucumis sativus*. c) CopC-Protein aus *Pseudomonas syringae*. d) C-terminale Cupredoxin-Domäne der FU KLH1-h (Kap. C10, Abb. C33). Alle Proteine besitzen Cupredoxin-typische β -Sandwich-Domänen mit sechs bis acht β -Faltblattstrukturen und ein hoch konserviertes Tyrosin (grün) am Anfang oder Ende eines antiparallelen β -Faltblattstrangs („Tyrosine-corner“). Die Kupferbindung erfolgt in der Regel wie beim Azurin (a) durch zwei Histidine (goldfarben), ein Cystein (gelb) und ein axiales Methionin (blau). Beim Stellacyanin (b) ist der axiale Ligand ein Glutamin (braun). Zudem enthält dieses Protein eine Phycocyanin-typische Disulfidbrücke in der Nähe des Kupferzentrums, die allerdings nicht an der Koordination des Kupfers beteiligt ist, sondern zur Stabilisierung der α -Helix und eines variablen Loops dient. Das CopC-Protein (c) hat zwei Kupferbindungsstellen, wobei Cu(I) am N-Terminus mit einer methioninreichen Region und einem Histidin interagiert, und Cu(II) an zwei Histidine, ein Glutamat (orange) und ein Aspartat (violett) bindet. Cystein-Reste fehlen bei diesem Protein und sind folglich nicht an der Metallbindung beteiligt. Für die C-terminale Domäne der FU KLH1-h (d) konnte eine 15 - 25 %-ige strukturelle Übereinstimmung mit Stellacyanin/Plastocyanin und Azurin-ähnlichen Cupredoxinen nachgewiesen werden. Die typische β -Sandwich-Domäne besteht allerdings nur aus vier β -Faltblättern, wobei Strang drei und vier über Wasserstoffbrücken (blaue Linien) zwischen Lys473 (dunkelblau) und Glu490 (orange) sowie Glu478 und Ser487 (hellblau) stabilisiert wird. Das konservierte Tyrosin (grün) befindet sich ebenfalls zwischen Strang drei und vier. Ob die Zusatzdomäne der Fu-h Kupfer gebunden hat, ist nach wie vor unklar. Potenzielle kupferbindende Aminosäuren wie His467/500/502, Met474, Cys492, Asp494 und Glu490 sind zwar vorhanden, liegen allerdings in der modellierten Struktur in keiner trigonal-planaren Orientierung zueinander. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Modellstruktur eine hohe Fehleranfälligkeit hat und für die Reste -DNNLRIHVHVDD- des C-Terminus aufgrund der fehlenden Referenz der Röntgenstruktur zudem keine Faltung modelliert werden kann. Die N- und C-Termini der Proteine sind in der jeweiligen Farbe mit „N“ und „C“ gekennzeichnet. Die Modellierung der Cupredoxin-Domäne erfolgte auf Basis des Verlaufs der C_{α} -Kette der ermittelten Röntgenstruktur und der verfügbaren Sequenzdaten mit Hilfe des Programms *MODELLER 9.2* (durchgeführt von [redacted], AG Prof. [redacted] Uni Mainz). Übrige Strukturen nach Li *et al.*, 2006, PDB-ID-Code: 2ft6; Zhang *et al.*, 2006, PDB-ID-Code: 2c9q; Hart *et al.*, 1996, PDB-ID-Code: 1jer).

Bisher sind bereits zahlreiche, hochauflösende Röntgenstrukturen ($> 2 \text{ \AA}$) von Cupredoxinen wie Azurin, Pseudoazurin, Amicyanin, Plastocyanin, *Cucumber basic blue protein*, Stellacyanin, Rusticyanin und Plantacyanin bekannt (Baker, 1988; Durley *et al.*, 1993; Adman *et al.*, 1989; Petratos *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1994; Collyer *et al.*, 1990; Guss *et al.*, 1986; Hart *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1996; Cunane *et al.*, 1996; Einsle *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006). Dies sind 10 – 14 kDa große Typ I-Kupferproteine bei Bakterien, Pflanzen, Tieren und beim Mensch mit einer charakteristischen sechs- bis achtsträngigen β -Sandwich-Domäne. Aufgrund ihrer Absorptionsmaxima bei 600 nm und 450 nm besitzen sie eine blau-grüne Farbe (Adman, 1985; Lu *et al.*, 1993). Die Bindung des einzelnen Cu(I)-Atoms des Kupferzentrums erfolgt in der Regel über zwei Histidine, ein Cystein und ein axiales Methionin in einer trigonal-planaren Struktur (Baker, 1988; Petratos *et al.*, 1988; Guss *et al.*, 1992; Durley *et al.*, 1993). Die oxidierte Cu(II)-Form resultiert hingegen, wie im Fall der Kristallstrukturen von Azurin und Stellacyanin (Abb. D5 a, b), in einer quadratisch-planaren Geometrie des aktiven Zentrums mit einem schwächer gebundenen axialen Liganden (Koch *et al.*, 1997). Beim *Cucumis sativus*-Stellacyanin besteht dieser aus einem Glutamin (Abb. D5 b). Zudem enthält dieses Protein eine Phytocyanin-typische Disulfidbrücke in der Nähe des Kupferzentrums, die allerdings nicht an der Koordination des Kupfers beteiligt ist, sondern zur Stabilisierung der α -Helix und eines variablen Loops dient. Bezüglich ihrer Funktion werden Cupredoxine als frei diffundierbare Elektronentransferproteine beschrieben (Adman, 1991; Canters & Van de Kamp, 1992; Solomon *et al.*, 1992; Solomon & Lowery, 1993; Wuttke & Gray, 1993; Guckert *et al.*, 1995). Blaue Kupferzentren existieren allerdings auch in Multikupfer-Oxidasen (Ceruleoplasmin, Ascorbinsäure-Oxidase, Laccase) und in Nitrit-Reduktasen (Nojiri *et al.*, 2007). In diesen Proteinen übernimmt das Typ I-Kupferzentrum ein Elektron von einem externen Elektronendonator und leitet es unmittelbar an ein weiteres Metallzentrum im gleichen Protein weiter, um es bei der katalytischen Reaktion zu verwenden. Zudem wurde kürzlich die Kristallstruktur eines Cupredoxin-ähnlichen CopC-Proteins aus dem Bakterium *Pseudomonas syringae* bestimmt (Zhang *et al.*, 2006), dass sowohl eine den Cupredoxinen vergleichbare β -Sandwichstruktur, als auch Domänen von Multikupfer-Oxidasen aufweist (Abb. D5 c). CopC ist aufgrund seiner Funktion als intermolekulares Kupfertransfer-Protein vermutlich an der Kupferhomöostase beteiligt. Im Gegensatz zu den Cupredoxinen hat dieses Protein allerdings keine Cystein-Reste und besitzt zwei Kupferbindungsstellen für Cu(I) und Cu(II) (Cha & Cooksey, 1991; Cooksey, 1994; Silver & Phung, 1996; Arnesano *et al.*, 2002, 2003; Koay *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Cu(II) interagiert mit zwei His-, einem Glu- und einem Asp-Rest am N-Terminus und bildet ein tetragonales Typ II-Kupferzentrum. Cu(I) bindet an ein Histidin und zahlreiche Met-Reste in einem Loop des C-Terminus. Der Loop enthält ein $\text{MX}_2\text{MX}_2\text{MX}_{4(5)}\text{-M}$ -Motiv, wobei einer der 4(5) Reste, die die letzten zwei Methionine trennen, oftmals ein potentiell metallbindendes Histidin ist (Arnesano *et al.*, 2002). Ein weiteres Cupredoxin-typisches Merkmal ist ein konserviertes Tyrosin am Anfang oder Ende eines antiparallelen β -Faltblattstrangs (Abb. D5), welches als „Tyrosine corner“ beschrieben wurde und über Wasserstoffbrücken-

bindungen zur Stabilität der β -Sandwich-Domäne beiträgt (Hemmingsen *et al.*, 1994). Dieser Tyrosin-Loop lässt sich zudem auch in Immunglobulinen nachweisen (Amzel & Poljak, 1979). Obwohl die modellierte Struktur der Cupredoxin-Domäne der FU KLH1-h nur eine vierzählige β -Sandwichstruktur zeigt, befindet sich zwischen Strang drei und vier ebenfalls ein Tyrosin (Tyr475), das stabilisierende Eigenschaften haben könnte (Abb. D5 d). Ein zusätzlicher Strukturerhalt der Stränge ergibt sich vermutlich aus Wasserstoffbrücken zwischen Lys473 und Glu490 sowie Glu478 und Ser487 (Abb. D5 d). Disulfidbrücken wie im Falle des Stellacyanins (Abb. D5 b) wurden hingegen keine gefunden.

Obwohl die strukturelle Verwandtschaft der C-terminalen Domäne der FU-h mit Typ I-Kupferproteinen, die thermische Stabilität (Kap. D3.2 und D3.3), die charakteristische Farbgebung und das Absorptionsspektrum (Kap. D1.6) der aufgereinigten FU (Kap. C11.2.1, Abb. C46) für ein zusätzliches Kupferatom sprechen, lieferte die Röntgenstruktur, möglicherweise aufgrund der geringen Auflösung von 4 Å, keinen eindeutigen Hinweis auf ein zusätzliches Metallatom. Letzteres könnte als Folge der sauren Kristallisationsbedingungen (pH 4,0) allerdings auch abdissoziiert sein. Aus der modellierten Struktur der C-terminalen Domäne der FU-h lassen sich ebenfalls keine eindeutigen Bindungsmotive ableiten (Abb. D5 d), obwohl potenzielle, kupferbindende Aminosäuren wie His467/500/502, Met474 und Cys492, die zudem in typischen Loops vor Strang drei bzw. nach Strang vier liegen, vorhanden sind. Die räumliche Orientierung der entsprechenden Reste spricht jedoch gegen ein Typ I-Kupferzentrum. Bei Betrachtung der Modellstruktur muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese eine hohe Fehleranfälligkeit hat und für die Reste -DNNLRIHVHVDDE- des C-Terminus aufgrund der fehlenden Referenz der Röntgenstruktur zudem keine Faltung modelliert werden konnte. Daher wäre prinzipiell noch ein zusätzliches β -Faltblatt am C-Terminus denkbar, wobei His500 oder His502 zusammen mit His467, Cys492 und Met474 bei entsprechender Faltung der β -Sandwich-Domäne sowie einer anderen Orientierung der Reste eventuell auch ein Azurin-typisches Kupferzentrum ausbilden könnten. Eine Cu(II)-Bindung durch zwei der Histidine sowie Glu490 und Asp494, wie im Falle des CopC-Proteins (Abb. D5 c), wäre bei entsprechender Faltung ebenfalls denkbar. Dafür sprechen auch die Beobachtungen von Hussain *et al.* (2007), die einen größeren stabilisierenden Einfluss des Cu(II) des CopC-Proteins bezüglich thermischer und chemischer Denaturierung im Vergleich zum Cu(I) nachweisen konnten. Die hohe thermische Stabilität der FU-h (Kap. D3.2 und D3.3) ließe sich somit anhand eines Cu(II)-Atom am C-Terminus der nativen FU-h belegen. Im Gegensatz zum Cupredoxin von *Pseudomonas syringae*, läge das Kupferzentrum der Zusatzdomäne der FU-h allerdings am gegenüberliegenden Ende am C-Terminus.

Frühere Studien an Kupfertransportproteinen konnten auch eine hohe Affinität der Kupferatome für methioninreiche Sequenzen belegen (Dancis *et al.*, 1994; Puig *et al.*, 2002a; Guo *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005). Für eine biologisch begründbare Cu(I)-Bindung müssen jedoch mindestens drei Met-Reste vorhanden sein, die durch zwei beliebige andere Aminosäuren unterbrochen sind. Ein entsprechendes $\text{MX}_2\text{MX}_2\text{MX}_{4(5)}\text{M}$ -Motiv existiert auch beim CopC-Protein (Arnesano *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007). Bei nur zwei

Met-Resten nimmt die Affinität für Kupfer ebenso ab, wie bei drei unterbrechenden Aminosäuren. Die Zusatzdomäne der FU-h besitzt zwar zahlreiche Met-Reste, aber ein CopC-typisches Motiv lässt sich anhand der Sequenz nicht ablesen. Zwischen den Methioninen liegen entweder mindestens acht Reste, oder wie im Falle von Met435 und Met437 nur eine Aminosäure. Eine Kupferbindung über ein solches Motiv kann daher definitiv ausgeschlossen werden. Auch ein Sequenzalignment der C-terminalen Domäne der FU-h mit verschiedenen Cupredoxinen, lieferte aufgrund der großen Sequenzunterschiede keinen Hinweis auf eine mögliche Kupferbindung bzw. eine Beteiligung dieser FU an der Kupferhomöostase. Dass eine solche Funktion dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ergibt sich aus der hohen Sequenzheterogenität verschiedener Cupredoxinen, die sich trotz ihrer vergleichbaren Funktion kaum alignieren lassen.

Andere Proteine, die wie die Cupredoxine an der Kupferhomöostase, -detoxifikation und -verteilung beteiligt sind, zeigen noch weitere Kupferbindungsmotive. So existiert im Serum-Albumin von Säugetieren ein Gly-Gly-His-Tripeptid (ATCUN-Motiv), das in der Lage ist, Ni(II)- oder Cu(II)-Atome in einer quadratisch-planaren Geometrie reversibel zu binden (Harford & Sarkar, 1997). Das Metallothionein Cup1 aus *Saccharomyces cerevisiae* bindet sogar sieben Cu(I)-Atome innerhalb zweier paralleler Loops des Polypeptidrückgrats. Jedes Kupfer interagiert hierbei in einer trigonalen Anordnung mit jeweils drei Cysteinen (Peterson *et al.*, 1996). In der C-terminalen Domäne der FU KLH1-h ließen sich allerdings auch solche Motive nicht finden. Die Sequenz zeigt lediglich zwei Cysteine, die strukturell zudem noch weit auseinander liegen. Gly-Reste befinden sich ebenfalls nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der insgesamt drei Histidine.

1.5 Charakteristische Farbgebung und Absorptionsspektrum der FU KLH1-h

Nach Aufkonzentrierung der Fraktionen an reiner FU KLH1-h auf Konzentrationen zwischen 10 – 20 mg/ml, konnte eine im Vergleich zum blauen, nativen Hämocyanin, rötlich-violette Färbung der Probe beobachtet werden (Kap. 11.2.1, Abb. C46 c). Ein Absorptionsspektrum der FU-h zeigte neben dem proteintypischen Maximum bei 280 nm, zwei weitere Gipfel bei 340 nm und bei 556 nm (Kap. 11.2.1, Abb. C46 a, b). Da die unterschiedlich aufgereinigten FU-h-Proben stets eine vergleichbare Färbung hatten und in identischen Spektren resultierten, kann ein Beitrag der V8-Protease, bzw. deren kleinerer proteolytischer Fragmente, zum rötlich-violetten Erscheinungsbild der Lösung ausgeschlossen werden. Die Art der Puffer-substanz und der pH-Wert hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Farbgebung der Probe. Vergleichbare Spektren wurden zudem bereits bei den kragenbildenden FUs HpH-h, RtH1-h und der FU-h von *Pila leopoldvillensis* gemessen (Gielens *et al.*, 1980, 1995; Parvanova *et al.*, 2003). Absorptionsspektren der isolierten KLH1-UE lieferten Maxima bei 345 nm und 577 nm. Beide Gipfel sind typisch für blaues, oxygeniertes Hämocyanin und ergeben sich aus der geometrischen und elektronischen Struktur des Typ III-Kupferzentrums. Jedes der zwei Kupferatome wird über jeweils drei Histidine im aktiven Zentrum gebunden. Die Sauerstoffbindung erfolgt in Form eines Peroxid-Ions zwischen den Metallatomen (Magnus *et al.*, 1994;

Cuff *et al.*, 1998). Nach Anregung bei 550 – 580 nm kommt es zu einem Ladungsübergang vom O_2^{2-} zum Cu(II), was die O-O-Bindung verstärkt (Loehr *et al.*, 1974; Freedman *et al.*, 1976). Das etwas geringere Maximum der FU-h bei 340 nm lässt vermuten, dass der Ladungstransfer im Grundzustand weniger ausgeprägt ist, als bei der gesamten UE bzw. anderen Hämocyaninen. Entsprechend niedriger ist auch das zweite Maximum der FU-h mit 556 nm, im Vergleich zu 577 nm bei der KLH1-UE. Als mögliche Begründung suggerierten Gielens *et al.* (1980) anhand von Resonanz-Raman-Spektren eine modifizierte, asymmetrische Orientierung der Imidazolgruppen der Kupferliganden der FU-h. Die C-terminale Zusatzdomäne der FU-h könnte zu dieser geänderten Konformation beitragen.

Des Weiteren wäre die Beteiligung eines zusätzlichen Kupferatoms in der Cupredoxin-Domäne als Ursache für das abweichende Spektrum sowie die rötlich-violette Färbung denkbar. Generell besitzen Typ I-Kupferproteine aufgrund eines Ladungsübergangs vom Cystein zum Cu(II) eine starke Absorptionsbande bei 600 nm, woraus deren blaue Farbe resultiert. Allerdings kann die Farbgebung der Cupredoxine je nach geometrischer Struktur und Art der beteiligten Liganden auch von blau (600 nm) bis grün (460 nm) variieren (Han *et al.*, 1993). Das Umfeld des Kupferzentrums der Cupredoxine wird durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst. Einige interagieren unmittelbar mit dem Liganden, während andere die Orientierung der Liganden indirekt mitbestimmen. Dies wirkt sich entsprechend auch auf das elektronische Umfeld der Kupferatome aus, mit den daraus resultierenden unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine (Spektren, Redoxpotenziale). Wasserstoffbrücken, die direkt mit einem Kupferliganden interagieren sind NH...S-Bindungen. Diese sind zahlreich in Azurinen und Plastocyaninen vorhanden und erhalten die Konformation der Cysteinseitenkette des katalytischen Zentrums. Baker (1988) suggerierte, dass Unterschiede in der Anzahl der NH...S-Bindungen für die abweichende blaue Farbe der Moleküle verantwortlich sein könnten. Faktoren, die die Orientierung oder den elektronischen Charakter der Schwefel-Orbitale beeinflussen, könnten entsprechend die Energie des Ladungsübergangs zwischen Cystein und Kupfer verändern und eine andere Farbgebung bedingen. Beim Cupredoxin von *Alcaligenes faecalis* und beim Plastocyanin existiert nur noch eine NH...S-Bindung, da die Ausbildung weiterer Bindungen durch ein Prolin verhindert wird. Daraus ergibt sich ein niedrigeres Absorptionsmaximum von 597 nm statt von 625 nm wie im Falle des Azurins (Adman *et al.*, 1989). Anhand der Modellstruktur der Cupredoxin-Domäne der FU KLH1-h lassen sich zwar keine unmittelbaren NH...S-Brücken belegen, allerdings wären diese bei Vorhandensein eines Typ I-Kupferzentrums durchaus denkbar. Die Anwesenheit von vier Prolinresten (Pro423/424 und Pro462/463) in der Nähe des potenziell möglichen Kupferzentrums, könnten eine Ausbildung von NH...S-Bindungen jedoch erschweren oder verhindern. Dies könnte somit in einem deutlich niedrigeren Absorptionsmaximum resultieren und zusammen mit dem Maxima des Typ III-Kupferzentrums der N-terminalen FU-h-Domäne eine Absorptionsbande bei 556 nm bedingen (Kap D11.2.1, Abb. C46). Mutageneseexperimente an der Nitritreduktase von *Achromobacter cycloclastes* konnten diesbezüglich bereits belegen, dass verschiedene

Kupferzentren am N- und C-Terminus eine unterschiedliche Färbung hervorrufen können (Yamaguchi *et al.*, 2003, 2004). Um nachzuweisen, welchen Beitrag die Absorption der Cupredoxin-Domäne zum Gesamtspektrum der FU-h leistet, müsste diese allerdings isoliert, ohne das Hämocyanin-typische Typ III-Kupferzentrum vorliegen.

1.6 Biologische Bedeutung der FU KLH1-h und deren C-terminaler Cupredoxin-Domäne

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die C-terminale Cupredoxin-Domäne der FU KLH1-h ein Kupferatom trägt, so stellt sich dennoch die Frage nach dem biologischen Sinn und dem evolutionären Ursprung der viersträngigen β -Sandwich-Domäne. Man geht davon aus, dass die komplexe Struktur der heutigen Dekamere vermutlich im späten Präkambrium vor 740 Millionen Jahren, aus einem Vorläuferprotein mit einem einzelnen Kupferzentrum entstanden ist. Sequenzanalysen belegen, dass sich unter dem Selektionsdruck, größere respiratorische Proteine zu bilden, durch Genduplikation und -fusion zunächst ein FU-Dimer entstand (Lieb *et al.*, 2000, 2001). Dieses oligomerisierte schließlich zu einem dipentameren (= dekameren) Ring, wie er heute noch bei den fünf Dimeren der FU-h in der Kragenregion der Dekamere vorhanden ist. Vergleichbare Proteinstrukturen hat man auch beim Hämoglobin in Invertebraten gefunden (Ilan *et al.*, 1981). Anschließend evolvierten die FUs h-h zu g-h, wobei beide FUs nach wie vor ein Paar von Homodimeren innerhalb der wiederholenden Einheit bildeten. Durch zwei weitere Genduplikationen und -fusionen entstanden die FUs a – f, die zusammen mit den FUs g und h schließlich in der Ausbildung des komplexen Hohlzylinders resultierten. In diesem Zusammenhang ist es unwahrscheinlich, dass der evolutionäre Prozess der Strukturausbildung des Dekamers mit der FU-a startete. Strukturell spricht vieles für die Entstehung des Mollusken-Hämocyanins ausgehend von der FU-h, wobei die C-terminale Zusatzdomäne dieser FU erst nach der Dekamerbildung entstand (Lieb *et al.*, 2001). Bei den Hämocyaninen der Cephalopoden ging die FU-h später sekundär verloren. Die Gründe hierfür sind allerdings nach wie vor ungeklärt. Die Ursachen könnten in der unterschiedlichen Struktur beider Hämocyanin-Typen begründet liegen, die sich wiederum als Anpassung an die unterschiedlichen Lebensweisen der Cephalopoden und Gastropoden ergeben haben könnte. Die Dekamere der Cephalopoden besitzen einen zentralen Kragen, der von den FUs g gebildet wird (Lamy *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1994, 1995a; Mouche *et al.*, 1999), während sich der Kragen der Gastropoden-Hämocyanine aus den FUs g-h formt. Zudem lagern sich die asymmetrischen Dekamere der letzteren mit ihren offenen Seiten zu Didekameren zusammen (Terwilliger *et al.*, 1988; Van Holde *et al.*, 1992; Herskovits & Hamilton, 1991; Lambert *et al.*, 1995b). Womöglich ist die FU-h zur Aufrechterhaltung dieser komplexen Quartärstruktur essenziell und hat somit stabilisierende Eigenschaften (s. u.). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte hohe Thermostabilität der FU-h (Kap. D3.2) lässt sich mit dieser Vorstellung ebenfalls sehr gut in Einklang bringen. Das Fehlen der zusätzlichen FU der Cephalopoden-Hämocyanine könnte auch deren

Unvermögen erklären, stabile Untereinheiten-Dimere zu bilden (Bonaventura *et al.*, 1981; Van Holde & Miller, 1985).

Gielens *et al.* (1995) konnten bei der FU-h von *Pila leopoldvillensis* einen deutlich höheren Anteil an Glykosilierungen feststellen als bei den übrigen FUs. Auch bei der FU-h des KLH1 lassen sich anhand von Sequenzmotiven (NXT, NXS oder NXC, Foster & Davie, 1984) drei potenzielle, N-glykosidische Zucker nachweisen (NLT, NLC und NYC). Für das Motiv „NLT“ konnte mit Hilfe von Röntgenstruktur- und Cryo-TEM-Daten bereits die Existenz eines solchen Zuckers belegt werden (unveröffentlichte Daten von [REDACTED]; Kap. C10, Abb. C32). Die Zucker jedes der insgesamt fünf FU-h-Dimere des Dekamerkragens ragen hierbei sternförmig ins Innere des Hohlzylinders. Somit wäre ein stabilisierender Einfluss der Zucker der FU-h auf den Strukturhalt der Didekamere ebenfalls denkbar. Bezüglich des Zuckervorkommens kann ein stabilisierender Einfluss der Cupredoxin-Domäne allerdings ausgeschlossen werden, da sich die „NLT“-Bindungsstelle außerhalb dieser Domäne befindet.

Das Vorhandensein zusätzlicher Bindungsstellen zweiwertiger Kationen zwischen der FU-h und anderen assoziierten FUs des Dekamers könnte dem komplexen Hämocyanin weitere Stabilität verleihen. Dass Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen zur Aufrechterhaltung der Quartärstruktur notwendig sind, konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden (Harris *et al.*, 1997a, b, 1998, 2000; Harris & Markl, 1999; Gatsogiannis *et al.*, 2007). Bezüglich der Position solcher Bindungsstellen innerhalb des komplexen Moleküls ist allerdings noch nichts bekannt.

Nach Lieb *et al.* (2001) entstand die C-terminale Verlängerung der FU-h, die bei allen anderen FUs fehlt, erst nach dem evolutionären Prozess der Strukturausbildung des Dekamers. Da der komplexe Hohlzylinder vermutlich durch mehrere Genduplikationen und -fusionen aus der FU-h hervorging, könnte man aufgrund der strukturellen Verwandtschaft dieser Domäne zu Typ I-Kupferproteinen/Cupredoxinen allerdings auch postulieren, dass die Zusatzdomäne schon vor Beginn der Dekamerentstehung vorhanden war und bei den übrigen FUs als Folge der Genduplikationen und -fusionen verloren ging. Bei dem Vorläuferprotein der Mollusken-Hämocyanine mit einem einzelnen Kupferzentrum könnte es sich z.B. um ein Cupredoxin-ähnliches Protein gehandelt haben, das an der Kupferhomöostase beteiligt war. Aus diesem ging im ersten Schritt der Strukturbildung des Dekamers schließlich die FU-h hervor. Es wäre daher denkbar, dass letztere, neben dem zusätzlichen Typ III-Kupferzentrum zum Sauerstofftransport, nach wie vor noch das Cupredoxin-typische Typ I-Kupferzentrum beinhaltet, und dieses bei dieser FU bis heute erhalten blieb. Die Ursachen der Konservierung der zusätzlichen C-terminalen Domäne der FU-h könnten entweder in der strukturellen Organisation des Dekamer-Kragens des Gastropoden-Hämocyanins begründet liegen (s. o.), oder auch in einer nach wie vor vorhandenen Funktion bei der Kupferhomöostase.

Die sehr hohe Hämocyanin-Konzentration in der Hämolymphe von *Megathura crenulata* von bis zu 10 mg/ml (Senozan & Briggs, 1989), die sich nicht mit der trägen Lebensweise der Tiere und der ausschließlichen Funktion des KLH als Sauerstofftransporter rechtfertigen lässt,

spricht für eine zusätzliche, funktionelle Bedeutung des Hämocyanins. Hinzu kommt, dass die Hämocyanin-Konzentration sowohl saisonal, als auch bei verschiedenen Tieren im gleichen Habitat stark schwankt. Fox (1979) postulierte diesbezüglich bereits die Idee, dass Hämocyanine an der Detoxifizierung von Kupfer beteiligt sein könnten.

Über die Funktion und den Einbau eines eventuell zusätzlichen Kupferatoms innerhalb der Typ I-Kupferfaltung der C-terminalen Domäne der FU-h kann allerdings nur spekuliert werden. Kupfer ist eines der am häufigsten vorkommenden Übergangsmetalle in lebenden Organismen. Aufgrund seines Redoxpotenzials ist es ein wichtiger Cofaktor zahlreicher Enzyme/Proteine, die an der Zellatmung (Hämocyanine, Cytochrom C-Oxidase), Pigmentbildung (Tyrosinase) und der Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (Cu-/Zn-Superoxid-dismutase) beteiligt sind (Huffman *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2002b; Puig & Thiele, 2002; Harris, 2003; Decker *et al.*, 2006; 2007b). Da freies Kupfer toxisch ist, erfolgt die Kontrolle der Kupferhomöostase durch eine Vielzahl an molekularen Mechanismen (Lippard, 1999; Rae *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 1999, 2001; Kulkarni *et al.*, 2006). Außerhalb der Zelle wird Cu(II) zunächst durch Glutathion zu Cu(I) reduziert und in Form fester Komplexe stabilisiert (Freedman *et al.*, 1989; Ciriolo *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 1999). Hochaffine Kupfertransportproteine der CTR-Familie schleusen Cu(I) anschließend in die Zelle ein (Harris, 2003), wo es durch Metallothioneine, Kupferchaperone oder auch Typ I-Kupferproteine wie dem Cupredoxin-ähnlichen CopC-Protein aus *Pseudomonas syringae* gebunden wird (Harrison *et al.*, 2000; O'Halloran & Culotta, 2000; Rosenzweig, 2001; Field *et al.*, 2002; Arnesano *et al.*, 2002; Luk *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007).

Die Kupferhomöostase bei Mollusken wird ebenfalls von Metallothioneinen reguliert (Dallinger & Wieser, 1984; Brouwer *et al.*, 1986; Chabicovsky *et al.*, 2003). Sie sind z.B. am Kupfereinbau bei der Hämocyanin-Biosynthese in den Rhogocyten (Porenzellen) beteiligt (Simkiss & Mason, 1983; Dallinger, 1996; Haszprunar, 1996, Dallinger *et al.*, 1997, 2000; Albrecht *et al.*, 2001). Andere spezifische Transportproteine dienen vermutlich dem intrazellulären Kupfertransport zwischen den verschiedenen Rhogocyten-Kompartimenten (Dallinger *et al.*, 2005). Phagozytotische und endozytotische Eigenschaften der Porenzellen werden in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert (Simkiss & Mason, 1983; Dallinger, 1996; Haszprunar, 1996, Dallinger *et al.*, 1997, 2000). Da die Metallothioneine in den Kompartimenten der Hämocyanin-synthetisierenden Rhogocyten vorkommen und dort auch expremiert werden, könnte die Zusatzdomäne der FU KLH1-h aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu Cupredoxinen, ebenfalls eine Rolle bei den Mechanismen der Kupferhomöostase spielen. Eine Beteiligung an Metallakkumulation und -transport konnte bereits am Crustaceen-Hämocyanin belegt werden, obwohl die genauen Mechanismen nach wie vor unbekannt sind (Zatta, 1984; Chan & Weeks, 1992). Die außerordentliche Flexibilität der Zusatzdomäne der FU-h, die sich aus den hohen Temperaturfaktoren der Kristallstruktur ergibt (Kap. C10, Abb. C35), könnte eventuell für solche Kupfertransportprozesse notwendig sein.

Wie der Kupfereinbau beim Hämocyanin und vielen anderen Kupferproteinen vonstatten geht, und ob dies vor oder nach der Faltung des Proteingerüsts erfolgt, ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Während der Biosynthese von Kupferproteinen dient Glutathion der Mobilisierung und Lieferung von Kupfer. Die energetisch begünstigende Glutathion-Kupfer(I)-Verbindung ermöglicht hierbei die Bindung und den Kupferaustausch an den Kupferbindungsstellen von Kupferproteinen (Wang & Ballatori, 1998). Bei Tyrosinasen wurde eine sehr späte Kupferbeladung dokumentiert, die in den sekretorischen Kompartimenten erst nach Chaperon-gestützter Faltung des Proteingerüsts erfolgen kann (Spritz *et al.*, 1997; Branza-Nichita *et al.*, 1999). Eine größtenteils korrekte Faltung der Tyrosinasen ist hierbei Voraussetzung für die Kupferbindung (Spritz *et al.*, 1997; Branza-Nichita *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Kupfereinbau einer bakteriellen Tyrosinase sehr wahrscheinlich durch ein sogenannte assoziiertes *caddie*-Protein zustande kommt (Matoba *et al.*, 2006; Claus & Decker, 2007). In ähnlicher Weise könnte auch die C-terminale Cupredoxin-Domäne der FU-h für den Kupfereinbau im gesamten KLH-Molekül essenziell sein.

Ausblick:

Das größte Problem der Röntgenstrukturanalyse der FU KLH1-h bestand in der proteolytischen Aktivität der V8-Protease in der aufgereinigten Probe, die für eine zu geringe Auflösung der Kristallstruktur verantwortlich sein könnte. Da eine Inhibition der Protease mittels Pefabloc[®] nicht effizient genug war, wäre für zukünftige Studien der Einsatz des potenten irreversiblen Inhibitors DFP, unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen denkbar. Die geringe Auflösung könnte allerdings auch eine Folge unzureichender Spezifität der V8-Protease bei der Abspaltung der FU-h von den übrigen FUs der KLH1-UE sein, was in einer mittels SDS-PAGE kaum nachweisbaren Inhomogenität der Probe resultieren würde. Der Nachweis, ob die V8-Protease spezifisch innerhalb Linkerregion zwischen den FUs g und h spaltet, ließe sich durch massenspektroskopische Größenbestimmung der Proteine innerhalb der Kristalle oder auch durch Proteinsequenzierung der isolierten FU-h erbringen.

Basierend auf der verfügbaren Sequenz könnte die Spezifität der proteolytischen Spaltung durch die Wahl anderer Puffersysteme und pH-Werte vermutlich weiter optimiert werden. Eine andere Option wäre der Einsatz von Proteasen, die sich effizienter und dauerhaft inhibieren ließen, bei einer vergleichbar erfolgreichen und reinen Isolierung der FU KLH1-h. Hier könnte eventuell eine Kombination der Proteasen Trypsin, Endopeptidase Glu-C, Plasmin und Subtilisin, die u.a. bereits bei der Isolierung der OdH-g und Rth2-e verwendet wurden (Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2001), erfolgreich sein. Eine effiziente Aufreinigung der FU-h mittels Trypsin konnte in den bisherigen Studien jedoch noch nicht erreicht werden.

Die Etablierung von Strategien, die in einer nahezu vollständigen Entfernung der V8-Protease resultieren, war zwar Gegenstand dieser Arbeit, führte aber nur zur Ausbildung sehr kleiner Kristalle. Hier wäre es denkbar, die entsprechenden Kristallisationsbedingungen soweit zu

variieren, dass sich auch größere Kristalle mit mindestens 0,1 mm Durchmesser ausbilden könnten.

Zur Aufklärung der Frage, ob die charakteristische Farbgebung der isolierten FU-h auf einem zusätzlichen Typ I-Kupferatom innerhalb der C-terminalen Cupredoxin-Domäne basiert, könnte die Methode der Resonanz-Raman-Spektroskopie eingesetzt werden. Da die N-terminale Domäne der FU-h allerdings ein Typ III-Kupferzentrum mit anderer Konformation und entsprechend anderen spektroskopischen Eigenschaften besitzt, müsste die C-terminale Zusatzdomäne isoliert vorliegen. Aufgrund der globulären Struktur der FU dürfte dies bei limitierenden Enzymkonzentrationen jedoch schwierig sein.

Die exakte Modellierung des C-Terminus der Cupredoxin-Domäne, die bisher aufgrund der fehlenden Referenz der Röntgenstruktur nicht erfolgen konnte, wäre ein weiteres Ziel für zukünftige Arbeiten, die den Nachweis einer zusätzlichen, potenziellen Kupferbindungsstelle der FU-h erbringen könnte.

2 *Enzymkinetische Charakterisierungen des KLH*

2.1 **Aktivierung des KLH zur Tyrosinase/Catecholoxidase**

Die Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken haben sich vermutlich unabhängig voneinander aus einer universell in Organismen vorkommenden Tyrosinase entwickelt (Markl & Decker, 1992; Van Holde & Miller, 1995; Decker & Terwilliger, 2000; Burmester, 2002; Lieb *et al.*, 2001; Van Holde *et al.*, 2001). Auf dieser gemeinsamen Wurzel basiert die Ähnlichkeit der Hämocyanine, Tyrosinasen und Catecholoxidasen im Bereich des aktiven Zentrums. Prinzipiell sollten daher alle Typ III-Kupferproteine zur Umsetzung phenolischer Substrate befähigt sein, obwohl die Hämocyanine ihre enzymatische Aktivität im Laufe der Evolution verloren haben und heute ausschließlich dem Sauerstofftransport dienen. In zahlreichen Studien konnte eine Tyrosinase-/Catecholoxidase-Aktivität verschiedener Oligomerisierungszustände von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen durch den Einsatz des Detergenz SDS und/oder mittels Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Subtilisin erzielt werden (Tab. D1; Decker & Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2001; Pless *et al.*, 2003; Jaenicke & Decker, 2004a, b; Siddiqui *et al.*, 2004, 2006; Lee *et al.*, 2004; Olinas *et al.*, 2005; Nillius, 2007). Beim KLH resultierte der Einsatz dieser Proteasen jedoch in keiner Induktion oder Verstärkung intrinsischer Phenoloxidase-Aktivitäten. Die Gründe hierfür sind in strukturellen Unterschieden der verschiedenen Hämocyanine zu suchen, da sich die Hämocyanin-Familien vermutlich bereits sehr früh in ihrer evolutiven Entwicklung vor möglicherweise 800 Millionen Jahren voneinander getrennt haben. Die ausschließliche Funktion der Hämocyanine als Sauerstoff-Transportproteine resultiert aus der Blockierung des phenolischen Substratzugangs zum katalytischen Zentrum durch unterschiedliche Aminosäurereste. Beim Arthropoden-Hämocyanin konnten inhibitorische Studien belegen, dass es sich hierbei um einen Phenylalaninrest innerhalb der N-terminalen Domäne I handelt (Decker & Tuczak, 2000; Daquinag *et al.*, 1999). Durch tryptische Abspaltung dieser Domäne wird dem Substrat schließlich freier Zugang zum aktiven Zentrum gewährt. Beim Mollusken-Hämocyanin übernimmt ein Leucinrest der C-terminalen Domäne III die Inhibition der enzymatischen Aktivität (Cuff *et al.*, 1998). Eine proteolytische Aktivierung konnte allerdings nur beim Hämocyanin von *Helix pomatia* mittels Subtilisin erreicht werden (Siddiqui *et al.*, 2004, 2006). Zur Aktivierung des KLH wurde daher das Detergenz SDS verwendet, wie es seit vielen Jahren zum Nachweis und der Aktivierung von Phenoloxidasen und Hämocyanin eingesetzt wird (Moore & Flurkey, 1990; Chazarra *et al.*, 1996; Jiménez & Garcia-Carmona, 1996; Nellaippan & Sugumaran, 1996; Zlateva *et al.*, 1996; Van Gelder *et al.*, 1997; Salvato *et al.*, 1998; Espin *et al.*, 1999; Broothaerts *et al.*, 2000; Laveda *et al.*, 2000; Pless *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Jaenicke & Decker, 2004b; Decker *et al.*, 2001, 2007a, b; Nillius, 2007). Mizellare Konzentrationen an SDS führen hierbei zu Konformationsänderungen des Mollusken-Hämocyanins, wodurch der Leucinrest der β -Sandwich-Domäne aus dem aktiven Zentrum entfernt wird und einen optimalen Substratzugang ermöglicht (Kap. D2.2, Abb. D7). Eine zu vermutende Denaturierung des Proteins konnte sowohl von Baird *et al.* (2007), als

auch im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden (Kap. C13.4.1, Abb. C57). Nichtsdestotrotz war die Stabilität der Proteine nach Zugabe von 2mM SDS bereits deutlich geschwächt, was sich durch eine frühzeitige thermische Denaturierung des KLH darstellte (Kap. C14.3, Abb. C71).

Art	Oligomerisierungszustand	Aktivität	Aktivierung	Referenz
Arthropoda:				
Chelicerata:				
<i>Eurypelma californicum</i>	UE	TY	SDS/Trypsin	Decker & Rimke, 1998; Nillius, 2007
<i>Eurypelma californicum</i>	24-mer/UE	CO	SDS	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Limulus polyphemus</i>	48-mer/UE	TY/CO	SDS/Chymotrypsin	Decker <i>et al.</i> , 2001; Nillius, 2007
<i>Pandinus imperator</i>	24-mer/UE	TY/CO	SDS/Trypsin/Chymotrypsin	Nillius, 2007
Crustacea:				
<i>Astacus leptodactylus</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Bathynomus giganteus</i>	Hexamer/UE	CO	SDS	Pless <i>et al.</i> , 2003
<i>Calappa Granulata</i>	UE	CO	SDS	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Cancer magister</i>	UE	CO	SDS	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Cancer pagurus</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Carcinus maenas</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Homarus americanus</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Panulirus interruptus</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Paralithodes camtschaticae</i>	UE	CO	SDS/Trypsin	Jaenicke & Decker, 2004b
<i>Potamon potamion</i>	UE	CO	SDS	Jaenicke & Decker, 2004b
Mollusca:				
<i>Helix aspersa</i>	Multimer	CO	SDS	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Helix pomatia</i>	Multimer/UE/FUs	TY	Subtilisin	Siddiqui <i>et al.</i> , 2004, 2006
<i>Sepia officinalis</i>	Multimer/UE/FUs	CO	Subtilisin	Siddiqui <i>et al.</i> , 2004, 2006

Tab. D1: Catecholoxidase- (CO) und Tyrosinase (TY)-Aktivitäten verschiedener Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine.

In zahlreichen Studien konnte mittels SDS und/oder Proteasen wie Trypsin/Subtilisin eine CO- und/oder TY-Aktivität verschiedener Oligomerisierungszustände von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen induziert werden.

2.2 Molekulare Ursachen der intrinsischen und SDS-induzierten Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität einiger FUs des KLH

Anhand von qualitativen und quantitativen Studien konnte mittels des MBTH-Assays eine Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH belegt werden (Kap. C13.1, C13.2 und C13.4). Eine Zuordnung der enzymatischen Aktivität zu bestimmten FUs erfolgte durch *Crossed* Immunelektrophorese der zuvor mit Elastase in einzelne FUs gespaltenen KLH-UE und bestimmen isolierten Fragmenten (Kap. C13.2). Eine eindeutige Diphenolase- und teilweise auch Monophenolase-Aktivität ließ sich nach Zugabe verschiedener Substrate bei den FUs KLH1-a, KLH2-a und KLH2-f nachweisen. Diese FUs zeigten zudem eine geringe intrinsische Catecholoxidase-Aktivität ohne SDS-Aktivierung (Kap. C13.3 und C13.5). Vergleichbare Beobachtungen konnten von Siddiqui *et al.* (2004, 2006) auch bei der FU-f von *Helix pomatia* nach proteolytischer Aktivierung mit Subtilisin gemacht werden. Für diese FU ergab sich die höchste Diphenoloxidase-Aktivität, und auch eine schwache Monophenolase-Aktivität konnte bestätigt werden. Um die Phenoloxidase-Aktivitäten der unterschiedlichen FUs beider KLH-Isoformen direkt miteinander vergleichen zu können, erfolgten die photometrischen Messungen stets unter konstanten Bedingungen (Enzym-, Substratkonzentration usw.). Enzymkinetische Parameter (K_M , k_{cat} etc.) ließen sich anhand dieser Daten allerdings nicht bestimmen, so dass eine Gegenüberstellung mit den Daten anderer Mollusken-Hämocyanine nicht möglich war. Ein Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der verschiedenen Hämocyanine anhand der Absorptionzunahmen der gebildeten Reaktionsprodukte ist ebenfalls schwierig, da die Kinetiken in der Regel mit Hilfe des DOPACHrom-Assays und nicht wie bei dieser Arbeit mit einem MBTH-Assays gemessen wurden. Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand allerdings auch eher darin, FUs mit CO- und TY-Aktivität nach Zugabe verschiedener mono- und diphenolischer Substrate zu bestimmen und die molekularen Ursachen des SDS-induzierten Substratzugangs zum aktiven Zentrum aufzuklären. Ein Sequenzalignment verschiedener FUs des KLH zeigt, dass nur bei den enzymatisch aktivierbaren FUs KLH1-a, KLH2-a und KLH2-f konservierte, aromatische Aminosäuren in Form von hydrophoben Phenylalaninen und hydrophilen Tyrosinen an bestimmten Positionen vorzufinden sind (Abb. D6). Bei den FUs KLH2-d, -e, -g und KLH1-h ohne Phenoloxidase-Aktivität befinden sich an diesen Stellen Aminosäuren mit kleineren Resten und überwiegend gleicher Polarität (Ser-Thr, Ser-Ser; Ala-Val).

KLH1-a :	--LVRKSV [*] EH [*] LTQ [*] EE [*] TL [*] DL [*] QAA [*] LR [*] EL [*] OM [*] SS [*] SI [*] FG [*] CK [*] TA [*] AA [*] HC [*] AP [*] AS [*] CV [*] HK [*] -D [*] TS [*] -I [*] ACC [*] TH [*] G [*] MP [*] TF [*] PH [*] WR [*] RAY [*] VV [*] HM :	74
KLH2-a :	DTVVRK [*] NV [*] DSL [*] SS [*] DE [*] VLA [*] LE [*] KAL [*] DD [*] LQ [*] DD [*] SN [*] Q [*] YQ [*] AI [*] AG [*] Y [*] H [*] GV [*] PT [*] MC [*] V [*] DK [*] -HE [*] KNV [*] AC [*] CD [*] H [*] GM [*] PS [*] F [*] PL [*] WH [*] RL [*] YV [*] VOL :	77
KLH2-f :	---LR [*] ME [*] LS [*] EL [*] TER [*] DL [*] AS [*] L [*] KS [*] AM [*] RS [*] LO [*] AD [*] DG [*] VN [*] YQ [*] AI [*] AS [*] FG [*] HL [*] AS [*] CH [*] DD [*] -EG [*] HE [*] I [*] ACC [*] TH [*] G [*] MP [*] V [*] F [*] PH [*] WR [*] LY [*] TL [*] OM :	74
KLH2-d :	---TR [*] KN [*] IR [*] DL [*] SE [*] GE [*] IES [*] IR [*] SA [*] FL [*] QI [*] OK [*] E---G [*] IV [*] EN [*] IA [*] K [*] H [*] CK [*] PL [*] CE [*] HD [*] -G [*] -HP [*] V [*] ACC [*] V [*] H [*] GM [*] PT [*] F [*] PH [*] WR [*] LY [*] V [*] LO [*] V :	70
KLH2-e :	--LVR [*] KE [*] V [*] SSL [*] TT [*] TE [*] E [*] KH [*] FR [*] KA [*] L [*] KN [*] MO [*] AD [*] DS [*] PD [*] YQ [*] AI [*] AS [*] FG [*] HAL [*] PL [*] LO [*] PS [*] PS [*] AA [*] HR [*] HA [*] CC [*] HL [*] GM [*] AT [*] F [*] PH [*] WR [*] LY [*] TV [*] OF :	76
KLH2-g :	---VR [*] KD [*] V [*] TS [*] L [*] TASE [*] IE [*] NR [*] HA [*] L [*] Q [*] SV [*] MD [*] DD [*] GP [*] NG [*] FQ [*] AI [*] AA [*] Y [*] H [*] GS [*] FP [*] MC [*] HM [*] D---GR [*] D [*] V [*] AC [*] TH [*] GM [*] AS [*] F [*] PH [*] WR [*] RL [*] FV [*] KOM :	73
KLH1-h :	--LVR [*] KN [*] I [*] H [*] SL [*] SH [*] H [*] AE [*] EL [*] RD [*] AL [*] YK [*] LN [*] D [*] ESH [*] GS [*] Y [*] EH [*] IA [*] GH [*] GY [*] EN [*] LC [*] PE [*] K-G [*] DE [*] KY [*] PC [*] CV [*] H [*] GM [*] SI [*] F [*] PH [*] WR [*] RL [*] HT [*] IQ [*] F :	75
KLH1-a :	80 ER [*] AL [*] Q [*] T [*] K [*] RR [*] TS [*] GL [*] PY [*] WD [*] W [*] EP [*] IT [*] QL [*] PS [*] LA [*] DP [*] VY [*] IDS [*] Q [*] GG [*] KA [*] HT [*] NY [*] WR [*] GN [*] TD [*] FL [*] D---KK [*] T [*] NR [*] AV [*] -DD [*] RL [*] FE [*] KV [*] KPG [*] Q :	149
KLH2-a :	ER [*] AL [*] TR [*] KK [*] AT [*] IS [*] IP [*] Y [*] WD [*] W [*] SEL [*] TEL [*] PE [*] L [*] V [*] SH [*] PL [*] F [*] VG [*] TE [*] GG [*] KA [*] HD [*] NS [*] WY [*] RA [*] DI [*] TE [*] FL [*] N---KK [*] T [*] SR [*] AV [*] -DD [*] RL [*] FE [*] KV [*] QPG [*] H :	152
KLH2-f :	DM [*] AL [*] LS [*] H [*] GS [*] AV [*] AI [*] PY [*] WD [*] W [*] K [*] P [*] IS [*] K [*] LP [*] DL [*] FT [*] SP [*] EY [*] Y [*] DP [*] WR [*] D [*] AV [*] VN [*] NP [*] FA [*] K [*] GY [*] I [*] K [*] SE [*] D---AY [*] TV [*] RD [*] -OD [*] IL [*] Y [*] HL [*] QDET [*] G :	149
KLH2-d :	EN [*] AL [*] LR [*] GS [*] AV [*] AV [*] PY [*] WD [*] W [*] E [*] KAD [*] SL [*] PL [*] IND [*] AT [*] Y [*] F [*] NS [*] R [*] Q [*] T [*] FD [*] PN [*] PF [*] FR [*] G [*] HI [*] A [*] FEN [*] ---AV [*] TS [*] RD [*] -Q [*] PE [*] L [*] W [*] DN [*] KD [*] FYE :	145
KLH2-e :	ED [*] SL [*] K [*] R [*] H [*] GS [*] IV [*] GL [*] PY [*] WD [*] W [*] L [*] K [*] Q [*] S [*] AL [*] PD [*] L [*] VT [*] Q [*] ET [*] Y [*] E [*] HL [*] F [*] SH [*] K [*] T [*] FP [*] NP [*] FL [*] K [*] AN [*] IE [*] FE [*] GE [*] GV [*] T [*] ER [*] D [*] V [*] DA [*] E [*] HL [*] FA [*] K [*] GN [*] L [*] VY :	154
KLH2-g :	ED [*] AL [*] AA [*] H [*] GA [*] HI [*] GI [*] PY [*] WD [*] W [*] S [*] A [*] FS [*] HL [*] PA [*] L [*] VD [*] D [*] HE [*] HN-----P [*] F [*] H [*] G [*] H [*] IA [*] HR [*] N---VD [*] TS [*] RS [*] P [*] -RD [*] ML [*] ND [*] PE [*] HGS :	138
KLH1-h :	ER [*] AL [*] KK [*] H [*] GS [*] HL [*] GI [*] PY [*] WD [*] W [*] QT [*] ISS [*] L [*] PT [*] FF [*] AD [*] SG-----NN [*] PF [*] FK [*] Y [*] H [*] RS [*] IN [*] ---Q [*] D [*] TV [*] RD [*] V [*] -NE [*] AL [*] F [*] Q [*] Q [*] TK [*] FGE :	141
KLH1-a :	160 H [*] TH [*] LM [*] ES [*] VD [*] LA [*] LE [*] Q [*] DE [*] F [*] CK [*] FE [*] IQ [*] FE [*] LA [*] HN [*] A [*] HY [*] LV [*] GG [*] K [*] HD [*] Y [*] SM [*] AN [*] IE [*] Y [*] TA [*] YD [*] PI [*] F [*] FL [*] HH [*] SN [*] VD [*] RI [*] FA [*] I [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] EL [*] R [*] NK :	227
KLH2-a :	H [*] TRL [*] ME [*] GI [*] LD [*] LA [*] LE [*] Q [*] DE [*] F [*] CK [*] FE [*] IQ [*] FE [*] LA [*] HN [*] A [*] HY [*] LV [*] GG [*] R [*] HT [*] Y [*] SM [*] SH [*] LE [*] Y [*] TS [*] YD [*] PL [*] F [*] FL [*] HH [*] SN [*] TD [*] RI [*] FA [*] I [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] QL [*] R [*] GK :	230
KLH2-f :	TS [*] VL [*] LD [*] QT [*] LL [*] LA [*] LE [*] Q [*] TD [*] FC [*] DE [*] FE [*] VQ [*] FE [*] V [*] VH [*] NA [*] HY [*] LV [*] GG [*] R [*] Q [*] V [*] AL [*] SS [*] Q [*] H [*] Y [*] AS [*] YD [*] PA [*] F [*] I [*] HH [*] S [*] F [*] V [*] DK [*] I [*] W [*] AV [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] KK [*] R [*] K :	227
KLH2-d :	N-----V [*] ML [*] ALE [*] Q [*] DN [*] FC [*] DE [*] FE [*] IQ [*] FE [*] LA [*] HN [*] A [*] HS [*] R [*] LN [*] GG [*] R [*] AK [*] SL [*] SS [*] LD [*] Y [*] TA [*] FD [*] PV [*] F [*] FL [*] HH [*] AN [*] VD [*] RI [*] W [*] AI [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] RY [*] R [*] KK :	217
KLH2-e :	NN [*] WF [*] C [*] NA [*] Y [*] AL [*] EQ [*] EN [*] Y [*] CD [*] FE [*] IQ [*] FE [*] IL [*] HN [*] GH [*] HS [*] W [*] GG [*] S [*] K [*] TH [*] SI [*] GH [*] HY [*] AS [*] YD [*] PL [*] F [*] Y [*] I [*] HH [*] S [*] Q [*] TD [*] RI [*] W [*] AI [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] EH [*] R [*] GL :	232
KLH2-g :	ES [*] FF [*] Y [*] R [*] Q [*] VL [*] LA [*] LE [*] Q [*] TD [*] FC [*] DE [*] FE [*] VQ [*] FE [*] IL [*] HN [*] A [*] HS [*] WT [*] GG [*] HT [*] Y [*] GM [*] SS [*] LE [*] Y [*] TA [*] YD [*] PI [*] F [*] FL [*] HH [*] SN [*] TD [*] RI [*] W [*] AI [*] W [*] Q [*] AL [*] Q [*] KY [*] RG [*] F :	216
KLH1-h :	F [*] SS [*] IF [*] Y [*] LA [*] Q [*] AL [*] EE [*] DN [*] Y [*] CD [*] FE [*] VQ [*] FE [*] IL [*] HN [*] GH [*] HS [*] W [*] GG [*] A [*] E [*] KV [*] SM [*] ST [*] LE [*] Y [*] SA [*] FD [*] PY [*] FM [*] I [*] HH [*] AS [*] LD [*] KI [*] WI [*] Q [*] AL [*] Q [*] KR [*] RV [*] K :	219
KLH1-a :	240 D [*] PK [*] AM [*] DC [*] A [*] Q [*] EL [*] L [*] H [*] Q [*] K [*] ME [*] PE [*] FS [*] WE [*] ---D [*] ND [*] I [*] PL [*] T [*] NE [*] HS [*] T [*] PA [*] DL [*] FD [*] Y [*] C-EL [*] HY [*] D [*] YD [*] TL [*] N [*] LC [*] MT [*] PE [*] EL [*] K [*] TY [*] L [*] DER [*] SS [*] RA [*] FA [*] :	302
KLH2-a :	DP [*] NS [*] AD [*] CA [*] HN [*] L [*] I [*] HT [*] EM [*] EP [*] FR [*] DR [*] ---T [*] N [*] PL [*] DL [*] T [*] RE [*] H [*] AK [*] P [*] ADS [*] FD [*] Y [*] G-RL [*] GY [*] Q [*] YD [*] DL [*] SL [*] NC [*] MS [*] PE [*] EL [*] N [*] V [*] YL [*] GER [*] A [*] AK [*] ERT [*] F :	305
KLH2-f :	PY [*] H [*] K [*] AD [*] CA [*] LN [*] MM [*] T [*] K [*] EM [*] RP [*] FA [*] HD [*] ---F [*] N [*] HN [*] GF [*] T [*] K [*] M [*] HA [*] V [*] PN [*] TL [*] ED [*] F [*] Q-DL [*] F [*] Y [*] T [*] YD [*] N [*] LE [*] I [*] AC [*] M [*] N [*] V [*] N [*] Q [*] LE [*] AB [*] IN [*] RR [*] K [*] S [*] QT [*] RV [*] F :	302
KLH2-d :	PY [*] NE [*] AD [*] CA [*] V [*] NEM [*] R [*] K [*] LP [*] Q [*] F [*] NN [*] P-EL [*] NS [*] DS [*] ML [*] K [*] HN [*] L [*] Q [*] DS [*] FD [*] Y [*] Q [*] NR [*] FR [*] Y [*] Q [*] YD [*] N [*] L [*] Q [*] FN [*] HF [*] SI [*] Q [*] K [*] L [*] D [*] Q [*] T [*] I [*] Q [*] ARK [*] Q [*] HD [*] RV [*] F :	294
KLH2-e :	SG [*] KE [*] A [*] H [*] CA [*] LE [*] Q [*] M [*] K [*] D [*] PL [*] K [*] PF [*] S [*] FG [*] SP [*] YN [*] L [*] K [*] RT [*] Q [*] EF [*] S [*] K [*] PE [*] DI [*] FD [*] Y [*] H-R [*] FG [*] Y [*] E [*] YD [*] SL [*] EF [*] V [*] C [*] MS [*] V [*] SS [*] L [*] HN [*] Y [*] I [*] K [*] Q [*] Q [*] Q [*] E [*] AD [*] RV [*] F :	309
KLH2-g :	QY [*] NA [*] A [*] H [*] CD [*] I [*] Q [*] VL [*] K [*] Q [*] PL [*] K [*] PF [*] SE [*] ---SR [*] PN [*] P [*] V [*] T [*] RANS [*] RA [*] VD [*] SE [*] D [*] YE-RL [*] NY [*] Q [*] YD [*] TL [*] TF [*] H [*] CH [*] SI [*] SEL [*] D [*] AM [*] L [*] Q [*] ER [*] K [*] KE [*] ERT [*] F :	291
KLH1-h :	PA [*] H [*] AG [*] SC [*] A [*] GD [*] IM [*] H [*] V [*] EL [*] HP [*] FN [*] YE-SV [*] ND [*] DF [*] T [*] REN [*] SL [*] PN [*] AV [*] VD [*] SH-R [*] FN [*] Y [*] K [*] YD [*] N [*] L [*] N [*] L [*] H [*] CH [*] N [*] I [*] E [*] EL [*] EE [*] V [*] LR [*] SL [*] RL [*] K [*] S [*] RV [*] F :	295
KLH1-a :	320 AS [*] F [*] RL [*] K [*] GF [*] GS [*] AN [*] V [*] VY [*] V [*] CI [*] P [*] DD [*] ND [*] NR [*] ND [*] D [*] H [*] CE [*] KA [*] GF [*] FL [*] V [*] GG [*] PS [*] EM [*] K [*] W [*] GF [*] Y [*] R [*] P [*] YL [*] FD [*] LS [*] D [*] V [*] HK [*] I [*] GM [*] K-----L [*] D [*] GH [*] :	374
KLH2-a :	AS [*] F [*] RL [*] SG [*] GF [*] GS [*] AN [*] V [*] VY [*] V [*] CR [*] PA [*] H [*] DE [*] IS [*] DD [*] Q [*] CI [*] KA [*] GF [*] FL [*] V [*] GG [*] PT [*] EM [*] K [*] W [*] GF [*] Y [*] R [*] AY [*] H [*] FD [*] VT [*] DS [*] V [*] AS [*] IDD [*] -----G [*] H [*] GH [*] :	377
KLH2-f :	AG [*] F [*] LL [*] H [*] GI [*] ERS [*] AD [*] Y [*] RF [*] WI [*] CK [*] T-----A [*] DD [*] CH [*] AS [*] GM [*] I [*] IL [*] GG [*] S [*] K [*] EM [*] H [*] W [*] AD [*] RN [*] F [*] K [*] YD [*] I [*] T [*] Q [*] AL [*] KA [*] Q [*] SH [*] HP [*] ED [*] V [*] FD [*] T [*] D [*] AP :	374
KLH2-d :	AG [*] F [*] LL [*] H [*] NI [*] ET [*] SA [*] V [*] DI [*] Y [*] I [*] Q [*] VE---Q [*] G [*] GE [*] ON [*] CK [*] T [*] K [*] GS [*] FT [*] IL [*] GG [*] ET [*] EM [*] PF [*] H [*] DR [*] LY [*] K [*] FD [*] ITS [*] AL [*] HK [*] I [*] W [*] PL [*] DG-----H [*] G [*] :	365
KLH2-e :	AG [*] F [*] LL [*] H [*] GI [*] ERS [*] AD [*] Y [*] RF [*] WI [*] CK [*] T-----D [*] OS [*] CO [*] E [*] AG [*] Y [*] FS [*] V [*] GG [*] SE [*] MP [*] W [*] Q [*] ED [*] RL [*] Y [*] K [*] YD [*] IT [*] K [*] L [*] K [*] D [*] M [*] K [*] LR-----Y [*] DD [*] T :	375
KLH2-g :	AA [*] F [*] LL [*] H [*] GI [*] ERS [*] AD [*] Y [*] RF [*] WI [*] CK [*] T-----D [*] G [*] H [*] CA [*] FA [*] GT [*] FA [*] V [*] GG [*] EL [*] EM [*] P [*] WS [*] EB [*] RL [*] FR [*] YD [*] IT [*] K [*] VL [*] K [*] Q [*] N [*] L [*] H-----Y [*] D [*] SE :	357
KLH1-h :	AG [*] F [*] LL [*] SG [*] IR [*] TT [*] AV [*] V [*] K [*] Y [*] V [*] I [*] K [*] S-----G [*] T [*] D [*] S [*] DE [*] Y [*] AG [*] SE [*] VL [*] GG [*] AK [*] EM [*] P [*] WA [*] EB [*] RL [*] Y [*] RF [*] DI [*] TE [*] V [*] HN [*] N [*] L [*] T [*] DD-----H [*] :	361
KLH1-a :	400 Y [*] TV [*] KA [*] EL [*] FS [*] V [*] NG [*] TA [*] PD [*] DL [*] EP [*] H [*] V [*] V [*] V [*] HH [*] P----- : 403	403
KLH2-a :	Y [*] Y [*] V [*] K [*] SEL [*] FS [*] V [*] NG [*] S [*] AL [*] SN [*] DL [*] RO [*] PL [*] LV [*] HR [*] PA [*] K [*] GH [*] FD----- : 412	412
KLH2-f :	FF [*] TK [*] VE [*] V [*] H [*] GV [*] N [*] K [*] TA [*] LP [*] SS [*] AT [*] P [*] AP [*] TI----- : 399	399
KLH2-d :	FD [*] L [*] K [*] VD [*] V [*] RA [*] V [*] NG [*] SH [*] DD [*] QH [*] LL [*] NE [*] PS [*] LL [*] F [*] VE [*] G--- : 395	395
KLH2-e :	FT [*] IK [*] V [*] HI [*] K [*] DI [*] AG [*] AE [*] LD [*] SD [*] LI [*] ET [*] PS [*] V [*] LL----- : 402	402
KLH2-g :	F [*] H [*] FE [*] L [*] K [*] IV [*] GT [*] D [*] GT [*] EL [*] PS [*] DR [*] IK [*] SP [*] TI----- : 382	382
KLH1-h :	V [*] K [*] F [*] FD [*] L [*] K [*] K [*] Y [*] D [*] H [*] EL [*] ED [*] AS [*] VL [*] P [*] AP [*] TI [*] V [*] RR [*] EN [*] NA [*] VF [*] DT [*] IE [*] IP [*] IG [*] K [*] D [*] V [*] N [*] L [*] PP [*] K [*] V [*] V [*] V [*] K [*] R [*] G [*] T [*] K [*] IM [*] F [*] MS [*] V [*] DE [*] AV [*] TT [*] P [*] ML [*] N [*] L [*] GS [*] Y :	439
KLH1-a :	* 480 * 500 * 520 * : -	-
KLH2-a :	: -	-
KLH2-f :	: -	-
KLH2-d :	: -	-
KLH2-e :	: -	-
KLH2-g :	: -	-
KLH1-h :	T [*] AMP [*] K [*] CK [*] V [*] PP [*] FS [*] F [*] H [*] A [*] EL [*] G [*] K [*] M [*] YS [*] V [*] ES [*] GD [*] Y [*] F [*] MT [*] AS [*] T [*] TEL [*] C [*] ND [*] NN [*] L [*] R [*] L [*] H [*] V [*] H [*] V [*] D [*] DE----- : 492	492

Abb. D6: Sequenzalignment verschiedener FUs des KLH mit und ohne Catecholoxidase- (CO) bzw. Tyrosinase (TY)-Aktivität.

FUs des KLH mit CO- bzw. TY-Aktivität (orange) besitzen an bestimmten Positionen konservierte, aromatische Aminosäuren in Form eines Tyrosins mit hydrophilem Rest (cyanfarben) und einem Phenylalanin mit hydrophobem Rest (violett). Bei den übrigen, nicht aktivierbaren FUs (schwarz) befinden sich an dieser Stelle Aminosäuren mit kleineren Resten und überwiegend gleicher Polarität. Die Sequenzen der nur bei aktivierbaren FUs vorkommenden Loops (Abb. D7 a) sind dunkelrot gekennzeichnet. Farbmarkierungen der restlichen Aminosäuren: *schwarz*: 100 % identisch; *dunkelgrau*: 80 % identisch; *hellgrau*: 60 % identisch; *gelb*: Histidine des Typ III-Kupferzentrums; *blau*: Cysteine der bei Mollusken vorkommenden Thioetherbrücke; *grün*: Leucine, die bei Mollusken den Zugang phenolischer Substrate zum aktiven Zentrum blockieren; *rot*: verlängerter C-Terminus der FU KLH1-h; Das Alignment erfolgte mit Hilfe des Programms *GENEDOC*.

Um festzustellen, in welchem Bereich der aktivierbaren FUs des KLH sich die konservierten Phe- und Tyr-Reste befinden und ob diese ein Einfluss auf die enzymatischen Eigenschaften haben könnten, wurde anhand der verfügbaren Sequenzdaten sowie der Röntgenstruktur von OdH-g (Cuff *et al.*, 1998) die Faltung verschiedener FUs modelliert (Abb. D7).

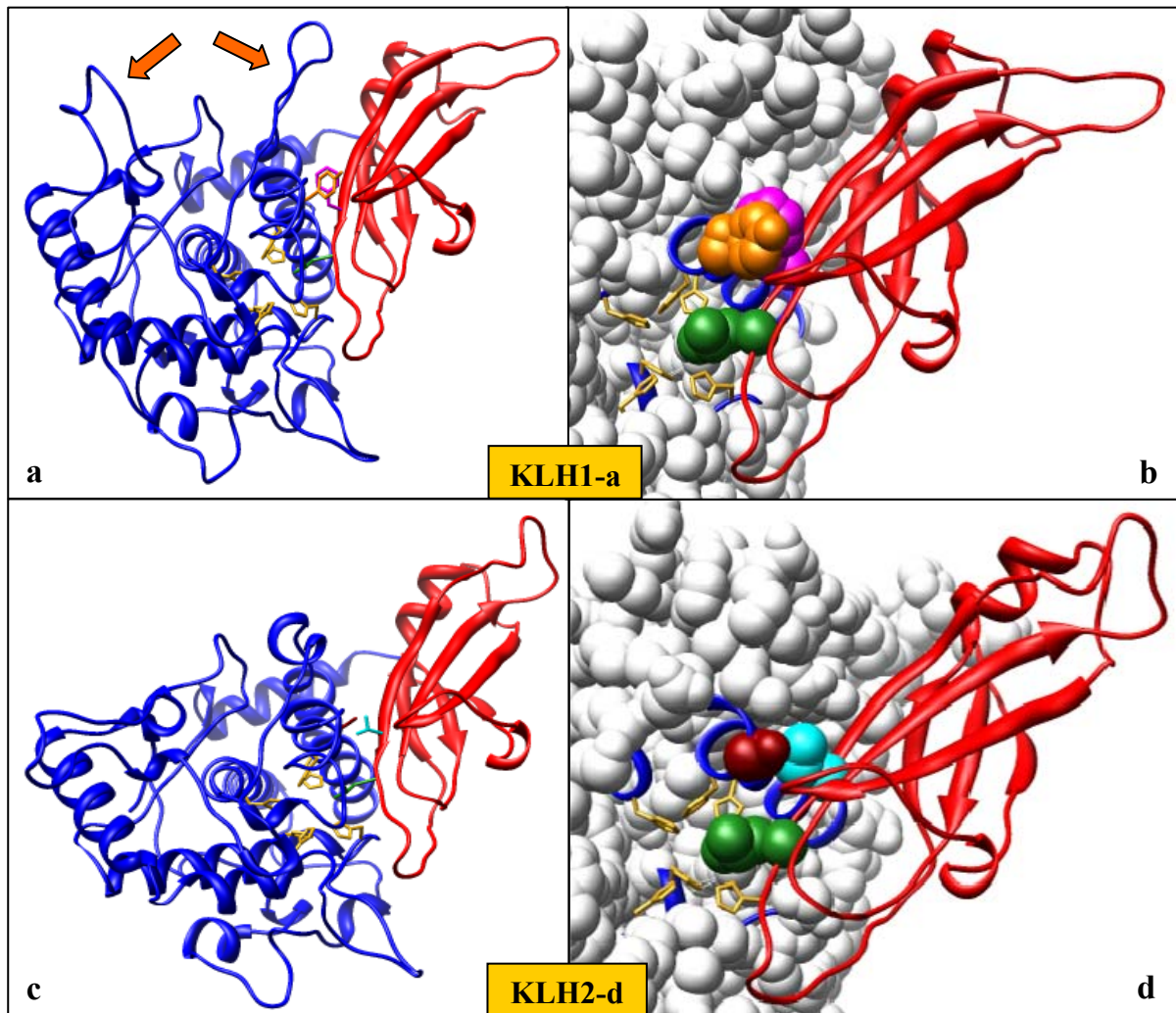


Abb. D7: Mögliche molekulare Ursachen der Catecholoxidase- (CO) und Tyrosinase (TY)-Aktivität einiger FUs des KLH.

Bei allen Mollusken-Hämocyaninen wird der Zugang eines mono- oder diphenolischen Substrats zum Typ III-Kupferzentrum (Histidine gelb) der N-terminalen Domäne (blau) durch ein Leucin (grün) der C-terminalen Domäne (rot) blockiert. Durch mizellare Konzentrationen des Detergenz SDS konnte bei den FUs KLH1-a, KLH2-a und KLH2-f eine CO- oder sogar TY-Aktivität erzielt werden. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einer Entfernung des Leucinrestes aus dem aktiven Zentrum resultiert, ohne eine Proteindenaturierung zu induzieren. Die molekulare Ursache der enzymatischen Aktivierbarkeit könnte aus einer Interaktion eines Tyrosins (orange) der N-terminalen Domäne und eines Phenylalanins (violett) der C-terminalen β -Sandwich-Domäne hervorgehen. Diese Aminosäuren existieren nur bei FUs mit Phenoloxidase-Aktivität wie der FU KLH1-a (a, b). Die Interaktion der hydrophilen bzw. hydrophoben Reste mit SDS-Mizellen könnte eine Konformationsänderung der C-terminalen Domäne bedingen, die einen Substratzugang zum aktiven Zentrum erst ermöglicht oder verbessert. Bei der FU KLH2-d befinden sich an gleicher Position die Aminosäuren Serin (dunkelrot) und Threonin (cyanfarben) mit deutlich kleineren und hydrophilen Resten (c, d). Auch bei den übrigen, nicht aktivierbaren FUs des KLH, sind an dieser Stelle ausschließlich kleinere Reste mit ähnlicher Polarität vorhanden (Abb. D6). Des Weiteren zeigen alle FUs mit CO- bzw. TY-Aktivität zwei Loops innerhalb der N-terminalen Domäne (orangefarbene Pfeile). Für diese Bereiche ließen sich keine eindeutigen Sekundärstrukturen modellieren, so dass die entsprechenden Aminosäuren auch eine andere Konformation bedingen könnten. Somit wäre auch eine Beteiligung bestimmter Aminosäuren oder Faltungsmotive dieser Regionen an einer SDS-vermittelten Aktivierung denkbar. Die Modellierung der FUs KLH1-a und KLH2-d erfolgte auf Basis der verfügbaren Sequenz sowie der Röntgenstruktur von OdH-g (Cuff *et al.*, 1998) mit Hilfe des *EXPASY*-tools (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Mit Hilfe der Modellstrukturen ließ sich nachweisen, dass die Phenylalanine der FUs KLH1-a, KLH2-a und KLH2-f mit Phenoloxidase-Aktivität innerhalb des dritten Strangs der β -Sandwich-Domäne liegen. Das ebenfalls bei den enzymatisch aktivierbaren FUs konservierte Tyrosin befindet sich hingegen in einer α -helikalen Region der N-terminalen

Domäne. Die Nähe dieser α -Helix zum dritten Strang der β -Sandwich-Domäne sowie die Orientierung des Phenylalanins und des Tyrosins, ermöglichen eine Aufeinanderlagerung der aromatischen Ringe aufgrund der delokalisierten Elektronensysteme außerhalb der Ringebene (Abb. D7 a, b). Zur Aktivierung einer FU muss das bei Mollusken konservierte Leucin, welches den Substratzugang zum aktiven Zentrum blockiert, zunächst durch SDS-induzierte Konformationsänderungen der C-terminalen Domäne entfernt werden. Die Interaktion des aromatischen Tyrosins und Phenylalanins zwischen beiden Domänen könnte auch aufgrund der Nähe zum inhibierenden Leucinrest eine entsprechende Konformationsänderung beeinflussen. Eine weitere Auffälligkeit aller aktivierbaren FUs sind zwei Loops der N-terminalen Domäne (orangefarbene Pfeile in Abb. D7 a). Sie deuten darauf hin, dass innerhalb dieser Regionen zusätzliche Aminosäuren existieren, die bei der zur Modellierung herangezogenen Referenz der verfügbaren Röntgenstruktur der OdH-g fehlen. Da sich für diese Bereiche folglich keine Sekundärstrukturen modellieren ließen, sind diese Loops als hypothetisch anzusehen und die entsprechenden Aminosäuren könnten auch eine andere Konformation der Sekundärstruktur bedingen. Eine Beteiligung bestimmter Aminosäuren oder Faltungsmotive dieser Regionen an einer SDS-induzierten Auffaltung wäre daher ebenfalls denkbar.

Aufgrund der Aufeinanderlagerung des Tyrosins und Phenylalanins zwischen beiden Domänen der aktivierbaren FUs kann man von einem eher stabilisierenden Effekt ausgehen. Betrachtet man sich die modellierten Strukturen der FUs ohne CO- oder TY-Aktivität, so fällt auf, dass an den entsprechenden Positionen überwiegend Aminosäuren mit kleineren Resten gleicher Polarität sitzen. Diese sind ebenfalls so orientiert, dass sie die N- und C-terminale Domäne über hydrophobe Wechselwirkungen, H-Brückenbindungen oder Van der Waals-Kräfte stabilisieren könnten (Abb. D7 c, d). Bezüglich der Frage, warum sich nur die FUs mit übereinander orientierten Tyrosin- und Phenylresten zur Phenoloxidase aktivieren lassen, muss die Wechselwirkung der entsprechenden Aminosäuren mit dem amphipathischen Detergenz SDS berücksichtigt werden. Eine Aminosäuresequenz mit einer innerhalb eines Proteins definierten Sekundärstruktur ändert ihre Konformation in einer anderen Proteinumgebung (Dalal *et al.*, 1997; Yuan & Clarke, 1998). Lösungsmittel wie wässriges Natriumdodecylsulfat (SDS) sind dafür bekannt, Sekundärstrukturen in Peptiden zu induzieren. Dabei kann sich die Art der Strukturausbildung unabhängig von der intrinsischen Neigung der Aminosäuresequenz vollziehen, wobei sich vorzugsweise α -helikale Strukturen ausbilden (Zhong & Johnson, 1992; Waterhous & Johnson, 1994). Veränderungen in der Tertiärstruktur des nativen Proteins durch partielle Entfaltung können somit konformationelle Veränderungen innerhalb einzelner Sequenzabschnitte induzieren, die wiederum einen Zugang phenolischer Substrate zum aktiven Zentrum ermöglichen. Des Weiteren konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass SDS-Mizellen mit aromatischen Resten interagieren und diese sogar in ihr hydrophobes Inneres aufnehmen können (Chassaing *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1992; Hémond *et al.*, 2003). Young *et al.* (1992) konnten allerdings belegen, dass hydrophobe Interaktionen alleine hierfür nicht ausreichen. Sie gehen davon aus, dass es zu einer Wechselwirkung von positiv geladenen Gruppen des Proteins/Peptids mit den negativ

geladenen Kopfgruppen der SDS-Mizellen kommt, die das Peptid zur Mizelle zieht und den aromatischen Ring schließlich in den hydrophoben inneren Bereich inserieren. Dies kann letztendlich zu einer Änderung der hydrophilen, lokalen Umgebung von Phenylgruppen zu einem hydrophoben Umfeld führen (Woolley & Deber, 1987). Im Falle des Tyrosins kommt es hingegen zu keiner hydrophoben Interaktion, sondern vielmehr zu einer elektrostatischen Abstoßung der negativ polarisierten Hydroxylgruppe und der negativ geladenen Oberfläche der SDS-Mizellen. Nach Hémond *et al.* (2003) kann eine Insertion der Tyrosinseitenkette in die SDS-Mizellen bzw. eine Änderung der lokalen Umgebung als Folge der Assoziation dennoch nicht ausgeschlossen werden. Bei größeren Peptiden spielen diesbezüglich, neben hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen, vermehrt auch H-Brückenbindungen eine Rolle (Lu & Lundahl, 1996). Wie SDS mit den konservierten Tyrosin- und/oder Phenylalaninresten der aktivierbaren FUs des KLH interagiert, ist nach wie vor unklar. Dass diese aromatischen Aminosäuren allerdings einen entscheidenden Beitrag hierzu leisten, ergibt sich alleine schon aus dem ausschließlichen Vorkommen derselbigen bei den FUs mit katalytischer Aktivität. Man kann eventuell davon ausgehen, dass die SDS-induzierten Konformationsänderungen der C-terminale β -Sandwich-Domäne, in Verbindung mit der elektrostatische Abstoßung zwischen Tyrosinrest der N-terminalen Domäne und SDS-Mizellen, einen Substratzugang zum katalytischen Zentrum erst ermöglichen. Die Substrate selbst könnten nach Annäherung an das aktive Zentrum eine weitere Konformationsänderung induzieren, die schließlich in deren Umsetzung resultiert. Auf ähnliche Weise lösen L-DOPA und Tyrosin in Melanomzellen einen Konformationsübergang von falsch gefalteter Tyrosinase in die korrekte native Form aus (Halaban *et al.*, 2001). Bei den nicht oder nur schwach aktivierbaren FUs ist die Auffaltung ohne eine elektrostatische Interaktion vermutlich zu gering, so dass nur kleinere phenolische Substrate ins aktive Zentrum eintreten können, oder die Umsatzgeschwindigkeit entsprechend niedriger ist. Die Ursachen für die geringe intrinsische CO-Aktivität der FUs KLH1-a, KLH2-a und KLH2-f lassen sich aufgrund der fehlenden SDS-Aktivierung allerdings nicht durch die Mizellen-Interaktion erklären. Hierbei spielen vermutlich noch weitere strukturelle Unterschiede der FUs eine Rolle, die sich allerdings nur durch hoch aufgelöste Röntgenstrukturen und zusätzliche Inhibitionsstudien aufklären lassen.

2.3 Einfluss von Effektoren auf die Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH

2.3.1 Regulation der Aktivität durch den Puffer

Verschiedene Puffersubstanzen können die enzymatische Aktivität des Hämocyanins beeinflussen und regulieren. Obwohl die Abhängigkeit vom Puffermedium in der Regel eher ein Laborartefakt darstellt, als eine physiologische Relevanz zu haben, muss dieser Einfluss *in vitro* berücksichtigt werden. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn bestimmte Substanzen die Charakteristika des zu untersuchenden Proteins verändern. So konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sich sowohl die Monophenolase- als auch Diphenolase-Aktivität des KLH durch die Puffersubstanz Tris erheblich steigern lässt (Kap. C13.6.1, Abb. C65 und Tab. C7). Lediglich mit dem diphenolischen Substrat Catechol zeigte sich ein inhibierender Effekt des Tris-Puffers, so dass der relative Substrat-Umsatz um etwa die Hälfte zurückging. Bei allen anderen getesteten mono- und diphenolischen Substraten kam es hingegen zu einer Verdopplung, bzw. beim Dopamin sogar zu einer Verdreifachung des relativen Substrat-Umsatzes. Beim KLH kann man im Falle eines aktivitätssteigernden Effekts von einer allosterischen Regulation durch Tris ausgehen. Studien an Arthropoden-Hämocyaninen konnten bereits eine Wirkung dieser Puffersubstanz als allosterischer Effektor belegen, indem es an die Kontaktstellen der Dodekamere bindet (Sternier, 1991; Sternier *et al.*, 1994). Die daraus resultierenden Konformationsänderungen des Proteins sind bei diesen Hämocyaninen vermutlich auch für die Induktion der Cresolase-Aktivität verantwortlich. Die aliphatischen Hydroxy-Gruppen der Puffersubstanz könnten hierbei zur Aktivierung beitragen. Von Tris ist bekannt, dass es auch bei der Sauerstoffbindung auf Ebene der Kopplung der beiden dodekameren Halbmoleküle als allosterischer Effektor wirkt (Sternier *et al.*, 1994). Daher wäre es denkbar, dass es auch beim Mollusken-Hämocyanin nicht nur an der Regulation des aktiven Zentrums bei der Sauerstoffbindung, sondern auch dessen Katalyse beteiligt ist. Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist allerdings ebenso wenig bekannt wie das physiologische Äquivalent zu Tris *in vivo*.

In der Regel erfolgten die Experimente zum Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität des KLH allerdings in Phosphat-Puffer, wie er bereits in zahlreichen anderen Studien eingesetzt wurde (Winder & Harris, 1991; Nellaiappan & Vinayakam, 1993; Winder, 1994; Nellaiappan & Sugumaran, 1996; Zlateva *et al.*, 1996; Decker & Rimke, 1998; Salvato *et al.*, 1998; Decker *et al.*, 2001; Hristova *et al.*, 2007). Zur Induktion einer schwachen Cresolase-Aktivität war bei den Studien an anderen Hämocyaninen allerdings die Anwesenheit des allosterischen Effektors Tris notwendig (Siddiqui *et al.*, 2004, 2006, Nillius, 2007). Beim KLH konnte hingegen erstmals auch eine schwache Monophenolase-Aktivität in Phosphat-Puffer beobachtet werden, die sich durch den Einsatz von Tris weiter steigern ließ (Kap. C13.6.1, Abb. C65 und Tab. C7). Die Cresolase-Aktivität des KLH in Phosphat-Puffer ist umso erstaunlicher, da dieser Puffersubstanz bei Arthropoden-Hämocyaninen und auch bei zahlreichen anderen Enzymen wie Urease, Carboxypeptidase, verschiedenen Kinasen und

Dehydroxykinasen eine inhibitorische Wirkung zugeschrieben werden konnte (Nillius, 2007; Blanchard, 1984). Beim KLH scheint ein solcher Einfluss des Phosphat-Puffers entweder nicht vorzuliegen, oder er ist deutlich geringer, da die Cresolase-Aktivität bei dieser Puffersubstanz nicht zum Erliegen kommt und nach wie vor nachweisbar ist. Es stellt sich somit die Frage, warum KLH in Phosphat-Puffer eine Cresolase-Aktivität zeigt, diese bei den anderen Hämocyaninen allerdings nur in Anwesenheit bestimmter Puffer mit effektorischen Eigenschaften möglich ist. Allen Hämocyaninen gemeinsam ist die Aktivierung mittels des Detergenz SDS. Da die Diphenolase-Aktivität innerhalb weniger Minuten abläuft, wirkt das anionische Detergenz nur aktivierend und denaturiert das Protein kaum (Kap. C13.41., Abb. C57). Der Tyramin-Umsatz bedingt allerdings eine sehr lange SDS-Inkubation und destabilisiert in dieser Zeit möglicherweise die korrekte Konformation des katalytischen Zentrums. Die für den Substrat-Umsatz notwendige Konfiguration kann daher nur unter bestimmten Bedingungen eingestellt werden. Aufgrund der Fähigkeit des Tris, als Effektor an Hämocyanin zu binden (Sternier *et al.*, 1994), stabilisiert es bei den Hämocyaninen, die ausschließlich bei Anwesenheit dieser Puffer-substanz Cresolase-Aktivität zeigen, vermutlich die Konformation, die zum Tyramin-Umsatz benötigt wird. Diesbezüglich wäre es auch denkbar, dass Tris in Verbindung mit dem Aktivator SDS als Co-Aktivator fungieren könnte. Auch beim KLH kann man von einem konformationsstabilisierenden Effekt des Tris ausgehen, da es den Monophenol-Umsatz steigerte (Kap. C13.6.1, Abb. C65 d, e und Tab. C7), und die KLH1-Didekamere (in Tris-haltigem Stab.-Puffer) auch nach 20 Minuten noch eine intakte Quartärstruktur zeigten (Kap. C13.4.1., Abb. C57). Im Gegensatz zu den anderen Hämocyaninen scheint beim KLH allerdings auch in Phosphat-Puffer eine optimale Einstellung der für den Monophenol-Umsatz notwendigen Konfiguration des aktiven Zentrums möglich zu sein, die einer längeren SDS-Inkubation standhält. Des Weiteren scheinen die SDS-induzierten Konformationsänderungen hier bereits auszureichen, um einen Zugang monophenolischer Substrate zum katalytischen Zentrum in Abwesenheit eines zusätzlichen Effektors oder Co-Aktivators zu ermöglichen. Abschließend bliebe noch die Frage zu klären, warum lediglich beim Umsatz des diphenolischen Substrats Catechol ein inhibitorischer Einfluss des Tris zu beobachten war (Kap. C13.6.1, Abb. C65 a und Tab. C7). Hierbei könnte eventuell die Wechselwirkung des KLH mit dem Substrat selbst eine Rolle spielen. Bioinformatische Studien konnten belegen, dass keine sterische Fixierung des strukturell primitiven Catechols an den entsprechenden Bindungsstellen des aktiven Zentrums vorliegt (Diplomarbeit Hagen Meckel, 2005). Ein Vorkommen des Catechols *in vivo* wurde bis heute ebenfalls nicht nachgewiesen. Umso erstaunlicher ist es, dass einige FUs des KLH dennoch zu einer enzymatischen Oxidation des Catechols befähigt sind (Kap. C13.2.1, Abb. C51 und Kap. C13.4.2, Abb. C58). Der Grund, warum das strukturell primitive Catechol allerdings nicht von allen FUs des KLH umgesetzt wird, ist nach wie vor ungeklärt und bedarf weiterer Studien. Eventuell bleibt das Substrat bei einigen FUs in einer Fehlorientierung im katalytischen Zentrum stecken und eine Oxidation oder Freisetzung des Catechols bleibt aus. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass Tris als Effektor oder Co-Aktivator auch bei

den in Phosphat-Puffer aktiven FUs eine Konformation des aktiven Zentrums bedingen könnte, die eine Umsetzung oder Freisetzung des Substrats erschweren.

2.3.2 Regulation der Aktivität durch zweiwertige Kationen

Bezüglich des bivalenten Kations Calcium ließen sich im Rahmen dieser Arbeit aufgrund seines schlechten Löslichkeitsprodukts keine Untersuchungen zum Einfluss auf die Mono- bzw. Diphenolase-Aktivität des KLH durchführen. Die Zugabe des Aktivators SDS (Natriumdodecylsulfat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) resultiert in Verbindung mit Ca^{2+} in der Bildung von Kalkseife ($\text{Ca}(\text{DS})_2$), die unter den gegebenen Versuchsbedingungen ausfällt. Zudem kann die Aufrechterhaltung einer konstanten SDS- bzw. Ca^{2+} -Konzentration durch die Entstehung weißer, nadelförmiger Kristalle im Versuchsansatz nicht gewährleistet werden. Für das Gastropoden-Hämocyanin von *Helix pomatia* konnte allerdings schon sehr früh nachgewiesen werden, dass es eine deutlich niedrigere Affinität für Calcium hat als für Magnesium (Burton, 1972; Vannoppen-Ver Eecke & Lontie, 1973). Studien zum Einfluss des zweiwertigen Kations Magnesium waren somit von größerer Bedeutung, obwohl die Messungen auch hier nur bis zu einer Konzentration von 20 mM MgCl_2 auswertbar waren. Noch höhere Konzentrationen resultierten in einer Trübung und somit starken Streuung der Ansätze im Photometer. Ansätze unter vergleichbaren Bedingungen ohne Protein zeigten hingegen keine Niederschlagsbildung, so dass man von einem Ausfallen des KLH bei derart hohen und nicht physiologischen Salzkonzentrationen ausgehen kann. Messungen in Phosphat-Puffer waren aufgrund der in Anwesenheit von Mg^{2+} üblichen Bildung und dem Ausfallen von Magnesiumphosphat nicht möglich. Die Versuche erfolgten daher alle in Tris-Puffer, für den in der Regel bereits ein aktivitätssteigernder Effekt nachgewiesen werden konnte (Kap. D2.3.1).

2.3.2.1 Diphenoloxidase-Aktivität

Zusätzlich zur Puffersubstanz (Kap. D2.3.1) kann auch Magnesium die Rolle eines Effektors zugeschrieben werden. Allerdings ergab sich bei Anwesenheit von MgCl_2 eine im Vergleich zu Tris entgegengesetzte Wirkung auf die Diphenolase-Aktivität. Während Tris zur Steigerung des relativen Dopamin-Umsatzes führte, wurde dieser mit MgCl_2 proportional zur Konzentration inhibiert. Bei der maximal möglichen Konzentration von 20 mM MgCl_2 , nahm der relative Substrat-Umsatz um den Faktor 2,8 ab (Kap. C13.6.2, Abb. C66 a - b und Tab. C9). Auch bei Arthropoden-Hämocyaninen verschiedener Spezies konnte ein Einfluss von Mg^{2+} auf die SDS-aktivierte Diphenoloxidase-Aktivität bestätigt werden. Interessant ist allerdings, dass sich hier durch Mg^{2+} eine Steigerung der Aktivität erzielen ließ (Nillius, 2007). Bei den Hämocyaninen von *P. imperator* und *E. californicum* konnte durch Zugabe von 30 mM MgCl_2 sogar eine, wenn auch deutlich schwächere, Diphenoloxidase-Aktivität ohne SDS-Aktivator induziert werden. Da SDS ein unphysiologisches Detergenz darstellt, wurde für diese Ionen, im Falle einer physiologischen Bedeutung der Phenoloxidase-Aktivität dieser Hämocyanine, bereits eine Beteiligung an der natürlichen Aktivierung postuliert. Beim

KLH stellt die SDS-induzierte Mono- und Diphenolase-Aktivität hingegen vermutlich ein Laborartefakt dar (Kap. D2.4), das sich aus den strukturellen Ähnlichkeiten der Typ III-Kupferzentren von Tyrosinasen/Catecholoxidasen und Hämocyaninen ergibt. Bei den Mollusken-Hämocyaninen drängt sich daher nicht unmittelbar die Frage nach einem physiologischen Aktivator auf, zumal Mg^{2+} -Ionen aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten inhibitorischen Wirkung beim KLH von vorneherein ausscheiden würden. Auch wenn die Mg^{2+} -Konzentration in der Hämolymphe nur 4,3 mM beträgt (Harris *et al.*, 1998), würde diese Menge aufgrund des starken effektorischen Einflusses dieses Kations bereits für eine Inhibition ausreichen (Kap. C13.6.2, Abb. C66 a – b und Tab. C9). Nichtsdestotrotz sind die Gründe der Hemmung durch Mg^{2+} -Ionen interessant und können Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen der Phenoloxidase-Aktivität verschiedener Hämocyanine auch im Hinblick auf strukturelle Besonderheiten geben. Die Unterschiede des effektorischen Einflusses von bivalenten Kationen bei Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen lassen sich vermutlich auf deren unterschiedliche Struktur zurückführen. Sowohl die Anzahl, als auch die Position der Mg^{2+} -Bindungsstellen könnten einen weiteren Einfluss auf die Konformation des aktiven Zentrums ausüben, die schließlich eine Verstärkung oder Hemmung der Phenoloxidase-Aktivität bedingen könnten. Basierend auf Cryo-TEM- und Sequenzdaten lassen sich beim KLH bis zu 10 solcher Bindungsstellen ausmachen (unveröffentlichte Daten von [REDACTED]). Die Bestimmung der genauen Position derselbigen bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen. Es wäre somit durchaus denkbar, dass hohe Konzentrationen an $MgCl_2$ zu einer entsprechenden Stabilisierung der nativen Konformation des katalytischen Zentrums beitragen und eine SDS-induzierte Konformationsänderung somit erschweren. Die Folge wäre ein erschwerter Substratzugang, der schließlich in einer Inhibition des relativen Dopamin-Umsatzes resultiert. Dass bivalente Kationen einen stabilisierenden Effekt auf die Strukturen des Mollusken-Hämocyanine ausüben, konnte bereits in zahlreichen Studien und auch in dieser Arbeit belegt werden (Kap. D.3.2.5; Brenowitz *et al.*, 1984; Sterner *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997a, b, 1998; Dolashka-Angelova *et al.*, 2003; Georgieva *et al.*, 2004). Beim Arthropoden-Hämocyanin lässt sich die generelle Aktivitätssteigerung entsprechend durch eine Konformationsänderung erklären, die auch ohne SDS-Aktivierung bereits einen Substratzugang zum katalytischen Zentrum ermöglicht. Ein weiterer Hinweis für eine differenzielle Regulation des Diphenol-Umsatzes beider Hämocyanin-Typen durch zweiwertige Kationen ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass nur bei den höher oligomerisierten Arthropoden-Hämocyaninen von *E. californicum* und *P. imperator* eine Aktivität nachweisbar war (Nillius, 2007). Da einzelne Untereinheiten keine Aktivität zeigten, war diese entsprechend vom Oligomerisierungsgrad abhängig. Beim KLH erfolgten die Studien zum Einfluss des Effektors Mg^{2+} allerdings ausschließlich anhand der Untereinheiten, wo sich, wie bereits geschildert, ein deutlich inhibitorischer Effekt ergab. Dies spricht somit für eine Regulation der Diphenolase-Aktivität durch Bindung bivalenter Kationen, auch auf der Ebene der Untereinheiten. Interessant wäre diesbezüglich der Einfluss dieses Effektors auf die höher oligomerisierten Didekameran und ob sich hier eventuell eine

allosterische Regulation erkennen lassen würde. Eine allosterische Regulation der Sauerstoffbindung durch verschiedene zweiwertige Kationen wurde bereits bei verschiedenen Gastropoden-Hämocyaninen nachgewiesen (Konings *et al.*, 1969; Mangum & Lykkeboe, 1979; Brix *et al.*, 1990; Mikkelsen & Weber, 1992; Wells *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2001). In Abwesenheit bivalenter Kationen zeigte sich bei *H. pomatia* beispielsweise nur noch ein hyperbolischer Verlauf der Bindungskurve. Eventuell ist der Effektor Mg^{2+} auf der Ebene der KLH-Didekamere auch an der Regulation des aktiven Zentrums bei der Sauerstoffkatalyse beteiligt. Dass es sich hierbei wie bei den KLH-UE um eine inhibitorische Regulation handelt, ist zu vermuten, bedarf zur eindeutigen Klärung allerdings weiterer Studien.

2.3.2.2 Monophenolhydroxylase-Aktivität

Bei der Monophenolhydroxylase-Aktivität des KLH ließ sich kein eindeutiger, effektorischer Einfluss der Mg^{2+} -Ionen nachweisen. Hier zeigten sich selbst nach Zugabe von 20 mM $MgCl_2$ keine signifikanten Unterschiede zur Umsetzung des monophenolischen Tyramins in Tris-Puffer ohne Mg^{2+} (Kap. C13.6.2, Abb. C66 c, d und Tab. C9). Eventuell kann man eine geringfügige Steigerung des relativen Substrat-Umsatzes postulieren, die allerdings erst nach etwa 10-minütiger Reaktionsdauer eintrat. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde Tyramin aufgrund einer länger andauernden *Lagphase* etwas schwächer umgesetzt. Beim Arthropoden-Hämocyanin von *E. californicum* und *P. imperator* wurde hingegen eine Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration nachgewiesen (Nillius, 2007). Interessant ist hier die inverse Regulation der Monophenolase-Aktivität: Während die Cresolase-Aktivität von *E. californicum*-Hämocyanin proportional mit der Mg^{2+} -Konzentration steigt, nimmt diese beim *P. imperator*-Hämocyanin antiproportional mit der Konzentration dieses zweiwertigen Kations ab. Dennoch kommt es bei beiden Hämocyanin-Typen zu einer Mg^{2+} -abhängigen Verkürzung der „Verzögerungsphase“. Beim Arthropoden-Hämocyanin wurde diesbezüglich die Hypothese aufgestellt, dass neben der Puffersubstanz (Tris) auch Mg^{2+} in der *Lagphase* zu einer Änderung der Konfiguration führt, die dann einen Monophenol-Umsatz am aktiven Zentrum zulässt. Dass es beim KLH unter dem Einfluss von $MgCl_2$ zu keiner Verkürzung, sondern Verlängerung der „Verzögerungsphase“ kommt, lässt sich prinzipiell mit dem ebenfalls inhibitorischen Effekt dieses Kations bei der Umsetzung des diphenolischen Dopamins in Einklang bringen (Kap. D2.3.2.1.). Auch hier kann man davon ausgehen, dass Mg^{2+} aufgrund seiner stabilisierenden Wirkung die SDS-induzierte Einstellung der Cresolase-Konformation erschwert. Erst nach längerer Einwirkzeit des Aktivator SDS wird ein relativer Substrat-Umsatz erreicht, der mit dem in Tris-Puffer ohne $MgCl_2$ vergleichbar bzw. sogar minimal höher ist. Um eine höhere Monophenolase-Aktivität definitiv zu belegen, müsste die Reaktion allerdings vermutlich über mehrere Stunden verfolgt werden. So kam es beim Spinnen-Hämocyanin erst nach siebenstündiger Inkubationszeit mit dem SDS-Aktivator zu einer mehr als 35-fachen Steigerung des Substrat-Umsatzes (Nillius, 2007). Auch im Falle des KLH wäre es denkbar, dass Mg^{2+} erst nach entsprechend langer Inkubationsdauer mit dem Aktivator SDS eine entsprechende Cresolase-Konformation begünstigen könnte. In diesem

Fall wäre es zudem interessant zu wissen, ob sich bei den höher oligomerisierten KLH-Didekameran eine im Vergleich zu den hier untersuchten Untereinheiten allosterische Regulation durch zweiwertige Kationen ergeben würde.

2.4 Biologische Bedeutung der Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität des KLH

Tyrosinasen und Catecholoxidasen (in Arthropoden gemeinsam als Phenoloxidasen bezeichnet) sind bei den meisten Arthropoden vorzufinden. Sie katalysieren die Hydroxylierung von Monophenolen bzw. die Oxidation von *ortho(o)*-Diphenolen zu *o*-Chinonen, oder beides. Die hoch reaktiven Chinone dienen der Sklerotisierung der Proteinmatrix von Arthropoden nach der Häutung (Andersen *et al.*, 1996; Sugumaran *et al.*, 1987; Sugumaran, 1998, 2002). Tyrosinasen sind zudem für die Synthese des Melanins verantwortlich, dem neben der Braun-/Schwarzfärbung des Exoskeletts, bedingt durch seine fungistatischen, bakteriostatischen und antiviralen Eigenschaften, auch eine Beteiligung an der primären Immunabwehr und der Wundheilung zugeschrieben wird (Montefiori & Zhou, 1991; Ashida & Brey, 1995; Marmaras *et al.*, 1996; Sidibe *et al.*, 1996; Sugumaran, 1996; Johansson & Söderhäll, 1996; Söderhäll & Cerenius, 1998; Nagai & Kawabata, 2000; Sugumaran, 2002; Adachi *et al.*, 2005; Nillius, 2007).

Aufgrund der Möglichkeit, Cheliceraten-Hämocyanine *in vitro* durch Detergenzien wie SDS oder auch Proteasen zu aktivieren, wird schon seit längerem eine Phenoloxidase-Aktivität dieser Hämocyanine *in vivo* diskutiert. Die biologische Relevanz der SDS-vermittelten Aktivierung ist aufgrund seiner denaturierenden Eigenschaften allerdings umstritten. Ein denkbare physiologisches Äquivalent stellen Fettsäuren und Lipide dar, die neben endogenen Aktivierungssystemen auch an der Aktivierung der inaktiven Vorstufen der „echten“ Phenoloxidasen (Prophenoloxidasen, ProPO) beteiligt sind (Sugumaran & Nellaiappan, 1991; Asada *et al.*, 1993; Aspán *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1995). Die tatsächliche wirksame Verbindung ist aber bislang unbekannt. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht in der Beobachtung, dass Glukane (Kohlenhydrate in der Zellwand von Pilzen) und Lipopolysaccharide von Gramnegativen Bakterien *in vivo* sowohl eine Aktivierung von Phenoloxidasen als auch Arthropoden-Hämocyaninen induzieren können (Söderhäll & Häll, 1984; Brehélin *et al.*, 1989; Gregório & Ratcliffe, 1991; Söderhäll & Cerenius, 1998; Lee *et al.*, 2003). Für die resultierende Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins wird eine Beteiligung an unspezifischen Abwehrreaktionen im Rahmen der primären Immunantwort diskutiert (Nagai & Kawabata, 2000; Adachi *et al.*, 2005; Nillius, 2007). Diese beinhalten Melaninbildung, Zelladhäsion und die Encystierung eindringender Keime. Zudem werden bei der Aktivierung häufig auch Peptidfragmente vom C-Terminus des Hämocyanins abgespalten, die als antimikrobielle Peptide in der Hämolymphe wirksam sind (Lee *et al.*, 2003; Decker & Jaenicke, 2004).

Auch bei verschiedenen Mollusken-Hämocyaninen konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass sie nach entsprechender Aktivierung zu einer Umsetzung diphenolischer und teilweise auch monophenolischer Substrate befähigt sind (Kap. D2.1). Im

Gegensatz zu den Arthropoden-Hämocyaninen ist eine proteolytische Aktivierung, bedingt durch strukturelle Unterschiede der beiden Hämocyanin-Typen, hingegen nicht möglich, so dass in der Regel das Detergenz SDS eingesetzt wurde (Kap. D2.1, Tab. D1). Bei *Octopus* konnte eine Cresolase-Aktivität auch durch Behandlung mit 10 % Methanol und 8 M Harnstoff erzielt werden (Morioka *et al.*, 2006). Lediglich beim Hämocyanin von *H. pomatia* ergab sich neben einer generellen Diphenolase- auch eine geringe Monophenolase-Aktivität der FU-f nach limitierender Proteolyse mit Subtilisin (Siddiqui *et al.*, 2004, 2006). Interessant ist, dass im Rahmen dieser Arbeit (neben der FU KLH1-a) auch beim KLH2 eine Cresolase-Aktivität der FU-f ermittelt wurde (Kap. C13.2.4, Abb. C54 und Kap. C13.4.5, Abb. C61). Die Aktivierung erfolgte hier allerdings mittels SDS. Des Weiteren beobachteten Siddiqui *et al.* (2004, 2006) bei *Helix pomatia* eine schwache intrinsische Diphenolase-Aktivität mit Catechol, die ebenfalls beim KLH nachweisbar war (Kap. C13.3, Abb. C56 und Kap. C13.5, Abb. C63). Insbesondere aufgrund dieser Gemeinsamkeiten zwischen *H. pomatia* und *M. crenulata* stellt sich die Frage, ob man von einer, dem Cheliceraten-Hämocyanin vergleichbaren, physiologischen Funktion der nativen Mollusken-Hämocyanine ausgehen kann, oder ob es sich bei der Phenoloxidase-Aktivität ausschließlich um Laborartefakte handelt, die auf den strukturellen und evolutionär begründeten Gemeinsamkeiten der aktiven Zentren von Hämocyaninen und Tyrosinasen/Catecholoxidasen basieren. Was auf eine „echte“ Funktion hinweisen könnte, ist die Topologie der aktivierbaren FUs innerhalb des Didekamers des KLH (Abb. D8). Die zur Diphenolase aktivierbaren FUs KLH1/2-a und -f einer Isoform befinden sich jeweils an den oberen und unteren Eckpunkten der wandbildenden Region eines UE-Dimers und stehen in direktem Kontakt zu den FUs-a bzw. -f des nächsten UE-Dimers des Dekamers. Eine vergleichbare Situation besteht bei den UE b und c des Hämocyanins von *E. californicum*, die zur Überbrückung der strukturell identischen 2 x 6-meren Halbmoleküle dienen und für die ebenfalls eine Phenoloxidase-Aktivität mit einer möglichen *in vivo*-Funktion nachgewiesen wurde (Decker & Rimke, 1998).

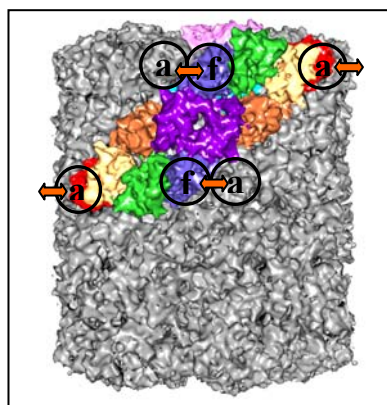


Abb. D8: Topologie der zur Diphenolase aktivierbaren FUs-a und -f innerhalb eines UE-Dimers des KLH-Didekamers.

Die zur Diphenolase aktivierbaren FUs KLH1/2-a und -f einer Isoform befinden sich jeweils an den oberen und unteren Eckpunkten der wandbildenden Region eines UE-Dimers und stehen in direktem Kontakt zu den FUs-a bzw. -f des nächsten UE-Dimers des Dekamers.

Im Falle einer *in vivo*-Funktion der Mono- oder Diphenolase-Aktivität des Mollusken-Hämocyanins sollte man, wie im Falle des Cheliceraten-Hämocyanins, von einer Abwesenheit echter Tyrosinasen/Phenoloxidasen bei diesen Tieren ausgehen. Obwohl die Existenz von Phenoloxidasen bereits im Blut zahlreicher Invertebraten bestätigt (Smith & Söderhäll, 1991) und ausgiebig in Arthropoden untersucht wurde (Söderhäll, 1992), sind bis heute nur wenige Informationen über das Vorkommen von Phenoloxidasen bzw. Tyrosinasen bei Mollusken oder speziell bei Gastropoden verfügbar. Auch in der frischen und Hämocyanin-freien Hämolymphe von *M. crenulata* konnte in dieser Arbeit anhand von gelelektrophoretischen Methoden keine Phenoloxidase-Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies schließt die Existenz von inaktiven ProPO allerdings nicht aus.

Die meisten Studien zur Phenoloxidase-Aktivität erfolgten bisher bei Bivalviern (Asokan *et al.*, 1997; Wootton & Pipe, 2003; Cong *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2007). Coles & Pipe (1994) berichteten von einer ProPO in der gesamten Hämolymphe sowie den Hämocyten der marinen Muschel *Mytilus edulis*. Bei *Perna viridis* konnte eine Aktivierung der ProPO durch bakterielle Lipopolysaccharide nachgewiesen werden (Asokan *et al.*, 1997). Hier geht man demnach wie bei Arthropoden von einer Beteiligung des ProPO-Systems sowohl im Plasma als auch den Hämocyten bei der „Nicht-Selbst-Erkennung“ und der Immunantwort aus.

Auch bei Cephalopoden konnte das Vorkommen von Tyrosinasen bestätigt werden. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Synthese des im Tintenbeutel angereicherten schwarzen, unlöslichen Pigments Melanin. Letzteres wird im Zuge der Abwehr und Verteidigung potenzieller Fressfeinde aus dem Beutel ausgestoßen. Das Enzym ließ sich sowohl in den reifen Zellen der Tintendrüse, als auch dem Tintenbeutel selbst nachweisen (Naraoka *et al.*, 2003; Fiore *et al.*, 2004).

Bei Gastropoden existieren Verteidigungsmechanismen in Form einer Tintenabgabe häufig nur bei den schalenlosen Seehasen wie *Aplysia californica*. Im Gegensatz zu den Cephalopoden besteht die dunkle Farbe der Tinte allerdings nicht aus Melanin, sondern aus einem Pigment roter Seealgen (Phycoerythrobilin), die sie von Steinen abweiden (Chapman & Fox, 1969; MacColl *et al.*, 1990). Tyrosinasen werden für die Tintensynthese daher nicht benötigt. Eine Mono- und Diphenolase-Aktivität wurde allerdings im Mantel der Lungenschnecke *Achatina fulica* bestimmt (Nellaiappan & Kalyani, 1989). Phenoloxidasen sind hier für die Sklerotisierung der Schale verantwortlich. Aufgrund der beobachteten Thermostabilität des Enzyms und der Beobachtung, dass Hämocyanin-synthetisierende Rhogocyten u.a. auch im Mantel vorkommen (Albrecht *et al.*, 2001), könnte man prinzipiell auch das Hämocyanin für diese Aktivität verantwortlich machen. Allerdings sollte sich die enzymatische Aktivität dann auch im Fuß und der Mitteldarmdrüse nachweisen lassen, die ebenfalls Porenzellen enthalten. Daten sind diesbezüglich allerdings noch nicht bekannt. Eventuell findet die Aktivierung der Hämocyanine mittels spezieller Effektoren auch nur dort statt, wo eine entsprechende Aktivität (wie z.B. in der Mantelregion) notwendig ist. Die Tatsache, dass die mittels SDS induzierten Monophenolase-Aktivitäten der Gastropoden-Hämocyanine bei allen Studien generell sehr niedrig ausfielen, spricht allerdings eher gegen

diese Hypothese. Man könnte eventuell postulieren, dass die hohe Hämocyanin-Konzentration in der Hämolymphe die geringe Aktivität einzelner Moleküle ausgleicht. Dies könnte auch erklären, warum beim KLH saisonale Schwankungen der Konzentration von $\sim 1 - 10$ mg/ml auftreten (Senozan & Briggs, 1989), die sich mit einer ausschließlichen Funktion als Sauerstofftransportprotein nicht erklären lassen.

Im Falle der Steigerung des Phenol-Umsatzes *in vivo* durch spezifische Effektoren müssten diese sehr effizient sein. Die potenten Aktivatoren Harnstoff oder SDS der *in vitro*-Studien können aufgrund ihrer denaturierenden Eigenschaften eher als unphysiologische Aktivatoren betrachtet werden. Eine proteolytische Aktivierung oder der effektorische Einfluss verschiedener Kationen wäre am ehesten denkbar. Proteasen wie Trypsin waren allerdings bisher nur bei der *in vitro*-Aktivierung von Arthropoden-Hämocyaninen erfolgreich (Decker & Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2001; Jaenicke & Decker, 2004b; Nillius, 2007). Eine physiologische Aktivierung des KLH mittels zweiwertiger Kationen ist zumindest für Mg^{2+} eher unwahrscheinlich, da sich bei Anwesenheit dieses Ions eine starke Inhibition des Diphenol-Umsatzes der KLH-UE zeigte (Kap. C13.6.2, Abb. C66 a, b). Wie sich dieser Effektor allerdings auf Ebene der oligomerisierten Didekamere verhält, ist ebenso unklar wie der Einfluss anderer Kationen (Kap. D2.3.2.1). Bei *Helix pomatia* und *Haliotis iris* konnte z.B. in Verbindung mit Mg^{2+} eine Zunahme der Sauerstoffaffinität nachgewiesen werden (Konings *et al.*, 1969; Mikkelsen & Weber, 1992; Wells *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2001). Eventuell sind vergleichbare Effekte auch bei der enzymatischen Sauerstoffkatalyse zu erwarten, wobei die Konzentration dieser Ionen in der Hämolymphe sicherlich eine entscheidende Rolle spielt. Magnesium und Calcium kommt in der Hämocyanin-freien Hämolymphe von *Megathura crenulata* in einer Konzentration von 4,3 mM bzw. 2,7 mM vor (Harris *et al.*, 1998). Dies ist zwar niedriger, als die im Rahmen dieser Arbeit minimal eingesetzte Menge von 10 mM Mg^{2+} , allerdings sollten aufgrund des starken, effektorischen Einflusses von Mg^{2+} , bei entsprechend hoher Hämocyanin-Konzentration, auch geringere Mengen für eine enzymatische Regulation ausreichen. Zudem wäre eine weitere Erhöhung der Konzentration an bivalenten Kationen in der Hämolymphe bei physiologischem Bedarf denkbar. Im Fall des Cheliceraten-Hämocyanins von *E. californicum* und *P. imperator* ergab sich ebenfalls ein starker effektorischer Einfluss von Mg^{2+} -Ionen (Nillius, 2007). Hier liegen die Mengen an Mg^{2+} und Ca^{2+} mit 1 mM - 4,5 mM in vergleichbaren Konzentrationen in der Hämolymphe vor, wie beim KLH (Decker, 1981; Schartau & Leidescher, 1983; Paul *et al.*, 1994; Nillius, 2007). Im Gegensatz zu den KLH-UE konnte bei den oligomeren Molekülen jedoch eine Steigerung des Diphenol-Umsatzes beobachtet werden, die so effizient war, dass auch in Abwesenheit des Aktivators SDS eine Diphenolase-Aktivität möglich war (Nillius, 2007). Bezüglich der Umsetzung monophenolischer Substrate waren die Beobachtungen hingegen bei beiden Cheliceraten-Spezies gegenläufig, da sich beim Hämocyanin von *P. imperator* in Anwesenheit von Mg^{2+} nur eine sehr schwache Cresolase-Aktivität zeigte. Grundsätzlich sprechen diese Beobachtungen aber eher für eine mögliche Beteiligung dieser Kationen an der Aktivierung des Cheliceraten-Hämocyanins, als des Gastropoden-

Hämocyanins *in vivo*. Interessant ist die Beobachtung von Asokan *et al.* (1997), die bei der Muschel *Perna viridis* eine Hemmung der ProPO-Aktivierung bei hohen Konzentrationen an Ca^{2+} feststellen konnten, obwohl diese bivalenten Kationen bei Insekten und Crustaceen für eine Laminarin-induzierte Aktivierung der ProPO-Kaskade essenziell sind (Leonard *et al.*, 1985; Ashida *et al.*, 1983; Ashida & Söderhäll, 1984). Diese Gegensätze stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen der Aktivierung der Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine von *E. californicum*, *P. Imperator* und *M. crenulata* (s.o.). Die Ursache lässt sich vermutlich auf die unterschiedliche phylogenetische Verwandtschaft der PO zurückführen, von denen zwei Typen vorkommen (Van Holde & Miller, 1995; Durstewitz & Terwilliger, 1997; Van Gelder *et al.*, 1997; Jaenicke & Decker, 2004a). Der erste Typ (m-PO) ist bezüglich der generellen Struktur sowie des aktiven Zentrums näher mit dem Mollusken-Hämocyanin verwandt, während der zweite Typ (a-PO) dem Arthropoden-Hämocyanin sehr ähnlich ist und in Crustaceen und anderen Arthropoden zusammen mit dem Hämocyanin in der Hämolymphe vorkommt (Aspán *et al.*, 1995; Sritunyalucksana & Söderhäll, 2000; Burmester, 2002; Jaenicke & Decker, 2003; Terwilliger & Ryan, 2006).

Die Frage nach einer möglichen physiologischen Funktion der Phenoloxidase-Aktivität des Mollusken-Hämocyanins bzw. des KLH ist somit nach wie vor offen und bedarf vor allem zusätzlicher *in vivo*-Studien. Aufgrund der strukturellen und evolutionär begründeten Gemeinsamkeiten der aktiven Zentren von Hämocyaninen und Phenoloxidasen kann man bei den Mollusken allerdings eher von einem evolutionären *in vitro*-Artefakt ausgehen. Darauf deutet auch der Umstand, dass bei Cephalopoden und Bivalviern, im Gegensatz zu den Cheliceraten, bereits „echte“ Tyrosinasen/Phenoloxidasen nachgewiesen wurden. Bei den Gastropoden kann man ebenfalls von der Existenz dieser Enzyme ausgehen, obwohl bei dieser Klasse bislang erst wenige Studien diesbezüglich durchgeführt wurden.

Ausblick:

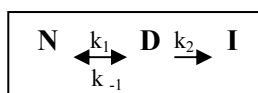
Um weitere Hinweise auf eine mögliche physiologische Funktion der *in vitro* induzierten Mono- und Diphenolase-Aktivität des KLH zu bekommen, wäre es vor allem wichtig, einen Umsatz der entsprechenden Substrate auch *in vivo* nachzuweisen. Ein erster indirekter Beleg wäre die Abwesenheit „echter“ Phenoloxidasen/Tyrosinasen bzw. deren inaktiver Vorstufen. Des Weiteren sollten die in dieser Arbeit ermittelten Daten zu den katalytisch aktivierbaren FUs erweitert werden, indem zusätzliche enzymkinetische Parameter (K_M , k_{cat} etc.) durch Variation der Versuchsbedingungen (Enzym-, Substratkonzentration, pH-Wert) oder O_2 -Verbrauchsmessungen ermittelt und mit den Literaturwerten anderer Hämocyanine verglichen werden. Die molekularen Ursachen der intrinsischen bzw. induzierten Phenoloxidase-Aktivität einiger FUs ließen sich durch Inhibitionsstudien (mit Mimosin, PTU) weiter aufklären. Auch der Einfluss verschiedener Effektoren bedarf im Hinblick auf mögliche physiologische Aktivatoren weiterer Studien. Hierbei sollten neben verschiedenen Puffer-substanzen auch Kationen wie Ca^{2+} , Na^+ , K^+ an verschiedenen Oligomerisierungsformen des KLH getestet werden.

3 Thermodynamische Charakterisierungen des KLH

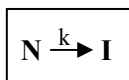
3.1 Irreversibilität der thermischen Denaturierung des KLH

Alle thermischen Denaturierungen der verschiedenen Oligomerisierungsformen des KLH waren irreversibel, da in der DSC keine weiteren thermischen Effekte nach einer zweiten Heizphase beobachtet werden konnten (Kap. C14.2, Abb. C69). Zudem waren alle Messungen von der Scanrate abhängig (Kap. C14.2, Abb. C70), was ebenfalls Kennzeichen einer unter diesen Bedingungen kinetisch kontrollierten, irreversiblen Denaturierung ist (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988; Lepock *et al.*, 1992; Kurganov *et al.*, 1997; Lyubarev *et al.*, 2000). Ein ähnliches Verhalten wurde bisher auch bei den Hämocyaninen von *Rapana thomasiana* (Gastropoda), *Palinurus vulgaris* (Crustacea) und *Eurypelma calicornicum* (Arthropoda) beobachtet (Guzman-Casado *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1995; Idakieva *et al.*, 2005). Als Grund wird hierfür die artifizielle Aggregation der hoch oligomerisierten Proteine bzw. deren Polypeptidketten mit zunehmender Temperatur angeführt (Klibanov & Ahern, 1987). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand von TEM-Aufnahmen durch teilweise riesige Clusterbildungen des KLH ab 70 °C bestätigt werden (Kap. C4.4, Abb. C72 h).

Aufgrund der Irreversibilität der Denaturierung war eine Bestimmung der thermodynamischen Gleichgewichtsparameter (ΔC_p) nicht möglich, und die thermische Analyse der Kurven erfolgte ausschließlich anhand der Halbumwandlungstemperaturen (T_m). Gemäß dem **Lumry und Eyring-Modell** (Lumry & Eyring, 1954) ist die irreversible Denaturierung ein **Zwei-Stufen-Prozess**:



Der erste Schritt beinhaltet die reversible Entfaltung des nativen Proteins (N), gefolgt von einer irreversiblen Reaktion des denaturierten Proteins (D) in ein irreversibles Stadium (I), ohne mögliche Rückfaltung in den nativen Zustand. Ein spezieller Fall dieses Modells tritt ein, wenn $k_2 \gg k_{-1}$, wobei die meisten denaturierten Moleküle in den I-Zustand übertreten, anstatt sich in den nativen Zustand zurückzufalten. In diesem Fall kann die Denaturierung als **Ein-Stufen-Prozess** angesehen werden:



Auf Basis dieses Modells erfolgten die irreversiblen DSC-Messungen von Sanchez-Ruiz *et al.* (1988) und die Auswertung der DSC-Daten der thermischen Denaturierung von *Palinurus vulgaris* (Guzman-Casado *et al.*, 1990). Idakieva *et al.* (2005) schlugen diesbezüglich einen komplizierteren **Mehrstufen-Prozess** vor, da deren ermittelte ΔH_{cal} und T_m -Werte der thermischen Denaturierung unabhängig von der Proteinkonzentration waren. Allerdings sollte jede Änderung des Oligomerisierungsgrades während des Denaturierungsprozesses eine Konzentrationsabhängigkeit des T_m bedingen (Fukada *et al.*, 1983). Da dies beim Rth und PvH nicht festgestellt wurde (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Idakieva *et al.*, 2005), sollte das

denaturierte Protein im selben Oligomerisierungszustand verbleiben, wie das native Protein. Ein Zerfall der Proteine in UE/Monomere kann demnach erst stattfinden, wenn die geschwindigkeitsbestimmende und irreversible Denaturierung eine Kinetik erster Ordnung zeigt. Beim RtH konnte, wenn die Aufheizung am T_m gestoppt wurde, in einem zweiten Heizzyklus noch 55 % der Hitzeabsorption des ersten Scans detektiert werden (Idakieva *et al.*, 2005). Dies wurde als weiterer Grund für einen komplizierteren Charakter der Denaturierung angeführt, wobei die Irreversibilität nicht als Ergebnis der hohen Temperatur angeführt wurde, sondern als Folge des Denaturierungsprozesses. Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim KLH gemacht werden. Für die KLH1-UE ergaben sich drei thermische Übergänge in der DSC. Wurde die Aufheizung kurz vor Erreichen des ersten T_m gestoppt, verschwand im zweiten Heizzyklus nur der Gipfel des ersten thermischen Übergangs, während die Peaks der Reaktionen bei höheren T_m -Werten bestehen blieben (Kap. C14.2, Abb. C69). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass auch beim KLH keine Konzentrationsabhängigkeit des T_m feststellbar war (Daten nicht gezeigt), lässt sich das Mehrstufen-Modell prinzipiell auch auf das KLH anwenden, welches als Gastropoden-Hämocyanin zudem keine strukturellen Unterschiede zum RtH zeigt. Da es, bedingt durch die Anwesenheit bivalenter Kationen, zu einem starken Abfall der Hitzekapazität bei höheren Temperaturen kam (Kap. C14.1, Abb. C68), war eine Ermittlung der ΔH_{cal} -Werte jedoch nicht möglich, so dass eine weitergehende Interpretation ausschließlich anhand der T_m -Werte schwierig war. Allerdings konnte die Theorie von Idakieva *et al.* (2005), dass denaturiertes Mollusken-Hämocyanin größtenteils im nativen Oligomerisierungszustand verbleibt, beim KLH zumindest in Anwesenheit zweiwertiger Kationen bei Temperaturen bis zu 70°C im TEM bestätigt werden. Obwohl bereits deutliche Denaturierungserscheinungen in Form einer Schwarzfärbung und „Verbrennung“ der Probe eintraten, waren teilweise noch hoch oligomerisierte Didekamere zu erkennen (Kap. C4.4, Abb. C72 h).

3.2 Untersuchungen zur thermischen Stabilität des KLH in der DSC

Aufgrund der irreversiblen thermischen Denaturierung des KLH und aller bisher untersuchten Hämocyanine, ist es schwierig, thermodynamische Parameter zu bestimmen und ein Modell der thermodynamischen Entfaltung dieser Proteine zu entwerfen. Entsprechend wenig Information ist diesbezüglich bis heute über die verschiedenen Hämocyanine verfügbar. Nichtsdestotrotz erfolgten in den letzten Jahren bereits einige Studien zur thermischen Stabilität an verschiedenen Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen von *Rapana thomasi* (Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 1998; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Parvanova *et al.*, 2000, 2003), *Helix pomatia* (Idakieva *et al.*, 2006), *Viviparus ater* (Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 2001), *Eurypelma californicum* (Sternner *et al.*, 1995; Nillius, 2007), *Limulus polyphemus* (Georgieva *et al.*, 1998), *Homarus americanus* (Hristova *et al.*, 1997), *Palinurus vulgaris* (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Hristova *et al.*, 1997), *Pandinus imperator* (Nillius, 2007) *Astacus leptodactylus*, *Potamion potamios* (Conze, 2005), *Carcinus aestuarii* (Dolashka-Angelova *et al.*, 1999), *Carcinus maenas*, *Maia*

squinado, *Callinectes sapidus*, *Buthus indicus* und *Androctonus australis* (Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 1998). Auch das Hämocyanin von *Megathura crenulata* war Gegenstand einiger Untersuchungen, wobei die Bestimmung der thermischen Stabilität allerdings anhand von Fluoreszenz- und CD-spektroskopischen Daten erfolgte (Georgieva *et al.*, 1998; Schütz, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Dolashki *et al.*, 2005). Die damit bereits verfügbaren Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit durch DSC-Messungen an verschiedenen Oligomerisierungsformen wie Didekameren, Dekameren, UE und einzelnen FUs vervollständigt werden. Die ermittelten T_m -Werte der verschiedenen KLH-Proteine werden im Folgenden mit den Literaturangaben anderer Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine verglichen und bezüglich ihrer thermischen Stabilität diskutiert (Tab. D2).

Hämocyanin	T_m (°C)
RtH (Didekamer) ^a	83
FU RtH1-h ^b	83
PvH (Hexamer) ^{c‡}	63,1
PvH (UE) ^{c‡}	49,1
EcH (24-mer) ^d	90
EcH (UE) ^d	68,4
Oxy-HpH (Didekamer) ^e	84
Apo-HpH (Didekamer) ^e	63,5
KLH1-Didekamer	76
KLH1-Dekamer*	74
KLH2-Didekamer	72/78
KLH1-UE ⁺	73/79/85
KLH2-UE ⁺	70/82
FU KLH1-h	80
FUs KLH1-abc ⁺	73
FU KLH2-c	71

Tab. D2: Mittels DSC bestimmte Schmelzpunkte (T_m) der thermischen Denaturierung verschiedener Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine.

Die Messungen erfolgten in 20 mM MOPS pH 7,2/8,5* ohne (+) bzw. mit 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ und in 50 mM Na-Phosphat pH 7,2 (‡). Die Scanrate betrug beim KLH 90 °C/Std., ansonsten 60 °C/Std. Daten aus a) Idakieva *et al.*, 2005; b) Parvanova *et al.*, 2003; c) Guzmán-Casado *et al.*, 1990; d) Sterner *et al.*, 1995; e) Idakieva *et al.*, 2006.

Die Didekamere des KLH zeigten Schmelzpunkte bei 74 °C für die Isoform 1, bzw. bei 72 ° und 78 °C für die Isoform 2. Diese Werte lagen nur geringfügig unter den T_m -Werten der Didekamere von HpH und RtH mit 83 ° und 84 °C (Idakieva *et al.*, 2005, 2006). Bei den KLH2-Didekameren sowie den UE beider Isoformen konnten mehrere thermische Entfaltungsreaktionen gemessen werden (Kap. C14.1, Abb. C68). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich auch bei den Didekameren des RtH (Idakieva *et al.*, 2005), was auf einen komplexen Entfaltungsprozess und unterschiedliche Denaturierungskinetiken der einzelnen UE bzw. FUs schließen lässt. Die DSC-Messungen einzelner FUs und Mehrdomänen-Fragmente bestätigten eine entsprechend unterschiedliche thermische Stabilität der

wandbildenden Domänen (KLH1-abc = 73 °C, KLH2-c = 71 °C) im Vergleich zu der Kragendomäne (KLH1-h = 80 °C). Dieser Sachverhalt wurde auch beim RtH beobachtet, wo die FU RtH1-h ebenfalls eine deutlich höhere Stabilität zeigte als die FUs RtH1-a und RtH2-a (Dolashka-Angelova *et al.*, 1999; Parvanova *et al.*, 2003; Idakieva *et al.*, 2005).

3.2.1 Einfluss des Oligomerisierungszustands

Betrachtet man sich die T_m -Werte der Arthropoden-Hämocyanine, so lässt sich eine Zunahme der thermischen Stabilität mit dem Oligomerisierungsgrad beobachten (Tab. D1). Monomere von PvH waren um etwa 10 °C weniger stabil als Hexamere (Guzmán-Casado *et al.*, 1990). Beim 24-meren EcH konnte in Anwesenheit bivalenter Kationen sogar eine Temperaturstabilität bis über 90 °C nachgewiesen werden, während die UE nur einen T_m von 68,4 °C zeigten (Sterner *et al.*, 1995). Auch die im Vergleich zum hexameren (1 x 6) Crustaceen-Hämocyanin von *Palinurus vulgaris* höhere Konformationsstabilität des 24-meren (4 x 6) Cheliceraten-Hämocyanins von *Eurypelma californicum*, lässt sich sehr gut anhand des höheren Oligomerisierungszustands erklären.

Beim Hämocyanin der Mollusken, speziell beim KLH, war eine solche Abhängigkeit der Thermostabilität vom Oligomerisierungszustand zumindest anhand der DSC-Daten nur bedingt abzulesen (Tab. D1 und Kap. C14.1, Abb. C68). Die FUs KLH1-abc und KLH2-c der Wandregion der KLH-Dekamere, waren mit 71 – 73 °C nur geringfügig instabiler als native Didekamere mit 76 – 78 °C. Beim RtH lagen die Schmelzpunkte der FU-h mit 83 °C genauso hoch, wie bei den oligomerisierten Molekülen (Idakieva *et al.*, 2005). Die Kragendomäne des KLH war mit 80 °C sogar thermostabiler als dessen Didekamere (76 °C) und Dekamere (74 °C).

3.2.2 Einfluss von Glykosilierungen

Zahlreiche Studien weisen auf einen stabilisierenden Einfluss von Zuckern hin, deren Anteil bei Mollusken-Hämocyaninen zudem höher ist, als bei Arthropoden-Hämocyaninen (Kamerling & Vliegenthart, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 1999; Dolashki *et al.*, 2005; Schütz *et al.*, 2001; Dolashka-Angelova *et al.*, 1999, 2007). Dolashki *et al.* (2005) verglichen die thermische Stabilität der FUs RtH1-a und KLH2-c. Die geringeren Schmelzpunkte der letzteren begründeten sie mit der Abwesenheit von Kohlenhydraten, während die höhere Thermostabilität der RtH1-a aus zwei N-glykosidischen Zuckern hervorgehen soll. Diese Aussage widerspricht allerdings den Studien von Stoeva *et al.* (1999), die mit Hilfe des Lectins PNA einen O-glykosidischen Zucker der FU KLH2-c nachweisen konnten. Sequenzdaten der FU KLH1-h (unveröffentlicht) weisen ebenfalls auf drei potenzielle N-glykosidische Zuckerbindungsstellen (NLT, NLC und NYC) hin. Die Existenz zumindest eines Zuckers (NLT) konnte anhand der Röntgenstrukturdaten dieser Arbeit sowie Cryo-TEM-Daten bestätigt werden (unveröffentlichte Daten von [REDACTED]; Kap. C10, Abb. C32). Die FU RtH1-a besitzt mit zwei potenziellen N-glykosidischen Zuckerbindungsstellen und einem Kohlenhydratanteil von 4,19 % zudem eine geringere thermische

Stabilität als die FUs RtH1-h (Parvanova *et al.*, 2003; Idakieva *et al.*, 2005) und KLH1-h (Tab. D1), mit vergleichbarem, oder sogar niedrigerem Zuckeranteil. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Kohlenhydratanteil, zumindest beim Gastropoden-Hämocyanin, keinen bedeutenden Beitrag zur Thermostabilität leistet. Zusätzliche Vergleichsmessungen der nativen und deglykosylierten KLH-UE bestätigten dies, da für letztere in der DSC keine signifikant niedrigeren T_m -Werten bestimmt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch die von Doalshka-Angelova (2007) postulierte Beteiligung der Kohlenhydrate an der Organisation der RtH-UE und FUs konnte anhand von Sequenz- und Cryo-TEM-Daten ausgeschlossen werden (Gatsogiannis *et al.*, 2007).

3.2.3 Einfluss des Kupferzentrums

Die Ursache für die deutlich höheren T_m -Werte der Kragendomänen FU-h liegt vermutlich vielmehr in strukturellen Unterschieden zwischen den verschiedenen FUs begründet. So besitzt die FU-h eine C-terminale Zusatzdomäne von ~ 100 Aminosäuren, für die anhand der in dieser Arbeit ermittelten Röntgenstruktur ein Typ I-Kupferfaltungsmotiv nachgewiesen wurde (Kap. C10, Abb. C33). Bei bisher allen Studien wurde eine 3 – 16-fach niedrigere thermische Stabilität für die kupferlosen Apo-Formen der Hämocyanine beobachtet, so dass man von einem stabilitätsfördernden Effekt des binukleären Kupferzentrums ausgeht (Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 1998, 2001; Parvanova *et al.*, 2000, 2003; Schütz *et al.*, 2001, Spinozzi *et al.*, 2005). Auch wenn aufgrund der geringen Auflösung der FU KLH1-h (Kap. C10), bisher kein Cupredoxin-typisches Kupfer in der Zusatzdomäne gefunden wurde, so besteht doch die Möglichkeit, dass ein weiteres Metall-Ion einen zusätzlichen, stabilisierenden Effekt ausüben könnte und für die im Vergleich zu den anderen Domänen hohe thermische Stabilität der FU-h verantwortlich sein könnte.

3.2.4 Einfluss von Disulfidbrücken

Ein zusätzlicher und nicht unerheblicher Einfluss auf die thermische Stabilität von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen konnte auch für Disulfidbrücken nachgewiesen werden (Topham *et al.*, 1998, 1999, Georgieva *et al.*, 2004). Diese werden vorwiegend bei extrazellulären Proteinen wie Hämocyaninen gefunden und tragen dort zur Stabilität der geometrischen Struktur des binukleären Kupferzentrums und somit auch zur Erhaltung der physiologischen Sauerstofftransportfunktion bei (Gielens *et al.*, 2007). Studien am RtH mit reduzierten Disulfidbrücken offenbarten eine um bis zu 10 °C geringere, thermodynamische Stabilität und eine Abnahme der α -helikalen Strukturen um 20 % (Georgieva *et al.*, 2004). Mollusken-Hämocyanine besitzen mit insgesamt drei Disulfidbrücken je FU einen höheren Gehalt an Disulfidbrücken als Arthropoden-Hämocyanine (Volbeda & Hol, 1989; Hazes *et al.*, 1993; Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2003). Dies kann somit als Erklärung für die höhere Thermostabilität der Didekamere von KLH, RtH und HpH im Vergleich zu den einfachen Hexameren von PvH herangezogen werden (Tab. D2). Auch die im Vergleich zum 1 x 6-meren PvH (Guzmán-Casado *et al.*, 1990) extrem hohen T_m -Werte des 4 x 6-meren EchH

(Sternier *et al.*, 1995) und des 8 x 6-meren LpH (Georgieva *et al.*, 1998) resultieren somit vermutlich aus dem höheren Oligomerisierungsgrad, mit entsprechend mehr Disulfidbrücken.

3.2.5 Einfluss bivalenter Kationen

Studien zum Einfluss bivalenter Kationen konnten für Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine auch einen stabilitätsfördernden Effekt von Ca^{2+} und Mg^{2+} aufzeigen, die bei physiologischem pH-Wert eine Reassoziaton von UE zu den entsprechend höher oligomerisierten Quartärstrukturen bedingen (Brenowitz *et al.*, 1984; Sternier *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997a, b, 1998; Dolashka-Angelova *et al.*, 2003; Georgieva *et al.*, 2004). Eine Reduktion der Disulfidbrücken durch entsprechende Detergenzien konnte durch diese Kationen ebenfalls verhindert werden. Auch bei den KLH1-Didekameran ergab sich ein stabilisierender Einfluss von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Im TEM stellte sich dies durch den Erhalt der Quartärstruktur nach Erhitzung bis 70 °C dar (Kap. C14.3, Abb. C72), während die oligomeren Moleküle ohne zweiwertige Kationen bereits bei Temperaturen von 60 °C zerfallen waren (Kap. C14.3, Abb. C72). Möglicherweise besetzen die bivalenten Kationen (allosterische) Bindungsstellen und stabilisieren über Van der Waals-Bindungen die Lage der Aminosäuren zueinander. Da die DCS-Messungen der KLH-UE und des Fragments KLH1-abc jedoch auch in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} eine mit höher oligomerisierten Strukturen vergleichbare Thermostabilität zeigten, kann der Widerspruch bezüglich der Abhängigkeit der Stabilität vom Oligomerisierungszustand nicht durch die Anwesenheit von bivalenten Kationen erklärt werden. Lediglich eine salzbedingte Präzipitation der Proben in Verbindung mit einem starken Abfall der Hitzekapazität blieb ohne die Zugabe der entsprechenden Salze aus (Kap. C.14.1, Abb. C68). Da alle Messungen zudem unter Verwendung von 20 mM MOPS, pH 7,2 stattfanden, kann auch ein stabilitätsfördernder Effekt unterschiedlicher Puffersubstanzen, wie er beispielsweise für EchH anhand des allosterischen Effektors Tris nachgewiesen wurde (Sternier *et al.*, 1994), ausgeschlossen werden.

Die detaillierten Gründe für eine vergleichbar hohe thermische Stabilität der verschiedenen Oligomerisierungsformen des KLH sind nicht bekannt. Theoretisch sollten höher oligomerisierte Moleküle aufgrund der ebenfalls höheren Anzahl an Disulfidbrücken auch in entsprechend höheren Schmelzpunkten in der DSC resultieren. Für die Arthropoden-Hämocyanine konnte dies bereits gezeigt werden (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sternier *et al.*, 1995). Eine Interpretation der Daten, die ausschließlich auf DSC-Messungen basieren, ist jedoch schwierig. Nichtsdestotrotz kann man davon ausgehen, dass eine Oligomerisierung in einer zunehmenden Stabilität der einzelnen Polypeptidketten resultiert, was wiederum einen stabilisierenden Effekt auf das Gesamtmolekül und deren strukturelle UE ausübt. Dieser Einfluss scheint jedoch, speziell beim KLH, nicht ganz so ausgeprägt zu sein, wie es beim Arthropoden-Hämocyanin der Fall ist. Eventuell werden die kleineren Moleküle zusätzlich durch eine große Anzahl nichtkovalenter Bindungen stabilisiert.

3.3 Untersuchungen zur thermischen Stabilität des KLH mittels spektroskopischer Methoden

Neben den DSC-Studien zur thermischen Stabilität der verschiedenen Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine wurden häufig auch spektroskopische Messmethoden eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen Oligomerisierungsgrad und Thermostabilität nachzuweisen (Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Dolaska-Angelova *et al.*, 1999, 2000; Georgieva *et al.*, 1998, 2001; Parvanova *et al.*, 2000, 2003; Idakieva *et al.*, 2006).

Auch am KLH erfolgten diesbezüglich bereits einige Untersuchungen (Dolashki *et al.*, 2005; Schütz, 2000; Schütz *et al.*, 2001), die im Rahmen dieser Arbeit an Didekameren, UE und einzelnen FUs weitergeführt bzw. wiederholt wurden.

3.3.1 Thermische Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die thermische Stabilität der Sekundärstrukturelemente der KLH1-Didekamere und KLH1-UE mittels CD-spektroskopischer Messungen von 200 – 250 nm nach Erhitzung auf Temperaturen bis zu 90 °C analysiert. In diesem Wellenlängenbereich kann die Konformation des Polypeptidrückgrats anhand von Änderungen der Elliptizität bestimmt werden. Die Proben waren hierbei stets in MOPS-Puffer pH 7,2 gelöst, um einen möglichen allosterischen Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auszuschließen. Zur Aufrechterhaltung der Quartärstruktur der Didekamere beinhalteten diese Proben, im Gegensatz zu den UE, stets NaCl, MgCl₂ und CaCl₂, so dass ein etwaiger stabilisierender Effekt der Ionen ebenfalls untersucht werden konnte.

Die CD-Spektren der getesteten KLH-Proteine zeigten bei Raumtemperatur Minima der negativen Elliptizität bei 208 nm und 221 nm, was sich auf α -helikale Strukturen zurückführen lässt (Kap. C14.5, Abb. C73). Eine Dissoziation der nativen Molekülaggregate in UE hatte keinen Einfluss auf den Anteil der Sekundärstrukturelemente (Boteva *et al.*, 1991). Vergleichbare Spektren wurden für das KLH bereits von Schütz (2001) und Dolashki (2005) aufgenommen. Auch eine Erhitzung auf 70 °C bei den KLH1-Didekameren, bzw. 90 °C bei den KLH1-UE, resultierte in keiner signifikanten Änderung der Spektren oder in einer Abnahme der Elliptizität in diesem Wellenlängenbereich. Dies spricht für eine nach wie vor intakte Sekundärstruktur der Proteine bei hohen Temperaturen und steht im Einklang mit der vergleichbar hohen Thermostabilität der Didekamere und UE in der DSC (Kap. C14.1, Abb. C68). Im Gegensatz dazu konnte bei zahlreichen anderen Hämocyaninen ein Einfluss der Temperatur auf den Anteil der Sekundärstrukturelemente nachgewiesen werden. So ergab sich bei den Apo-Hämocyaninen von *R. thomasi* und *M. squinado* bereits eine deutliche Abnahme der negativen Elliptizität ab Temperaturen von 35 ° bzw. 50 °C (Dolashka *et al.*, 1996; Georgieva *et al.*, 1998, 2004). Zudem wurde, u.a. auch für KLH, eine höhere Thermostabilität bei höher oligomerisierten Molekülen gemessen (Dolashka-Angelova *et al.*, 1999, 2000; Schütz, 2000; Schütz *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine solche Abhängigkeit der thermischen Stabilität vom Oligomerisierungsgrad der KLH-Proteine jedoch nicht bestätigt werden.

Bei Raumtemperatur wurden bei den Apo-Formen verschiedener Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine stets vergleichbare CD-Spektren aufgenommen, wie bei nativen, oxygenierten Molekülen (Hristova *et al.*, 1997, Dolashka-Angelova *et al.*, 2000; Georgieva *et al.*, 2004). Dies suggeriert eine ähnliche Faltung und Konformation der Polypeptidkette beider Formen. Nach Erhitzung wurde jedoch eine deutlich geringere Thermostabilität der kupferlosen Hämocyanine festgestellt, was sich als Abnahme der negativen Elliptizität darstellte. Trotz der nahezu unveränderten CD-Spektren des KLH, kann ein temperaturinduzierter Verlust der binukleären Kupfer-Ionen dennoch nicht ausgeschlossen werden. Eine geringere thermische Stabilität der kupferlosen Hämocyanine sollte vielmehr aus Konformationsänderung der Tertiärstrukturen resultieren und sich entsprechend mittels DSC- und Fluoreszenz-Messungen nachweisen lassen (Kap. D3.2 und D3.3.2). Letztere wurden von Schütz *et al.* (2001) am KLH durchgeführt und bestätigten die strukturellen Umordnungen auf Tertiärstrukturebene nach Entfernung des binukleären Kupferzentrums. Ein CD-spektroskopischer Nachweis des temperaturinduzierten Kupferverlustes könnte für Mollusken-Hämocyanine auch dadurch erschwert werden, dass die Sekundärstrukturen (des aktiven Zentrums) aufgrund der generell höheren Anzahl an Disulfidbrücken besser stabilisiert werden, als es bei Arthropoden der Fall ist.

Ein stabilitätsfördernder Effekt der bivalenten Kationen konnte ebenfalls anhand von CD-Spektren belegt werden (Georgieva *et al.*, 2004), da diese eine Stabilisierung der Disulfidbrücken und somit auch der Konformation der Sekundär- und Tertiärstrukturen bedingen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für die Didekamere des KLH nachgewiesen, die zur Aufrechterhaltung der Quartärstruktur physiologische Mengen an Ca^{2+} und Mg^{2+} beinhalten. Bei den KLH-UE ohne Salze ergaben sich bei höheren Temperaturen etwas flachere Spektren mit einer geringfügigen Abnahme der negativen Elliptizität (Kap. C14.5, Abb C73). Da ein übermäßiger Einfluss des Oligomerisierungsgrades bereits mittels DSC-Messungen ausgeschlossen werden konnte (Kap. D3.2), wäre eine frühere Denaturierung der UE in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} denkbar. Auch die Verschiebung der Spektren in Richtung größerer Wellenlängen könnte hierdurch erklärt werden, als Resultat einer ebenfalls zunehmenden Aggregation denaturierter Proteine (Kap. C14.5, Abb. C73 b). Ein Einfluss der zusätzlich in den Didekamer-Proben anwesenden Chlorid-Ionen ist ebenfalls nicht auszuschließen. Studien am strukturell verwandten R_tH konnten beispielsweise zeigen, dass diese als allosterischer Effektor wirken (Hazes *et al.*, 1993, Georgieva *et al.*, 2005).

3.3.2 Thermische Stabilität der Tertiärstrukturelemente des KLH

Um die Daten der DSC-Messungen zu ergänzen, erfolgten mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie zusätzliche Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Tertiärstrukturelemente der KLH1-Didekamere, -UE sowie der FU KLH1-h, nach Erhitzung auf Temperaturen bis zu 85 °C. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, da hier sowohl die Phenol- als auch Indolgruppen der Tryptophan- (Trp) und Tyrosinreste (Tyr) absorbieren. Die Proteine waren stets in MOPS-Puffer pH 7,2 gelöst, um einen möglichen allosterischen Einfluss

verschiedener Puffersubstanzen auszuschließen. Die Proben der KLH1-Didekamere enthielten zusätzlich NaCl, MgCl₂ und CaCl₂, um den bereits nachgewiesenen stabilisierenden Effekt (Kap. D3.3 und D3.3.1) der Ionen eventuell auch anhand der Fluoreszenzspektren ablesen zu können. Während die CD-Spektroskopie konformationelle Änderungen der Sekundärstrukturen aufzeigen kann, ist die Fluoreszenzspektroskopie auch zum Nachweis der Entfaltung von Tertiärstrukturen geeignet. Beim KLH ergaben sich, nach Anregung der unterschiedlich oligomerisierten, nativen Proteine bei 280 nm, Fluoreszenzmaxima (λ_{\max}) zwischen 327 – 330 nm. Vergleichbare λ_{\max} -Werte konnten für Apo- und Oxy-Formen bereits bei früheren Studien am KLH (Schütz, 2000; Schütz *et al.*, 2001; Dolashki *et al.*, 2005) sowie bei anderen Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen bestimmt werden (Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 1999, 2000; Parvanova *et al.*, 2000, 2003; Idakieva *et al.*, 2006). Die ermittelten Fluoreszenzmaxima des KLH deuten auf verborgene und innere Tryptophanseitenketten in einer unpolaren, hydrophoben Umgebung hin (Teale, 1960; Permyakov *et al.*, 1982). Diese Vermutung konnte auch anhand von Sequenz- und Röntgenstrukturdaten belegt werden (Cuff *et al.*, 1998; Perbandt *et al.*, 2003, Parvanova *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima der verschiedenen Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine liegen in der Anzahl und lokalen Umgebung der emittierenden Fluorophore begründet (Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1966; Boteva *et al.*, 1991; Dolashki *et al.*, 2005). Die Abwesenheit der Tyr-Emission nach Anregung bei 280 nm, wo sowohl Phenol- als auch Indolgruppen absorbieren, kann anhand der verfügbaren Röntgenstrukturdaten (Volbeda *et al.*, 1989; Hazes *et al.*, 1993; Cuff *et al.*, 1993; Perbandt *et al.*, 2003), mit Försters Theorie (Stryer, 1978) des strahlungslosen Energieübergangs vom Phenol (Donor) zur Indolgruppe (Akzeptor) erklärt werden.

Bei allen getesteten KLH-Proteinen konnte erst ab Temperaturen von ~ 70 °C ein Anstieg der Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden. Unterhalb dieser Temperaturen quencht der paramagnetische Ionen-Effekt des oxygenierten, binukleären Kupferzentrums die Emission der Trp des aktiven Zentrums bei 340 nm über **Förster-Transfer** (Ricchelli *et al.* 1987). Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffsättigung des Hämocyanins, führen höhere Temperaturen zu einem Verlust des Sauerstoffs am aktiven Zentrum, was einen Anstieg der Fluoreszenzintensität der angeregten Trp bedingt. Der erneute Quenching-Effekt oberhalb von 80 °C (Daten nicht gezeigt), liegt in der thermischen Aktivierung und der daraus folgenden Kollision der angeregten Indolgruppen mit benachbarten Gruppen begründet.

Die temperaturabhängige Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima der KLH-Proteine resultiert aus einer zunehmenden Exposition der Trp-Reste zum wässrigen Medium. Da die λ_{\max} -Werte jedoch selbst bei 80 °C noch deutlich unterhalb von 342 nm lagen (Kap. C14.7, Abb. C76), spricht für die außerordentliche Thermostabilität des Mollusken-Hämocyanins, da erst bei λ_{\max} -Werten oberhalb von 342 nm von einer vollständigen Denaturierung der Moleküle ausgegangen werden kann. Die Polypeptidketten des KLH waren unter diesen Bedingungen somit vermutlich noch nicht vollständig entfaltet. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bei zahlreichen anderen Hämocyaninen gemacht, wobei in Anwesenheit

physiologischer Konzentrationen an Ca^{2+} eine besonders hohe Thermostabilität nachgewiesen wurde (Hristova *et al.*, 1997, Nillius, 2007). Beim KLH schien sich der stabilisierende Effekt bivalenter Kationen ebenfalls zu bestätigen, da die relativen Fluoreszenzintensitäten der KLH-UE ohne Salze bereits ab 55 °C anstiegen und das Fluoreszenzmaxima von 337 nm bei 80 °C die größte Rotverschiebung anzeigten. Bei den KLH1-Didekamern und der FU-h blieben die relativen Fluoreszenzintensitäten hingegen bis ~ 60 °C bzw. 70 °C konstant. Auffällig waren die λ_{max} -Werte der FU-h bei diesen Temperaturen, da diese mit 330 nm unterhalb derer der Didekamere und UE lagen. Auch eine Erhitzung auf 80 °C deutete bei einem Fluoreszenzmaximum von 335 nm noch nicht auf eine vollständige Entfaltung des Proteins hin. Im Gegensatz dazu konnten Parvanova *et al.* (2003) bei der FU-h von *R. thomasi*, einen λ_{max} von 345 nm bei höheren Temperaturen nachweisen, was auf exponierte Trp-Reste schließen lässt. Die Daten der FU KLH1-h bestätigten somit erneut, die bereits mittels DSC-Studien nachgewiesene extreme, thermische Stabilität der Kragendomäne und widerlegen die These, dass ein höherer Oligomerisierungsgrad in einer deutlich höheren thermischen Stabilität resultieren muss.

Um den Quenching-Effekt des oxygenierten Kupferzentrums zu vermeiden, erfolgten die Studien an anderen Hämocyaninen häufig anhand der kupferlosen Apo-Formen. Diese zeigten im Vergleich zum Oxy-Hämocyanin, ein 3,8 – 7,9-fache Zunahme der Fluoreszenzintensitäten sowie eine Rotverschiebung der Maxima (Hristova *et al.*, 1997; Schütz *et al.*, 2001; Parvanova *et al.*, 2003; Dolashki *et al.*, 2005; Idakieva *et al.*, 2006). Daher kann von einer geringfügig anderen Konformation der kupferfreien Hämocyanine ausgegangen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen, wäre beim KLH auch ein temperaturinduzierter Kupferverlust, der mit einer Deoxygenierung einhergeht, denkbar. Dass dies jedoch in keiner vollständigen Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturelemente resultiert, ergibt sich aus den CD-spektroskopischen Daten (Kap. D3.3.1) sowie der Tatsache, dass die Fluoreszenzintensitäten selbst bei 80 – 90 °C noch unterhalb der kritischen 342 nm-Grenze blieben.

3.3.3 Oxygenierungszustand des aktiven Zentrums des KLH bei hohen Temperaturen

Die bereits im Rahmen dieser Arbeit mittels DSC-, CD- und Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesene thermische Stabilität der Sekundär- und Tertiärstrukturen des KLH, die zur Ausübung der biologischen Funktion als Sauerstofftransportprotein essenziell ist, konnte auch anhand von Absorptionsspektren bestätigt werden. Eine thermische Entfaltung der KLH-Proteine, die sich durch eine signifikante Änderung des Absorptionsmaximums bei 278 nm darstellen sollte, konnte bei keinem der Spektren nachgewiesen werden. Das bei den KLH1-Didekamern und der FU KLH1-h nach wie vor vorhandene Maximum bei 345 nm, deutete zudem auf eine nach wie vor vorhandene Oxygenierung des aktiven Zentrums nach Erhitzung auf 70 °C hin (Kap. C14.6, Abb C74 a, b). Im Gegensatz dazu konnte bei der FU KLH2-c bereits ab 40 °C eine beginnende Sauerstoffabgabe beobachtet werden, die ab 65 °C schließlich in einer vollständigen Deoxygenierung dieser FU resultierte (Kap. C14.6, Abb. C74 c). Dieser Prozess war reversibel, da nach Abkühlung ein erneuter Anstieg des für

oxygenierte Hämocyanine typischen Absorptionsmaximums beobachtet werden konnte. Die Messungen bestätigten somit erneut die hohe Thermostabilität der FU KLH1-h. Studien am β -Hemocyanin von *Helix pomatia* zeigten keine nahezu vollständige Oxygenierung bei hohen Temperaturen, allerdings war der Verlust des Sauerstoffs auch hier reversibel (Idakieva *et al.*, 2006). Die verschiedenen Ergebnisse liegen vermutlich in strukturellen Unterschieden der beiden Hämocyanine begründet. Im Gegensatz zum KLH besteht HpH aus drei Komponenten (2x α -Kette, 1x β -Kette), wobei sich die UE aus verschiedenen UE-Typen zusammensetzt (Lontie, 1983; Préaux & Gielens, 1984). Auch eine höhere Stabilität des oxygenierten HpH sowie eine schnellere Dissoziation des Deoxy-Hemocyanins in Abwesenheit von Ca^{2+} konnte belegt werden (Brouwer *et al.*, 1981). Die Reversibilität der Deoxygenierung der FU KLH2-c widerlegt allerdings die Vermutung, dass der Sauerstoffverlust auch das Resultat eines Kupferverlustes sein kann. Studien am HpH konnten, nach Erhitzung auf Temperaturen von 75 °C, zudem kein freies Kupfer in der Lösung nachweisen (Idakieva *et al.*, 2006). Bei der FU KLH2-c kann man daher davon ausgehen, dass es bei geringeren Temperaturen zunächst zu einer Deoxygenierung kommt, und erst bei Temperaturen über 70 °C kommt es zu einer zunehmenden Zerstörung der Tertiärstrukturelemente (Kap. D3.2, Tab. D1). Bei den KLH-Didekameren sowie der FU-h besteht jedoch nach wie vor die Möglichkeit einer Sauerstoffabgabe als Folge eines Kupferverlustes. Basierend auf den DSC-, CD- und Fluoreszenzdaten, sollte dieser allerdings erst bei höheren Temperaturen stattfinden (Kap. D3.2, D3.3.1 und D3.3.2).

Die in Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse offenbaren einige Widersprüche bezüglich der Thermostabilität des KLH. So wurden in der DSC bei bestimmten Temperaturen thermische Übergänge detektiert, die auf eine beginnende Denaturierung/Entfaltung des Hämocyanins hinweisen, obwohl spektroskopische Messungen bei gleichen Temperaturen noch keine Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturelemente anzeigten. Dies erweckt den Eindruck, dass eine thermische Denaturierung/Entfaltung der verschiedenen KLH-Moleküle erst stattfindet, nachdem die kritische Schmelztemperatur (T_m) überschritten wurde. Die Ursachen hierfür liegen vermutlich im Aufbau der DSC begründet. Da die kalorimetrischen Messungen in einem geschlossenen System stattfinden, nimmt der Druck mit steigender Temperatur zu und kann das Reaktionsgleichgewicht entsprechend verschieben. Bei der Auswertung der fluoreszenzspektroskopischen Daten muss zudem berücksichtigt werden, dass eine optimale Temperierung der Proben aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzintensität essenziell ist. Dies war bei einer Erhitzung der Proben im Wasserbad jedoch nicht immer gewährleistet. Zudem kam es bei dieser Methode häufig zu Konzentrationserhöhungen der Proben aufgrund von Verdunstungsverlusten. Dies bedingte einen weiteren Anstieg der Fluoreszenzintensitäten, die daher häufig normiert werden mussten, um die Messergebnisse zu interpretieren.

3.4 Medizinische und biologische Bedeutung der (thermischen) Stabilität des KLH

Die chemische und thermische konformationelle Stabilität der Hämocyanine ist von fundamentalem Interesse und trägt zum Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen der Sauerstoff-Transportproteine bei. Insbesondere beim KLH erfolgten diesbezüglich erst wenige Studien, obwohl dieses seit vielen Jahren in der Klinik als Immunstimulator, Hapten-Carrier und zur Behandlung von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen eingesetzt wird (Kap. A11). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die thermische Stabilität des KLH untersucht, obwohl dieser bezüglich des klinischen Einsatzes vermutlich eher eine geringere Bedeutung zukommt. Allerdings erfolgten an verschiedener Hämocyaninen bereits auch einige Studien zur chemischen Konformationsstabilität mit vergleichbaren Ergebnissen (Dolashka *et al.*, 1996; Hristova *et al.*, 1997; Hübler *et al.*, 1998; Dolashka-Angelova *et al.*, 2000, 2005; Schütz *et al.*, 2001). Einflüsse der gewählten Puffersubstanz, die z.B. im Falle von Tris als stabilisierender allosterischer Effektor wirken kann (Sternner *et al.*, 1994), müssen bei Studien an Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen ebenso berücksichtigt werden, wie Detergenzien, die eine Reduktion der Disulfidbrücken und somit eine Destabilisierung des aktiven Zentrums bedingen (Topham *et al.*, 1998, 1999, Georgieva *et al.*, 2004). Ein daraus folgender Verlust des binukleären Kupfers, resultiert in einer deutlich geringeren Konformationsstabilität der Moleküle (Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 1998, 2001; Parvanova *et al.*, 2000, 2003; Schütz *et al.*, 2001, Spinozzi *et al.*, 2005). Ein zusätzlich stabilisierenden Effekt kann durch Zugabe bivalenter Kationen erzielt werden, die zudem eine Reassoziierung zu höher oligomerisierten und konformationsstabileren Molekülaggregaten bewirken können (Brenowitz *et al.*, 1984; Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Sternner *et al.*, 1995; Hristova *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1997a, b, 1998; Georgieva *et al.*, 1998, 2004).

Die außergewöhnliche Konformationsstabilität der Hämocyanine kann das Ergebnis der phylogenetischen Anpassung an extreme Umweltbedingungen sein. Hocholigomere Moleküle zeigen als Folge der Untereinheiten-Untereinheiten-Interaktion entsprechend höhere thermische und chemische Stabilität sowie verbesserte kooperative Sauerstoffbindungseigenschaften (Decker *et al.*, 1988; Leidescher & Decker, 1990; De Haas & Van Bruggen, 1994; Sternner *et al.*, 1995; Hartmann & Decker, 2002). So konnte beim Arthropoden-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* eine außerordentliche thermische Konformationsstabilität und eine zudem volle Funktionstüchtigkeit bei Temperaturen von bis zu 90 °C nachgewiesen werden (Sternner *et al.*, 1995). Dies kann somit als Anpassung der poikilothermen, wüstenbewohnenden Tiere an die hohen Temperaturunterschiede zwischen Tag und Nacht (> 70 °C) gedeutet werden. Allerdings zeigen die Arthropoden-Hämocyanine von *P. vulagris*, *H. americanus*, *L. polyphemus* und *P. imperator* (Guzmán-Casado *et al.*, 1990; Hristova *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 1998; Nillius, 2007), ebenso wie die Mollusken-Hämocyanine von *Helix pomatia*, *Haliotis tuberculata*, *Rapana thomasi* und *Megathura crenulata* (Georgieva *et al.*, 1998; Schütz *et al.*, 2001; Idakieva *et al.*, 2006), eine vergleichbar hohe Thermostabilität, obwohl diese Tiere keinen solch extremen Umweltbedingungen ausgesetzt

sind. *Megathura crenulata* bewohnt z.B. die untere Gezeitenzone und das obere Sublitoral des pazifischen Ozeans, mit überwiegend konstanten Wassertemperaturen. Die hohe thermische Stabilität und die teilweise noch bei hohen Temperaturen nachweisbare Oxygenierung des aktiven Zentrums der KLH-Proteine (Kap. D3.3.3), sollte daher eher in strukturellen Ursachen begründet liegen, als in einer physiologischen Anpassung an extreme Umweltbedingungen. Beim Gastropoden-Hämocyanin und speziell beim KLH, könnte auch die außerordentliche Konformationsstabilität der kragenbildenden FU-h zur Gesamtstabilität des Moleküls beitragen, da diese eine zusätzlich stabilisierende β -Sandwich-Domäne mit einem Typ I-Kupferzentrum trägt. Bei den übrigen Hämocyaninen lässt sich die hohe Thermostabilität vermutlich auf die oligomere Proteinstruktur oder erhöhte Konzentrationen an bivalenten Kationen zurückführen, die Bestandteil der Hämolymphe sind. Biotope mit hohen Temperaturen sind daher nicht notwendigerweise der Grund der extremen Thermostabilität, können diese aber notwendig machen.

Ausblick:

Im Hinblick auf weitere Studien zur thermischen Stabilität verschiedener Oligomerisierungsformen des KLH wären DSC-Messungen und spektroskopische Untersuchungen weiterer einzelner FUs von Vorteil, um die verschiedenen thermischen Übergänge der höher oligomerisierten UE und Didekamere genauer zu analysieren. Hierbei ist eine Isolierung der FUs in großer Menge und Reinheit unabdingbar, was aufgrund der zahlreichen Aufreinigungsschritte allerdings auch entsprechend schwierig und zeitaufwendig ist.

Die Frage, ob die temperaturabhängige Deoxygenierung das Resultat eines Kupferverlustes ist, könnte durch einen Nachweis von freiem Kupfer in der Lösung geklärt werden. Sauerstoffbindungskurven der verschiedenen KLH-Proteine könnten diese Untersuchungen vervollständigen.

Der Quenching-Effekt des oxygenierten Kupferzentrums, der eine eindeutige Auswertung der Fluoreszenz- und CD-spektroskopischen Daten schwierig macht (Schmelzpunktbestimmung), ließe sich durch Messungen an den kupferfreien Apo-Formen umgehen, wie sie bereits an zahlreichen anderen Hämocyaninen erfolgten. Auch die Methode der Temperierung der Proben war sicherlich nicht optimal gewährleistet und könnte verbessert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zum Einfluss von Effektoren sollten vor allem im Hinblick auf die medizinische Anwendung des KLH, durch die Wahl weiterer Puffersubstanzen und verschiedener mono- und bivalenter Ionen ergänzt werden.

Um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Stabilität des KLH weiter zu vertiefen, wäre es des Weiteren hilfreich, neben der thermischen, auch die chemische Denaturierung der Proteine (Harnstoff, Gdn-HCl etc.) zu untersuchen.

E Zusammenfassung

Hämocyanine sind große, kupferhaltige Sauerstoff-Transportproteine, die bei zahlreichen Schnecken extrazellulär in der Hämolymphe vorkommen. Das *Keyhole Limpet*-Hämocyanin (KLH) der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* dient aufgrund seiner immunstimulatorischen Eigenschaften seit vielen Jahren als Modellprotein in der Immunologie. In der Klinik wird es als Hapten- und Vazincarrier sowie als Medikament gegen oberflächliche Harnblasenkarnzinome eingesetzt. Die Quartärstruktur des KLH besteht aus einem Hohlzylinder mit einer Molekülmasse von 8 MDa und einem Durchmesser von 35 nm. Dieses sogenannte Didekamer setzt sich aus 20 Untereinheiten mit jeweils 400 kDa zusammen. Jede Untereinheit lässt sich weiter in acht funktionelle Einheiten a bis h (engl. *Functional Units* = FU) mit ~ 50 kDa unterteilen. Die FUs a bis f bilden die Wandregion des Moleküls, während der Kragen aus den FUs g und h geformt wird. Die Struktur der Wandregion sowie der FU-g konnte bisher bereits durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt werden. Bezüglich der Struktur der FU-h, die sich durch eine spezielle C-terminale Verlängerung von ~ 100 Aminosäuren auszeichnet, sind allerdings noch keine Informationen verfügbar. Um die Architektur des Kragens zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Strategien entwickelt, diese spezielle FU in großer Menge und Reinheit zu isolieren. Anschließend konnten Bedingungen gefunden werden, die zur Ausbildung 0,2 µm großer, hexagonaler Kristalle führten. Diese ergaben am Synchrotron eine Auflösung von 4 Å. Durch Auswertung der Röntgenstrukturdaten konnte für die C-terminale Zusatzdomäne der FU-h eine Cupredoxin-ähnliche Typ I-Kupferfaltung ermittelt werden. Der Nachweis eines zusätzlichen Kupferatoms innerhalb dieser Domäne bedarf allerdings einer höheren Auflösung der Kristallstruktur. Hämocyanine lassen sich aufgrund ihrer evolutionären Verwandtschaft zu Phenoloxidasen mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Aktivatoren zur Catecholoxidase und teilweise auch zur Tyrosinase aktivieren. Beim KLH konnte in dieser Arbeit eine eindeutige Diphenolase- und sogar eine schwache Monophenolase-Aktivität der FUs-a und -f nach SDS-Aktivierung nachgewiesen werden. Zudem konnte eine geringfügige intrinsische Diphenolase-Aktivität dieser FUs belegt werden. Die enzymatischen Reaktionen waren sowohl von der gewählten Puffersubstanz, als auch der Anwesenheit bivalenter Kationen abhängig. Tris wirkt vermutlich als allosterischer Effektor und steigerte den Substrat-Umsatz, während Mg²⁺-Ionen zu einer starken Inhibition der katalytischen Aktivität führten. Die Klärung einer möglichen physiologischen Funktion der Phenoloxidase-Aktivität des KLH sowie potenziellen *in vivo*-Aktivatoren steht noch aus. Studien zur thermischen Stabilität des KLH resultierten in einer irreversiblen Denaturierung des Proteins. Die Schmelzpunkte deuteten auf eine hohe Temperaturstabilität des KLH, vor allem in Anwesenheit bivalenter Kationen. Eine Hämocyanintypische Abhängigkeit der Hitzeresistenz vom Oligomerisierungsgrad ließ sich nicht feststellen, da sowohl bei der FU-h als auch den KLH-Didekameran eine vergleichbar hohe thermische Stabilität, bei einer nach wie vor vorhandenen Oxygenierung beobachtet wurde.

F Summary

Hemocyanins are large copper containing oxygen carriers in the hemolymph of most gastropods. Due to its immune stimulatory potency, keyhole limpet hemocyanin (KLH) of *Megathura crenulata* is utilized in immunology since many years. It is further used in clinics as hapten and vaccine carrier and for the treatment of superficial bladder carcinoma. The quaternary structure of KLH is a hollow cylinder with 35 nm in diameter and a molecular mass of 8 MDa. This so called didecamer is composed of 20 subunits of about 400 kDa each. The subunits can be further subdivided into eight functional units (FU) of about 50 kDa, named FU-a to FU-h. The wall region of the molecule is built by the FUs a to f and the collar by FU g and h. Both, the wall structure and the collar FU-g are well known by X-ray analysis, but up to now there is no information available on the structure of FU-h. This FU is special because it contains a c-terminal extension of about 100 aminoacids. In order to understand the collar architecture, different strategies have been established in this work to purify high and pure quantities of this FU. Subsequent crystallization experiments lead to the formation of hexagonal crystals with a diameter of 0.2 mm. Using synchrotron, diffraction patterns of these crystals indicate a resolution of 4 Å. X-ray analyses revealed a cupredoxin-like type I copperfold of the c-terminal extension of FU-h. The presence of an additional copper atom still has to be verified and requires atomic resolution. Because of their evolutionary relationship to phenoloxidases it is possible to induce a catecholoxidase and even tyrosinase activity of hemocyanins *in vitro* by different activators. In this work it was possible to elicit an obvious diphenolase and even a weak monophenolase activity of FU a and f of KLH after SDS application. Furthermore a weak intrinsic diphenolase activity was detectable. It became evident that the intensity of the enzymatic reaction depends on both, the kind of buffer and the presence of divalent cations. Tris presumably acts as an allosteric effector which increased the substrate turnover rate, while Mg^{2+} strongly inhibited catalytic activity. To clarify a possible physiological role of the phenoloxidase activity of KLH unequivocally and to determine potential *in vivo* activators, further analyses hast to be done. Studies concerning thermostability of KLH lead to a strictly irreversible denaturation of the protein. Melting points indicated a high thermostability of KLH, especially in the presence of divalent cations. There was no dependence of heat resistance with the state of oligomerisation detectable, as it is the case for other hemocyanins. FU-h showed a thermodynamic stability comparable to the high molecular KLH-didecamers. Besides, both proteins were still fully oxygenated at higher temperatures.

G Anhang

1 Verzeichnisse

1.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AS	Aminosäure
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AEC	Engl. = Anion Exchange Chromatography = Anionenaustausch-Chromatographie
AM	Ausgangsmaterial
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua (bi)dest.</i>	(bi)destilliertes Wasser
BPB	Bromphenolblau
c	Konzentration
ca.	Cirka
cal	Kalorien
Catechol	1,2-Dihydroxybenzol
CD	Engl. = Circular Dichroism = Zirkulardichroismus
CO	Catecholoxidase
CuA, CuB	Typ III-Kupferzentren der Hämocyanine, Tyrosinasen und Catecholoxidasen
Cp	Wärmekapazität
d	Weglänge
Da	Dalton
DD	Didekamer
DEAE	Diethylaminoethyl
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DOPachinon	4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon
DOPachrom	2-Carboxy-2,3-Dihydroxyindolen-5,6-Chinon
Dopamin	3,4-Dihydroxyphenethylamin
DSC	Engl. = Difference Scanning Calorimetry = Differenz Scanning Kalorimetrie
ε	Elliptizität
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Engl.	englisch
FU	Functional unit
g	Gravitationskraft/Erdbeschleunigung
G°	Freie Standardreaktionsenthalpie
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
H°	Standardreaktionsenthalpie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
IE	Immunelektrophorese
Ig	Immunglobulin, Antikörper
K	Gleichgewichtskonstante
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton, 10 ³ Dalton
kJ	Kilojoule, 10 ³ Joule
KLH-S	Frisch gezapftes Hämocyanin aus der Schnecke <i>Megathura crenulata</i>
λ	Wellenlänge

L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Leuko-DOPAchrom	2,3-Dihydro-5,6-Dihydroindolen-2-Carboxylat
M	Proteinmarker
max.	maximal
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
MD	Multidekamere
Min.	Minuten
MIR	Engl. = Multiple Isomorphous Replacement
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
MR	Engl. = Molecular Replacement = Molekularer Ersatz
MW	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
ORD	Optische Rotationsdispersion
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>p</i> -cresol	4-Methylphenol
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
PNA	Peanut Agglutinin
PO	Phenoloxidase
Q	Quartäres Ammonium
R	Gaskonstante = 8,314 J/K/Mol
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RMS	Engl. = Root Mean Square = mittlere quadratische Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
S	Entropie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	Engl. = Size Exclusion Chromatography = Größenausschluss-Chromatographie
Sek.	Sekunden
SIR	Engl. = Single Isomorphous Replacement
Std.	Stunden
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
T _m	Halbumwandlungstemperatur/Schmelzpunkt
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRP1	Tyrosinase related protein 1, DHICA-Oxidase
TRP2	Tyrosinase related protein 2, DOPAchrom-Tautomerase
TY	Tyrosinase
Tyramin	4-Hydroxyphenethylamin
UE	Untereinheit
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume)

1.2 Abkürzungen der Hämocyane

EcH	<i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanin
HpH	<i>Helix pomatia</i> Hämocyanin
HtH	<i>Haliotis tuberculata</i> Hämocyanin
KLH	<i>Megathura crenulata</i> Hämocyanin
LpH	<i>Limulus polyphemus</i> Hämocyanin
NpH	<i>Nautilus pompilius</i> Hämocyanin
OdH	<i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin
PvH	<i>Palinurus vulgaris</i> Hämocyanin
RtH	<i>Rapana thomasi</i> Hämocyanin
SoH	<i>Sepia officinalis</i> Hämocyanin

1.3 Abkürzungscode und Molekulargewichte* der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	71,1 Da	M	Met	Methionin	131,2 Da
C	Cys	Cystein	103,1 Da	N	Asn	Asparagin	114,1 Da
D	Asp	Aspartat	115,1 Da	P	Pro	Prolin	97,1 Da
E	Glu	Glutamat	129,1 Da	Q	Gln	Glutamin	128,1 Da
F	Phe	Phenylalanin	147,2 Da	R	Arg	Arginin	156,2 Da
G	Gly	Glycin	57,0 Da	S	Ser	Serin	87,1 Da
H	His	Histidin	137,1 Da	T	Thr	Threonin	101,1 Da
I	Ile	Isoleucin	113,2 Da	V	Val	Valin	99,1 Da
K	Lys	Lysin	128,2 Da	W	Trp	Tryptophan	186,2 Da
L	Leu	Leucin	113,2 Da	Y	Tyr	Tyrosin	163,2 Da

* Molekulargewichte der Reste im Protein

(Quelle: <http://www.swisseduc.ch/chemie/molmod/anwendungen/aminoacids/tyrosin.html>)

1.4 Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Kapitel	Seite
A1	Schematische Darstellung der verschiedene Strukturebenen des Mollusken-Hämocyanins am Beispiel des KLH	A2	4
A2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen des Hämocyanins verschiedener Mollusken-Hämocyanine sowie deren Organisation der Untereinheiten	A3	6
A3	Kristallstruktur von R _t H ₂ -e (<i>Rapana thomasiana</i>) und OdH-g (<i>Octopus dofleini</i>)	A4	8
A4	Vergleich der Röntgenstrukturen dreier Typ III-Kupferproteine	A5	10
A5	Reaktionen der Tyrosinasen und Catecholoxidasen	A6	11
A6	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Tyrosinase	A6	12
A7	Schematische Darstellung der Melaninbiosynthese am Beispiel des Substrats L-Tyrosin	A7	15
A8	Vergleich der Tertiärstrukturen von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin sowie Tyrosinase und Catecholoxidase	A8	17
A9	Hypothetischer Mechanismus der Aktivierung von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin	A8	19
A10	Blockierung des Zugangs phenolischer Substrate zum katalytischen Zentrum von Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin	A8	20
A11	Klinische Einsatzgebiete des KLH	A11	25
B1	Die große Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i> im Aquarium (links) und in ihrem natürlichen Lebensraum (rechts)	B1	29
B2	Außen- und Innenansicht der Schale der großen Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i>	B1	30
B3	Hämolymphe-Serum der großen Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i> (KLH)	B 4.1	31
B4	Hämolymphe-Entnahme an der großen Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i>	B4.1	32
B5	Konzentrierung von Proteinlösungen mittels des Amicon [®] Ultrazentrifugationssystems	B4.5.1	34
B6	Grundform der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit möglichen Präzipitationsmustern	B4.8	40
B7	<i>Crossed-line</i> Immunelektrophorese mit möglichen Präzipitationsmustern	B4.8.2	42
B8	Schematische Darstellung einer HPLC-Apparatur	B4.9	44
B9	Schematische Darstellung einer Gelfiltrations-Apparatur	B4.10	46
B10	Inkubationsdauer der zur Kristallisation bestimmten Proteinprobe in flüssigem Stickstoff bei unterschiedlichen Aliquotvolumina (verändert nach Deng <i>et al.</i> , 2003).	B4.11	47
B11	Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocasein-Assay	B4.12	48
B12	B12 Reaktion von DOPachinon mit MBTH (verändert nach Winder & Harris, 1991)	B4.13.1	50
B13	Phasendiagramm der optimalen Proteinkristallisation	B5.1.1	53
B14	Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode im <i>Sitting-</i> bzw. <i>Hanging drop-</i> Verfahren	B5.1.1	53
B15	Schemazeichnung und Foto einer Röntgenstrahlungsquelle (Drehanode) zur Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten an einem Proteinkristall	B5.1.3	56

Abb.	Titel	Kapitel	Seite
B16	Foto und Schemazeichnung eines Differenz Scanning-Kalorimeters (leistungskompensiert)	B5.2	61
B17	Unbearbeitete scanning-kalorimetrische Kurve	B5.2	61
B18	Bearbeitetes DSC-Thermogramm	B5.2	62
B19	CD-Spektren von Poly-L-Lysin	B5.3.2	66
B20	Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers	B5.3.2	66
B21	Jablonski-Diagramm	B5.3.3	68
B22	Schematischer Aufbau eines modernen DLS-Instruments	B5.4	70
B23	Schemazeichnung und Foto eines Transmissionselektronenmikroskops	B5.5	72
C1	Reinheitsprüfung der Isolierung beider Isoformen mittels nativer PAGE und 2D-IE	C2	75
C2	Überprüfung der isolierten KLH1-DD im TEM	C2	76
C3	Überprüfung des Hämocyanins von <i>Megathura crenulata</i> nach dreimonatiger Hälterung mittels nativer PAGE	C2	76
C4	SEC des aus der Schnecke gezapften KLH2	C2	77
C5	Faktionen der Elutionsgipfel I - III der SEC des KLH2 im TEM	C2	77
C6	SEC der gegen Stabilisierungs-Puffer pH 8,5 dialysierten KLH1-DD	C3	79
C7	Fraktion 50 des Elutionsgipfels II der SEC (Abb. C6) im TEM	C3	79
C8	Auftrennung der mit Trypsin limitiert gespaltenen KLH2-UE über AEC	C4.1	80
C9	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C8) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C4.1	81
C10	Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH2-UE über AEC	C4.2	82
C11	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen des Elutionsgipfels III der AEC (Abb. C10) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C4.2	83
C12	Auftrennung der Fragmente des Gipfels II der AEC (Abb. C10) mittels SEC (Biogel® P-100)	C4.2	84
C13	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C12) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C4.2	84
C14	Auftrennung der mit Trypsin sekundär gespaltenen großen Fragmente (-defg(h)) der V8-Spaltung der KLH2-UE (Abb. C10) über AEC	C4.3	86
C15	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C14) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C4.3	87
C16	Auftrennung der Fragmente des Gipfels III der AEC (Abb. C14) mittels SEC (Biogel® P-60)	C4.3	88
C17	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C16) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C4.3	89
C18	Übersicht der Proteasespaltungen der KLH2-UE sowie der Aufreinigungen der Spaltprodukte	C5	90
C19	Auftrennung der mit Trypsin limitiert gespaltenen KLH1-UE über AEC	C6.1	92
C20	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C19) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C6.1	92
C21	Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH1-UE über AEC	C6.2	94
C22	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C21) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C6.2	95

Abb.	Titel	Kapitel	Seite
C23	Auftrennung der Fragmente des Gipfels III der AEC (Abb. C21) mittels SEC (Biogel [®] P-100)	C6.2	96
C24	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der SEC (Abb. C23) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C6.2	97
C25	Übersicht der Proteasespaltungen der KLH1-UE sowie der Aufreinigungen der Spaltprodukte	C7	98
C26	zur Isolierung möglichst großer und reiner Mengen der FU KLH1-h	C8	101
C27	Reinheitsprüfung der zur Kristallisation bestimmten vereinigten Fraktionen der FU KLH1-h	C8	102
C28	Kristallisation der aufgereinigten FU KLH1-h (Abb. C27) am <i>Hauptman-Woodward Medical Research Institute (HWI, Buffalo, USA)</i>	C9	103
C29	Kristallisationen am <i>HWI (Buffalo, USA)</i> und am <i>Institut für Molekulare Biophysik (Mainz)</i>	C9	103
C30	Röntgenbeugungsbild der KLH1-h-Kristalle, aufgenommen am Synchrotron der <i>Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz)</i>	C10	105
C31	Sequenzalignment der FUs KLH1-g und -h sowie der FU-g von <i>Octopus dofleini (OdH-g)</i>	C10	106
C32	3D-Rekonstruktion (11 Å) und am Synchrotron ermittelte Röntgenstruktur (4 Å) eines kragenbildenden Dimers der FU KLH1-h	C10	107
C33	Modellierte Bänderstruktur der drei Domänen der FU KLH1-h	C10	109
C34	Bänderstruktur der FU KLH1-h mit farblicher Darstellung der B-Faktoren	C10	110
C35	Überlagerung der Röntgenstrukturen der FUs OdH-g und KLH1-h	C10	111
C36	Langzeituntersuchung zur Stabilität der aufgereinigten Probe der FU KLH1-h	C11	112
C37	Proteolytische Aktivität der Serinproteasen V8 und Trypsin nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des irreversiblen Inhibitors <i>Pefabloc[®] SC</i>	C11.1	114
C38	Vergleichende Elutionsprofile nach Auftrag der V8-Protease bzw. der mit V8 gespaltenen KLH1-UE (s. Abb. C26 b) auf eine AEC-Säule	C11.2	115
C39	Proteasenaktivität ausgewählter Fraktionen nach Auftrennung der V8 über AEC (Abb. C38 a)	C11.2	116
C40	Auftrennung der mit V8-Protease limitiert gespaltenen KLH1-UE über SEC (Biogel [®] P-60)	C11.2	117
C41	Proteolytische Aktivität ausgewählter Fraktionen nach Auftrennung der mit V8-Protease gespaltenen KLH1-UE über SEC (Abb. C40)	C11.2	118
C42	Weiterführende Aufreinigung der Fraktionen 6 - 12 der SEC (Abb. C40) mittels AEC	C11.2	119
C43	Immunologische Charakterisierung ausgewählter Fraktionen der AEC (Abb. C42) mittels <i>Crossed-line</i> IE	C11.2	120
C44	Qualitätssicherung der zur Kristallisation bestimmten Probe der FU KLH1-h	C11.2	121
C45	Strategie zur Isolierung der FU KLH1-h bei gleichzeitiger Entfernung der V8-Protease	C11.2	122
C46	Charakteristische Absorptionsspektren und Farbgebung der KLH1-UE sowie der FU KLH1-h	C11.2.1	123
C47	Vergleich der Kristallisationsbedingungen der aufgereinigten FU KLH1-h mit und ohne V8-Protease (durchgeführt am <i>HWI, Buffalo, USA</i>)	C12	125

Abb.	Titel	Kapitel	Seite
C48	Kristallisationen der FU-h mit und ohne V8-Protease (durchgeführt am <i>Hauptman-Woodward Medical Research Institute</i> , Buffalo, USA)	C12	126
C49	Im MBTH-Assay eingesetzte mono- und diphenolische Substrate zum Nachweis etwaiger Mono- und Diphenolase-Aktivitäten des KLH	C13	128
C50	Qualitative Untersuchung zur CO- und TY-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der nativen PAGE	C13.1	130
C51	Catechol-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.2.1	134
C52	Dopamin-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.2.2	136
C53	L-DOPA-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.2.3	138
C54	Tyramin-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.2.4	140
C55	<i>p</i> -cresol-Umsetzung verschiedener KLH-Proteine nach SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.2.5	142
C56	Intrinsische Umsetzung von Mono- und Diphenolen durch verschiedene KLH-Proteine <u>ohne</u> SDS-Aktivierung in der <i>Crossed IE</i>	C13.3	144
C57	Chemische Stabilität der KLH1-Didekamere nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an SDS	C13.4.1	148
C58	Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Catechol-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer	C13.4.2	150
C59	Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Dopamin-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer	C13.4.3	152
C60	Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen L-DOPA-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer	C13.4.4	155
C61	Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen Tyramin-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer	C13.4.5	157
C62	Quantitative Bestimmung des SDS-induzierten relativen 4-Methylphenol-Umsatzes verschiedener KLH-Proteine im Spektralphotometer	C13.4.6	160
C63	Vergleich intrinsischer und SDS-induzierter Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine	C13.5	162
C64	Vergleich der relativen <u>intrinsischen</u> und <u>SDS-induzierten</u> Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine (s. Tab. C6)	C13.5	164
C65	Vergleich der verschiedenen Substrat-Umsätze der KLH2-UE in Tris- und Phosphat-Puffer nach SDS-Aktivierung (s. Tab. C8)	C13.6.1	166
C66	Vergleich des relativen Dopamin- und Tyramin-Umsatzes in Tris-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an MCl_2 (s. Tab. C9)	C13.6.2	168
C67	Änderung des pH-Wertes von MOPS-Puffer mit der Temperatur	C14.1	171
C68	Schmelzpunktbestimmung verschiedener KLH-Proteine mittels DSC	C14.1	173
C69	Nachweis der irreversiblen thermischen Entfaltung der KLH1-UE mittels DSC	C14.2	174
C70	Abhängigkeit der thermischen Denaturierung der KLH1-UE von der Scanrate	C14.2	175
C71	Einfluss von SDS auf die thermische Stabilität der KLH1-UE	C14.3	176
C72	Bestimmung der thermischen Stabilität der KLH1-Didekamere im TEM	C14.4	178

C73	Bestimmung der thermischen Stabilität der Sekundärstrukturelemente des KLH mittels CD-Spektroskopie	C14.5	180
C74	Bestimmung der Sauerstoffbeladung verschiedener KLH-Proteine mit zunehmender Temperatur mittels Absorptionsspektroskopie	C14.6	182
C75	Bestimmung der thermischen Stabilität der Tertiärstruktur verschiedener KLH-Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie	C14.7	184
C76	Temperaturinduzierte Deoxygenierung und thermische Stabilität der Tertiärstrukturen verschiedener KLH-Proteine	C14.7	185
D1	Röntgenstruktur der V8-Protease aus <i>Staphylococcus aureus</i>	D1.3.1	191
D2	SDS-Page der über AEC abgetrennten Fraktionen der FU KLH1-h	D1.3.1	192
D3	Aminosäuresequenz der FU KLH1-h und der N-terminalen Linkerregion zur FU-g	D1.3.1	193
D4	Mechanismus der irreversiblen Inhibition von Serinprotease am Beispiel von <i>Pefabloc[®] SC</i>	D1.3.2	195
D5	Bänderstrukturen verschiedener Cupredoxine mit Typ I-Kupferzentrum	D1.4	198
D6	Sequenzalignment verschiedener FUs des KLH mit und ohne Catecholoxidase- (CO) bzw. Tyrosinase (TY)-Aktivität	D2.2	211
D7	Mögliche molekulare Ursachen der Catecholoxidase- (CO) und Tyrosinase (TY)-Aktivität einiger FUs des KLH	D2.2	212
D8	Topologie der zur Diphenolase aktivierbaren FUs-a und -f innerhalb eines UE-Dimers des KLH-Didekamers	D2.4	221

1.5 Tabellenverzeichnis

Tab.	Titel	Kapitel	Seite
B1	Trenneigenschaften von Polyacrylamidgelen	B4.6	35
B2	Molekulargewichtsmarker SDS-6H	B4.6.1	36
B3	Systemspezifische Lösungen	B4.6.2	37
B4	Pipettierschema für 3 Minigele	B4.6.2	37
B5	Aktivitäts-Färbelösung des MBTH-Assays für native PAGE und <i>Crossed IE</i>	B4.8.3	43
B6	Einstellungen sowie verwendete Lösungen und Materialien der AEC-Läufe	B4.9	45
B7	Einstellungen sowie verwendete Lösungen und Materialien der SEC-Läufe	B4.10	46
B8	Reaktionsansätze und dazugehörige Komponenten des MBTH-Assays für Messungen im Spektralphotometer	B4.13.2	51
B9	Vom <i>Hauptman-Woodward Medical Research Institute</i> (Buffalo, USA) ermittelte Bedingungen zur Kristallisation der FU KLH1-h	B5.1.1	55
B10	Kristallisationsansätze des <i>Instituts für Molekulare Biophysik</i> (Uni Mainz), am Beispiel des ersten <i>Screenings</i> der FU KLH1-h (Tab. B9)	B5.1.1	55
B11	Temperaturreihen der im Photometer gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern	B5.3.1	65
B12	Grundeinstellungen zur Optimierung der Messdauer	B5.3.2	67
B13	Temperaturreihen der im CD-Spektrometer gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern.	B5.3.2	67

B14	Temperaturreihen der im Fluorimeter gemessenen Proteinproben in den jeweiligen Puffern	B5.3.3	69
C1	Strategien zur Isolierung möglichst großer und reiner Mengen der FU KLH1-h	C8	99
C2	Versuchsbedingungen zur qualitativen Bestimmung der TY- und CO-Aktivität des KLH nach SDS-Aktivierung in der nativen PAGE	C13.1	129
C3	Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung der <u>SDS-induzierten</u> TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer	C13.4	146
C4	Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung der <u>intrinsischen</u> TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C	C13.5	161
C5	Vergleich der relativen <u>intrinsischen</u> und <u>SDS-induzierten</u> Substrat-Umsätze verschiedener KLH1-Proteine (s. Abb. C64)	C13.5	164
C6	Versuchsbedingungen zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Puffersubstanzen auf die TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C	C13.6.1	165
C7	Vergleich der verschiedenen Substrat-Umsätze der KLH2-UE in Tris- und Phosphat-Puffer nach SDS-Aktivierung (s. Abb. C65)	C13.6.1	166
C8	Versuchsbedingungen zur quantitativen Bestimmung des Einflusses verschiedener Konzentrationen an MgCl ₂ auf die TY- und CO-Aktivität des KLH im Spektralphotometer bei 25 °C	C13.6.2	168
C9	Vergleich des relativen Dopamin- und Tyramin-Umsatzes in Tris-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an MCl ₂ (s. Abb. C66)	C13.6.2	168
C10	Häufig eingesetzte Puffer mit pK (25 °C) und Änderung des pH-Wertes je Grad Celsius	C14.1	170
C11	Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener KLH-Proteine mittels DSC	C14.1	172
D1	Catecholoxidase- (CO) und Tyrosinase (TY)-Aktivitäten verschiedener Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine	D2.1	209
D2	Mittels DSC bestimmte Schmelzpunkte (T _m) der thermischen Denaturierung verschiedener Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine	D 3.2	227

2 *Verwendete Software*

Adobe® Acrobat® 7.0
Adobe® Photoshop® 7.0
DALI
GENEDOC
Microsoft® Office 2003
MODELLER Version 9.2
PHASER
RESOLVE
UCSF CHIMERA Version 1
XFIT

3 *Internetadressen*

Anwendung	Internet-Adresse
CHIMERA	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
EXPASY-tools	http://www.expasy.ch/tools/
GENEDOC	http://www.psc.edu/biomed/genedoc/
Mol. Biophysik, Uni Mainz	http://www.biophysik.uni-mainz.de
MPI med. Forschung, HD	http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/instUeberInstitut/index.html
PSI, Schweiz	http://www.sls.psi.ch
Zoologie, Abt. 2, Uni Mainz	http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2

Die Internetadressen standen zum Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung.

H Literatur

Adachi K., Hirata T., Nagai K., Sakaguchi M. (2001): Hemocyanin a Most Likely Inductor of Black Spots in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* During Storage. *Journal of Food Sciences*, 66: 1130-1136

Adachi K., Hirata T., Fujio A., Nishioka T., Sakaguchi M. (2003): A 160-kDa Protein is essential for Hemocyanin-derived Melanosis of Prawn. *Journal of Food Sciences*, 68: 765-769

Adachi K., Wakamatsu K., Ito S., Miyamoto N., Kokubo T., Nishioka T., Hirata T. (2005): An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Res.*, 19: 214-219

Adman, E.T. (1985): Topics in Molecular Structural Biology. In: Harrison, P. (Ed.): Metalloproteins. *Macmillan Ltd., New York*, 1: 1-42

Adman E.T., Turley S., Bramson R., Petratos K., Banner D., Tsernoglou D., Beppu T., Watanabe H. (1989): A 2.0-Å Structure of the Blue Copper Protein (Cupredoxin) from *Alcaligenes faecalis* S-6. *J. Biol. Chem.*, 264 (1): 87-99

Adman E.T. (1991): Copper protein structures. *Adv. Protein Chem.*, 42: 145-197

Albergoni V., Cassini A., Salvato B. (1972): The Carbohydrate Portions of Hemocyanin from *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B: 445-451

Albrecht U., Keller H., Gebauer W., Markl J. (2001): Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Cell Tissue Res.* 304: 455-462

Altenhein B., Markl J., Lieb B., (2002): Gene structure and hemocyanin isoform from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene*, 301: 53-60

Amzel L. M., Poljak R. J. (1979): Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.*, 48: 961-997

Andersen S.O., Peter M.G., Roepstorff P. (1996): Cuticular Sclerotization in Insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B (4): 689-705

Arnesano F., Banci L., Bertini I., Thompsett A.R. (2002): Solution Structure of CopC: A Cupredoxin-like Protein Involved in Copper Homeostasis. *Structure*, 10: 1337-1347

Arnesano F., Banci L., Bertini I., Mangani S., Thompsett A.R. (2003): Bioinorganic Chemistry Special Feature: A redox switch in CopC: An intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (7): 3814-3819

Aroca P., Garcia-Borrón J.C., Solano F., Lozano J.A. (1990): Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrom converting factor: dopachrom tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1035 (3): 266-75

Asada N., Fukumitsu T., Fujimoto K., Masuda K. (1993): Activation of Prophenoloxidase with 2-Propanol and Other Organic Compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23: 515-520

Ashida M., Ishizaki Y., Iwahana H. (1983): Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113: 562-568

Ashida M., Söderhäll K. (1984): The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B: 21-26

Ashida M. (1990): The Prophenoloxidase Cascade in Insect Immunity. *Res. Immunol.*, 141 (9): 908-910

Ashida M., Brey P. (1995): Role of the Integument in Insect Defense : Pro-Phenol Oxidase Cascade in the Cuticular Matrix. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92: 10698-10702

- Asokan R., Arumugam M., Mullainadhan P. (1997):** Activation of Prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Develop. Comp. Immunol.*, 21 (1): 1-12
- Aspán A, Huang T, Cerenius L, Söderhäll K (1995):** cDNA Cloning of Prophenoloxidase from the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 939-943
- Baird S., Kelly S.M., Price N.C., Jaenicke E., Meesters C., Nillius D., Decker H., Nairn J. (2007):** Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1774 (11): 1380-1394
- Baker E.N. (1988):** Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans*: Refinement at 1.8Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *J. Mol. Biol.*, 203: 1071-1095
- Barbosa J.A.R.G., Garratt R.C., Saldanha J.W. (1993):** A structural model for the glutamate-specific endopeptidase from *Streptomyces griseus* that explains substrate specificity. *FEBS Lett.*, 324 (1): 45-50
- Barbosa J.A.R.G., Saldanha J.W., Garratt R.C. (1996):** Novel features of serine protease active sites and specificity pockets: sequence analysis and modelling studies of glutamate-specific endo-peptidases and epidermolytic toxins. *Prot. Engineer.*, 9 (7): 591-601
- Battaini G., Monzani E., Perotti A., Para C., Casella L., Santagostini L., Gullotti M., Dillinger R., Näther C., Tuzek F. (2003)** A Double Arene Hydroxylation Mediated by Dicopper(II)-Hydroperoxide Species. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 4185-4198
- Behrens J.W., Elias J.P., Taylor H.H., Weber R.E. (2001):** The archaeogastropod mollusc *Haliothis iris*: tissue and blood metabolites and allosteric regulation of haemocyanin function. *J. Exp. Biol.*, 205: 253-263
- Bergmann S. (2004):** Das Hämocyanin zweier lebender Fossilien: *Nautilus pompilius* und *Nucula nucleus*. *Dissertation*. Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Blanchard J. (1984):** Buffers for Enzymes. *Methods Enzymol.*, 104: 404-414
- Blow D.M., Birktoft J.J., Hartley B.S. (1969):** Role of a buried acid group in the mechanism of action of Chymotrypsin. *Nature*, 221: 337-340
- Boisset N., Mouche F. (2000):** *Sepia officinalis* Hemocyanin : A Refined 3D Structure from Field Emission Gun Cryoelectron Microscopy. *J. Mol. Biol.*, 296: 459-472
- Bonaventura C., Bonaventura J., Miller K.I., Van Holde K.E. (1981):** Hemocyanin of the chambered nautilus: structure-function relationships. *Arch. Biochem. Biophys.*, 211(2): 589-98
- Boteva R., Severov S., Genov N., Beltramini M., Filippi B., Ricchelli F., Tallandini L., Pallhuber M.M., Tognon G., Salvato B. (1991):** Biochemical and functional characterization of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 493-501
- Branza-Nichita N., Petrescu A.J., Dwek R.A., Wormald M.R., Platt F.M., Petrescu S.M. (1999):** Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261 (3): 720-725
- Brehélin M., Drif L., Baud L., Boemare N. (1989):** Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 19: 301-307
- Brenowitz M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1984):** Self-association and oxygen-binding characteristics of the isolated subunits of *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 230: 238-249
- Brix O., Condo S.G., Colosimo A., Giardina B. (1990):** The influence of salinity acclimation on the temperature sensitivity of oxygen binding to the haemocyanin of the prosobranch *Neptunea antiqua*. *J. Exp. Biol.*, 149: 417-424
- Broothaerts W., McPherson J., Li B., Randall E., Lane W.D., Wiersma P.A. (2000):** Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (12): 5924-5928

- Brouwer M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1981):** Effect of oxygen and allosteric effectors on structural stability of oligomeric hemocyanins of the arthropod, *Limulus polyphemus*, and the mollusc, *Helix pomatia*. *Biochem.*, 20: 1842-1848
- Brouwer M., Whaling P., Engel D.W. (1986):** Copper-Metallothioneins in the American Lobster *Homarus americanus*: Potential Role as Cu(I) Donors to Apohemocyanin. *Environmental Health Perspectives*, 65: 93-100
- Brouwer M., Syring R., Brouwer T.H. (2001):** Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.*, 88: 228-239
- Bubacco L., van Gastel M., Groenen E.J., Vijgenboom E., Canters G.W. (2003):** Spectroscopic characterization of the electronic changes in the active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase upon binding of transition state analogue inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 278 (9): 7381-7389
- Büchler K. (2004):** Strategien zur biochemischen Isolierung einzelner funktioneller Domänen des Hämocyanins der großen Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* (KLH). *Diplomarbeit*. Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Buchsbaum R., Milne L.J. (1960):** Knaurs Tierreich in Farben: Niedere Tiere (ASIN: B0000BS1K9, 360 Seiten). *Droemer Knauer Verlag, München*
- Burmester T. (2002):** Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp. Physiol.*, 172B: 95-107
- Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. (1973):** Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.*, 18 (4): 263-279
- Burton R. F. (1972):** The binding of alkaline earth ions by the haemocyanin of *Helix pomatia* L.. *Comp. Biochem. Physiol.* 41: 555-565
- Cabanes J., Garcia-Canovas F., Lozano J., Garcia-Carmona F. (1987):** A Kinetic Study of the Melanization Pathway between L-Tyrosine and Dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 923: 187-195
- Canters G.W., Van de Kamp M. (1992):** Protein-mediated electron transfer. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 859-869
- Carrell R., Travis J. (1985):** α_1 -Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.*, 10: 20-24
- Castigliero L., Iannone G., Grifoni G., Rosati R., Gianfaldoni D., Guidi A. (2007):** Natural and recombinant bovine somatotropin: immunodetection with a sandwich ELISA. *J. Dairy Res.*, 74 (1): 79-85
- Cha J.S., Cooksey D.A. (1991):** Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88 (20): 8915-8919
- Chabicoovsky M., Niederstatter H., Thaler R., Hodl E., Parson W., Rossmannith W., Dallinger R. (2003):** Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 190 (1): 25-36
- Chan H.M., Weeks J.M. (1992):** The subunit structural composition of amphipod haemocyanin (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B (4): 567-572
- Chapman D. J., Fox D. L. (1969):** Bile pigment metabolism in the seahare *Aplysia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 4: 71-78
- Chassaing G., Convert O., Lavielle S. (1986):** Preferential conformation of substance P in solution. *Eur. J. Biochem.*, 154 (1): 77-85
- Chazarra S., Cabanes J., Escribano J., García-Carmona F. (1996):** Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 44 (4): 984-988

- Chen L.Y., Leu W.M., Wang K.T., Lee Y.H. (1992):** Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. *J. Biol. Chem.*, 267 (28): 20100-20107
- Chen L.Y., Chen M.Y., Leu W.M., Tsai T.Y., Lee Y.H. (1993):** Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *J. Biol. Chem.* 268 (25): 18710-18716
- Chen P., Solomon E.I. (2004):** O₂ activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 (36): 13105–13110
- Ciriolo M.R., Desideri A., Paci M., Rotilio G. (1990):** Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I) glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 265 (19): 11030-11034
- Claus H., Decker H. (2006):** Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29 (1): 3-14
- Coles J.A., Pipe R.K. (1994):** Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 337-352
- Collyer C.A., Guss J.M., Sugimura Y., Yoshizaki F., Freeman H.C. (1990):** Crystal structure of plastocyanin from a green alga, *Enteromorpha prolifera*. *J. Mol. Biol.*, 211 (3): 617-632
- Cong R., Sun W., Liu G., Fan T., Meng X., Yang L., Zhu L. (2004):** Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 61-70
- Conze W. (2005):** Untersuchung zur Temperaturabhängigkeit der O₂-Bindungseigenschaft von Hämocyanin aus Arthropoden verschiedener Biotope. *Dissertation*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Cooksey D.A. (1994):** Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 14: 381-386
- Cooksey C.J., Garratt P.J., Land E.J., Pavel S., Ramsden C.A., Riley P.A., Smit N.P.M. (1997):** Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 272: 26226-26235
- Corey D.R., Craik C.S. (1992):** An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of Trypsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (5): 1784-1790
- Cuff M.E., Miller K.I., Van Holde K.E., Hendrickson W.A. (1998):** Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, 278 (4): 855-870
- Cunane L.M., Chen Z.-W., Durley R.C.E., Mathews F.S. (1996):** X-ray Structure of the Cupredoxin Amicyanin, from *Paracoccus denitrificans*, Refined at 1.31 Å Resolution. *Acta Cryst.*, 52D: 676-686
- Curtis J.E., Hersh, E.M., Harris, J.E., Mc Bride, C., Freireich, E. J. (1970):** The human primary immune response to keyhole limpet hemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. *Clin. Exp. Immunol.*, 6: 473-491
- Dalal S., Balasubramanian S., Regan L. (1997):** Protein alchemy: changing beta-sheet into alpha-helix. *Nat. Struct. Biol.*, 4(7): 548-52
- Dallinger R., Wieser W. (1984):** Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C: 117-124
- Dallinger R. (1996):** Metallothionein research in terrestrial invertebrates: synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 125-133
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Kägi J.H.R. (1997):** Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature*, 388: 237-238
- Dallinger R., Berger B., Gruber C., Stürzenbaum S. (2000):** Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significans, and implications for their use as biomarkers. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 46: 331-346

- Dallinger R., Chabicovsky M., Hödl E., Prem C., Hunziker P., Manzl C. (2005):** Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289: R1185-R1195
- Dancis A., Yuan D.S., Halle D., Askwith C., Eide D., Moehle C., Kaplan J., Klausner R.D. (1994):** Molecular Characterization of a Copper Transport Protein in *S. cerevisiae*: An Unexpected Role for Copper in Iron Transport. *Cell*. 76: 393-402
- Daquinag A.C., Sato T., Koda H., Takao T., Fukuda M., Shimonishi Y., Tsukamoto T. (1999):** A novel endogenous inhibitor of phenoloxidase from *Musca domestica* has a cystine motif commonly found in snail and spider toxins. *Biochem.*, 38 (7): 2179-88
- Decker H., Markl J., Loewe R., Linzen B. (1979):** Hemocyanins in Spiders, VIII. Oxygen Affinity of the individual Subunits isolated from *Eurypelma californicum* Hemocyanin. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 360: 1505-1507
- Decker H. (1981):** Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Decker H., Connelly P.R., Robert C.H., Gill S.J. (1988):** Nested allosteric interaction in tarantula hemocyanin revealed through the binding of oxygen and carbon monoxide. *Biochem.*, 27 (18): 6901-6908
- Decker H., Sterner R. (1990):** Nested Allostery of Arthropodan Hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The Role of Protons. *J. Mol. Biol.*, 211: 281-293
- Decker H., Rimke T. (1998):** Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity. *J. Biol. Chem.*, 273: 25889-25892
- Decker H., Terwilliger N. (2000):** Cops and Robbers: Putative Evolution of Copper Oxygen-Binding Proteins. *J. Exp. Biol.*, 203: 1777-1782
- Decker H., Tucek F. (2000):** Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS* 25: 392-397
- Decker H., Dillinger R., Tucek F. (2000):** How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology. *Angew. Chem. Int. ed.*, 39: 1591-1595
- Decker H., Ryan M., Jaenicke E., Terwilliger N. (2001):** SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.* 276, 21: 17796-17798
- Decker H., Jaenicke E. (2004):** Recent Findings on Phenoloxidase Activity and Antimicrobial Activity of Hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 673-687
- Decker H. (2005):** Copper Proteins with Dinuclear Active Sites. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry 2nd Edition* (R. Bruce King, Editor, ISBN: 0-470-86078-2, 6696 pages), Vol. 2: 1159 – 1173
- Decker H., Schweikardt T., Tucek F. (2006):** The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45: 4546-4550
- Decker H., Schweikardt T., Nillius D., Salzbrunn U., Jaenicke E., Tucek F. (2007a):** Similar Activation Process and Catalysis in Hemocyanins and Tyrosinases. *Gene*, 398: 183-191
- Decker H., Hellmann N., Jaenicke E., Lieb B., Meissner U., Markl J. (2007b):** Minireview: Recent progress in hemocyanin research. *Integr. Comp. Biol.*, 47 (4): 631-644
- De Haas F., Van Bruggen E.F. (1994):** The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. A tentative mechanism for cooperative behavior. *J. Mol. Biol.*, 237(4): 464-478
- Deng J., D. R. Davies, G. Wisedchaisri, M. Wu, W.G.J. Hol, C. Mehlin (2003):** An improved protocol for rapid freezing of protein samples for long-term storage. *Acta Cryst.*, 60D: 203-304

- Dissous, C., Grzych J.M., Capron, A. (1986):** *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, 323: 443-445
- Dolashka P., Genov N., Parvanova K., Voelter W., Geiger M., Stoeva S (1996):** *Rapana thomasiana* grosse (gastropoda) haemocyanin: spectroscopic studies of the structure in solution and the conformational stability of the native protein and its structural subunits. *Biochem. J.*, 315 (1):139-144
- Dolashka-Angelova P., Hristova R., Stoeva S., Voelter W. (1999):** Spectroscopic properties of *Carcinus aestuarii* hemocyanin and its structural subunits. *Spectrochim.*, 55A: 2927-2934
- Dolashka-Angelova P., Schick M., Stoeva S., Voelter W. (2000):** Isolation and partial characterization of the N-terminal functional unit of subunit RtH1 from *Rapana thomasiana* grosse hemocyanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32 (5): 529-38
- Dolashka-Angelova P., Schwarz H., Dolashki A., Stevanovic S., Fecker M., Saees M., Voelter W. (2003):** Oligomeric stability of *Rapana venosa* Hemocyanin (RvH) and its structural subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, 1646: 77-85
- Dolashka-Angelova P., Dolashki A., Stevanovic S., Hristova R., Atanasov B., Nikolov P., Voelter W. (2005):** Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. *Spectrochim.*, 61A: 1207-1217
- Dolashka-Angelova P., Stevanovic S., Dolashki A., Devreese B., Tzvetkova B., Voelter W., Van Beeumen J., Salvato B. (2007):** A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* Hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 459: 50-58
- Dolashki A., Schütz J., Hristova R., Voelter W., Dolashka P. (2005):** Spectroscopic Properties of N-glycosylated Functional Unit KLH2-c of Keyhole Limpet Hemocyanin. *World J. Agricult. Sci*, 2: 129-136
- Drapeau G.R., Boily Y., Houmard J. (1972):** Purification and Properties of an Extracellular Protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 247 (20): 6720-6726
- Drapeau G.R. (1977):** Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. *Methods Enzymol.*, 47: 189-191
- Drexel R., Siegmund S., Schneider H.J., Linzen B., Gielens C., Preaux G., Lontie R., Kellermann J., Lottspeich F. (1987):** Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 368: 617-635
- Duckworth H.W., Coleman J.E. (1970):** Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 245: 1613-1625
- Durley R., Chen L., Lim L., Mathews F.S., Davidson V. (1993):** Crystal structure analysis of amicyanin and apoamicyanin from *Paracoccus denitrificans* at 2.0 Å and 1.8 Å resolution. *Protein Sci.*, 2 (5): 739-752
- Durstewitz G., Terwilliger N. (1997):** cDNA Cloning of a Developmentally Regulated Hemocyanin Subunit in the Crustacean *Cancer magister* and Phylogenetic Analysis of the Hemocyanin Gene Family. *Mol. Biol. Evol.*, 14 : 266-276
- Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. (1999):** Catecholoxidase-Structure and Activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6 : 677-683
- Einsle O., Mehrabian Z., Nalbandyan R., Messerschmidt A. (2000):** Crystal structure of plantacyanin, a basic blue cupredoxin from spinach. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5: 666-672
- Erker W., Beister U., Decker H. (2005):** Cooperative Transition in the Conformation of 24-mer Tarantula Hemocyanin upon Oxygen Binding. *J. Biol. Chem.*, 280 : 12391-12396
- Espin J.C., Morales M., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Garcia-Cánovas F. (1997):** Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Polyphenol Oxidases. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1084-1090

- Espin J.C., Wichers H.J. (1999):** Activation of a Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase Isoform by Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Kinetic Properties of the SDS-Activated Isoform. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3518-3525
- Fernandez-Moran H., Van Bruggen E.F., Ohtsuki M. (1966):** Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 16 : 191-207
- Fersht A. (1985):** In: Enzyme Structure and Mechanism. *W. H. Freeman and Company, New York:* S. 405
- Field L. S., Luk E., Culotta V. C. (2002):** Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 34 (5): 373-379
- Fiore G., Poli A., Di Cosmo A., d'Ischia M., Palumbo A. (2004):** Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochem J.*, 378: 785-791
- Flamm J., Bucher A., Holtl W., Albrecht W. (1990):** Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial. *J. Urol.*, 144: 260-263
- Foster D., Davie E.W. (1984):** Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 4766-4770
- Fox D.L. (1979):** *Biochromy, University of California Press, Berkley, California:* p. 195
- Franks, F. (1985).** *Water Science Reviews, Cambridge University Press*
- Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. (1989):** The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.*, 264 (10): 5598-5605
- Freedman T.B., Loehr J.S., Loehr T.M. (1976):** A resonance Raman study of the copper protein, hemocyanin. New evidence for the structure of the oxygen-binding site. *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (10): 2809-2815
- Fukada H., Sturtevant J.M., Quioco F.A. (1983):** Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 258: 13193-13198
- García-Borrón J.C., Solano F. (2002):** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.*, (3):162-173
- García-Cánovas F., García-Carmona F., Lozano J.A. (1981):** Hysteresis of mushroom tyrosinase: lag period of cresolase activity. *Phytochemistry*, 20 (6): 1215-1217
- García-Cánovas F., García-Carmona F., Sánchez J.V., Iborra J.L., Lozano J.A. (1982)** The Role of pH in the Melanin Biosynthesis Pathway. *J. Biol. Chem.*, 257 (15): 8738-8744
- Gatsogiannis C., Moeller A., Depoix F., Meissner U., Markl J. (2007):** *Nautilus pompilius* Hemocyanin: 9 Å Cryo-EM Structure and Molecular Model Reveal the Subunit Pathway and the Interfaces between the 70 Functional Units. *J. Mol. Biol.*, 374: 465-486
- Gaykema W.P.J., Hol W.G.J., Vereijken J.M., Soeter N.M., Bak H.J., Beintema J.J. (1984):** 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature*, 309: 23-29
- Gebauer W., Harris J.R., Heid H., Süling M., Hillenbrand R., Söhngen S.M., Wegener-Strake A., Markl J. (1994):** Quarternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH1 and KLH2. *Zoology*, 98 (1): 51-68
- Gebauer W., Harris J.R. (1999):** Controlled cleavage of KLH1 und KLH2 by the V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.*, 262: 166-175
- Gebauer W., Harris J.R., Geisthardt G., Markl J. (1999):** Keyhole Limpet Hemocyanin Type 2 (KLH2): Detection and Immunolocalization of a Labile Functional Unit *h. J. Struc. Biol.*, 128 (3): 280-286

- Gebauer W., Harris J.R., Markl J. (2002):** Topology of the 10 subunits within the Decamer of KLH, the hemocyanin of the marine gastropod *Megathura crenulata*. *J. Struc. Biol.*, 139: 153-159
- Georgieva D.N., Stoeva S., Ali A.A., Abbasi A., Genov N., Voelter W. (1998):** Circular dichroism study of the hemocyanin thermostability. *Spectrochim. Acta*, 54A: 765-771
- Georgieva D.N., Stoeva S., Voelter W., Genov N. (2001):** *Viviparus ater* hemocyanin: investigation of the dioxygen-binding site and stability of the oxy- and apo-forms. *Z. Naturforsch.*, 56C (9-10): 843-847
- Georgieva D.N., Genov N., Perbandt M., Voelter W., Betzel C. (2004):** Contribution of Disulfid Bonds and Calcium to Molluscan Hemocyanin Stability. *Z. Naturforsch.*, 59C: 281-28
- Georgieva D., Schwark D., Nikolov P., Idakieva K., Parvanova K., Dierks K., Genov N., Netzel C. (2005):** Conformational States of the *Rapana thomasiana* Hemocyanin and Its Substructures Studied by Dynamic Light Scattering and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *Biophys. J.*, 88: 1276-1282
- Gerdemann C., Eicken C., Krebs B. (2002a):** The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.*, 35 (3): 183-191
- Gerdemann C., Eicken C., Galla H.J., Krebs B. (2002b):** Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *J. Inorg. Biochem.*, 89 (1-2): 155-158
- Geyer H, Wuhrer M, Resemann A, Geyer R. (2005):** Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*, 280(49): 40731-40748
- Ghiretti-Magaldi A., Nuzzolo C., Ghiretti F. (1966):** Chemical studies on hemocyanins. I. Amino acid composition. *Biochem.*, 5 (6): 1943-1951
- Ghiretti-Magaldi A., Salvato B., Tallandini L., Beltramini M. (1979):** The hemocyanin of *Aplysia limacina*: chemical and functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A, 579-584
- Gielens C., Maes G., Zeegers-Huyskens T., Lontie R. (1980):** Raman Resonance Studies of Functional Fragments of *Helix pomatia* β_c -Haemocyanin. *J. Inorg. Biochem.*, 13: 41-47
- Gielens C., Declercq L., Préaux G. (1995):** Limited proteolysis of the haemocyanin of the gastropod *Pila leopoldvillensis*. Isolation and characterization of the fragments. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B (3): 565-575
- Gielens C., De Geest N., Xin X.Q., Devreese B., Van Beeumen J., Préaux G. (1997):** Evidence for a cysteine-histidine thioether bridge in functional units of molluscan haemocyanins and location of the disulfide bridges in functional units d and g of the betaC-haemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.*, 248 (3): 879-88
- Gielens C, De Geest N, Compennolle F, Préaux G. (2004):** Glycosylation sites of hemocyanins of *Helix pomatia* and *Sepia officinalis*. *Micron.*, 35 (1-2): 99-100
- Gielens C, Idakieva K, De Maeyer M, Van den Bergh V, Siddiqui NI, Compennolle F. (2007):** Conformational stabilization at the active site of molluscan (*Rapana thomasiana*) hemocyanin by a cysteine-histidine thioether bridge A study by mass spectrometry and molecular modeling. *Peptides*, 28 (4): 790-7
- Gilewski T.A., Ragupathi G., Dickler M., Powell S., Bhuta S., Panageas K., Koganty R.R., Chin-Eng J., Hudis C., Norton L., Houghton A.N., Livingston P.O. (2007):** Immunization of High-Risk Breast Cancer Patients with Clustered sTn-KLHConjugate plus the Immunologic Adjuvant QS-21. *Clin. Cancer Res.*, 13 (10): 2977-2985
- Graham D.G., Jeffs P.W. (1977):** The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 252: 5729-5734
- Gregório E.A., Ratcliffe N.A. (1991):** The prophenoloxidase system and in vitro interaction of *Trypanosoma rangeli* with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* haemolymph. *Parasite Immunol.*, 13: 551-564
- Grzych J.M., Dissous C., Capron M., Torres S., Lambert P.H., Capron A. (1987):** *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.*, 165: 865-878

- Guckert J.A., Lowery M.D., Solomon E.I. (1995):** Electronic structure of the reduced blue copper active site: Contributions to reduction potentials and geometry. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2817-2844
- Guss J. M., Harrowell P. R., Murata M., Norris V. A., Freeman H.C. (1986):** Crystal structure analyses of reduced (Cu^I) poplar plastocyanin at six pH values. *J. Mol. Biol.*, 192 (2): 361-387
- Guss J.M., Bartunik H.D., Freeman H.C. (1992):** Accuracy and precision in protein structure analysis: restrained least-squares refinement of the structure of poplar plastocyanin at 1.33 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 48B: 790-811
- Guo Y., Smith K., Lee J., Thiele D.J., Petris M.J. (2004):** Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J. Biol. Chem.*, 279: 17428-17433
- Guzmán-Casado M., Parody-Morreale A., Mateo P.L., Sánchez-Ruiz J.M. (1990):** Differential scanning calorimetry of lobster haemocyanin. *Eur. J. Biochem.*, 188 : 181-185
- Halaban R., Cheng E., Svedine S., Aron R., Hebert D. (2001):** Proper Folding and Endoplasmic Reticulum to Golgi Transport of Tyrosinase are induced by its Substrates, DOPA and Tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 276: 11933-11938
- Halaoui S., Asther M., Sigoillot J.C., Hamdi M., Lomascolo A. (2006):** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 219-232
- Hall M., Scott T., Sugumaran M., Söderhäll K., Law J.H. (1995):** Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 7764-7768
- Hamilton R., Walker B., Walker B.J. (1998):** Synthesis and proteinase inhibitory properties of diphenyl phosphonate analogues of aspartic and glutamic acids. *Bioorg. Medicin. Chem. Lett.*, 8:1655-1660
- Han J., Loehr T.M., Lu Y., Valentine J.S., Averill B.A., Sanders-Loehr J. (1993):** Resonance Raman Excitation Profiles Indicate Multiple Cys → Cu Charge Transfer Transitions in Type 1 Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 4256-4263
- Harford C., Sarkar B. (1997):** Amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal-binding, DNA cleavage, and other properties. *Acc. Chem. Res.*, 30: 123-130
- Harris E.D. (2003):** Basic and Clinical Aspects of Copper. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 40 (5): 547-586
- Harris J.R., Horne R.W. (1991):** Negative staining. In: Harris, J.R. (Ed.): *Electron Microscopy in Biology*. IRL Press, Oxford, UK: 203-228
- Harris J.R., Cejka Z., Wegener-Strake A., Gebauer W., Markl J. (1992):** Two-dimensional crystallization, transmission electron microscopy and image processing of Keyhole Limpet haemocyanin (KLH). *Micron and Microscopia Acta*, 23 (3): 287-301
- Harris J.R., Gebauer W., Söhngen S.M., Markl J. (1995):** Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): Purification of Intact KLH1 Through Selective Dissociation of KLH2. *Micron*, 26 (3): 201-212
- Harris J.R., Gebauer W., Guderin F.U., Markl J. (1997a):** Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), I: Reassociation from *Immucothel*[®] followed by Separation of KLH1 and KLH2. *Micron*, 28 (1): 31-41
- Harris J.R., Gebauer W., Söhngen S.M., Nermut M.V., Markl J. (1997b):** Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), II: Characteristic Reassociation Properties of Purified KLH1 and KLH2. *Micron*, 28 (1): 43-56
- Harris J.R., Gebauer W., Adrian M., Markl J. (1998):** Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): Slow *In Vitro* Reassociation of KLH1 and KLH2 from *Immucothel*[®]. *Micron*, 29 (5): 329-339
- Harris J.R., Markl J. (1999):** Keyhole Limpet hemocyanin (KLH): a Biomedical Review. *Micron*, 30: 597-623

- Harris J.R., Scheffler D., Gebauer W., Lehnert R., Markl J. (2000):** *Haliotis tuberculata* hemocyanin (HtH): analysis of oligomeric stability of HtH1 and HtH2, and comparison with keyhole limpet hemocyanin KLH1 and KLH2. *Micron*, 31(6): 613-622
- Harrison M.D., Jones C.E., Solioz M., Dameron C.T. (2000):** Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.*, 25 (1): 29-32
- Hart P.J., Nersissian A.M., Herrmann R.G., Nalbandyan R.M., Valentine J.S., Eisenberg D. (1996):** A missing link in cupredoxins: Crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution. *Protein Science*, 5: 2175-2183
- Hartley B.S. (1970):** Homologies in serine proteinases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 257B (813): 77-87
- Hartmann H., Bongers A., Decker H. (2001):** Small-angle neutron scattering reveals an oxygen-dependent conformational change of the immunogen keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1). *Eur. Biophys. J.*, 30: 471-475
- Hartmann H., Decker H. (2002):** All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4 x 6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation. *Biochim. Biophys. Acta*, 16, 1601(2): 132-137
- Hartmann H., Bongers A., Decker H. (2004a):** Small-angle X-ray Scattering-based Three-dimensional Reconstruction of the Immunogen KLH1 Reveals Different Oxygen-dependent Conformations. *J. Biol. Chem.*, 279 (4): 2841-2845
- Hartmann H., Müller T., Decker H. (2004b):** Modeling techniques for analysing conformational transitions in hemocyanins by small-angle scattering of X-rays and neutrons. *Micron*, 35: 11-13
- Haszprunar G. (1996):** The molluscan rhogocyte (pore-cell, Blasenzelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution. *J. Molluscan Stud.*, 62: 185-211
- Hazes B., Magnus K., Bonaventura C., Bonaventura J., Dauter Z., Kalk K., Hol W. (1993):** Crystal Structure of Deoxygenated *Limulus polyphemus* Subunit II Hemocyanin at 2.18 Å Resolution: Clues for a Mechanism for Allosteric Regulation. *Protein Sci.*, 2: 597-619
- Hemmingsen J.M., Gernert K.M., Richardson J.S., Richardson D.C. (1994):** The tyrosine corner: A feature of most Greek key β -barrel proteins. *Protein Science*, 3: 1927-1937
- Hémond C., Fürtös-Matei A., Waldron K.C. (2003):** A comparison between electrokinetic capillary chromatography and absorption spectroscopy for the analysis of peptide-micelle association by weak hydrophobic interactions. *Electrophoresis*, 24: 816-823
- Hernández-Romero D., Sanchez-Amat A., Solano F. (2006):** A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase / dopa oxidase ratio. Role of the seventh histidine and accessibility to the active site. *FEBS J.*, 273: 257-270
- Herscovitz H.B., Harold W.W., Stavitsky A.B. (1972):** Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. *Immunology*, 22: 51-61
- Herskovits T.T., Hamilton, M.G. (1991):** Higher order assemblies of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B: 19-34
- Herskovits T.T., Hamilton, M.G. (1992):** Physical studies of the hemocyanin of the marine gastropod, *Kelletia kelletii* (Forbes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B (2): 447-453
- Hill R.E., Shaw P.H., Boyd P.A., Baumann H., Hastie N.D. (1984):** Plasma protease inhibitors in mouse and man: divergence within the reactive centre regions. *Nature (London)*, 311: 175-177
- Hill R.E., Hastie N.E. (1987):** Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature (London)*, 326: 96-99

- Himmelwright R.S, Eickmann N.C, LuBien C.D, Solomon E.I, Lerch K. (1980):** Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 7339-7344
- Holm L. (1993):** Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, 233: 123-138
- Holtzhauer M. (1996):** Methoden der Proteinanalytik. In: Thermodynamische Untersuchungen an Proteinen. *Springer, Berlin*: 276 – 310
- Houmard J., Drapeau G.R. (1972):** Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69 (12): 3506-3509
- Houmard J. (1976):** Kinetic Investigation of the Staphylococcal Protease-Catalyzed Hydrolysis of Synthetic Substrates. *Eur. J. Biochem.*, 68: 621-627
- Hristova R., Dolashka P., Stoeva S., Voelter W., Salvato B., Genov N. (1997):** Spectroscopic properties and stability of hemocyanins. *Spectrochim. Acta*, 53A: 471-478
- Hristova R., Dolashki A., Voelter W. Stefanovic S., Dolashka-Angelova P. (2007):** *o*-Diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.*, Article in Press
- Hübler R., Fertl B., Hellmann N. Decker H. (1998):** On the stability of the 24-meric hemocyanin from *Eurypelma californicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383: 327-339
- Huffman D.L., O'Halloran T.V. (2001):** Function, Structure, and Mechanism of Intracellular Copper Trafficking Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 70: 677-701
- Hussain F., Sedlak E., Wittung-Stafshede P. (2007):** Role of Copper in folding and stability of cupredoxin-like copper-carrier protein CopC. *Arch. Biochem. Biophys.*, 467: 58-66
- Idakieva K., Parvanova K., Todinova S. (2005):** Differential scanning calorimetry of the irreversible denaturation of *Rapana thomasiana* (marine snail, Gastropod) hemocyanin. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1748: 50-56
- Idakieva K., Siddiqui N.I., Parvanova K., Nikolov P., Gielens C. (2006):** Fluorescence properties and conformational stability of the β -hemocyanin of *Helix pomatia*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1764: 807-814
- Ilan E., David M.M., Daniel E. (1981):** Erythrocrucorin from the crustacean *Caenestheria inopinata*. Quaternary structure and arrangement of subunits. *Biochem.*, 20 (21): 6190-6194
- Illingworth J. F. (1902):** The Anatomy of *Lucapina crenulata* Gray (ISBN-10: B0008CWHYM): 449-480
- Inoue T., Kai Y. , Shigeharu H., Kasai N., Oshiro Y., Suzuki S., Kohzuma T., Tobari J. (1994):** Refined crystal structure of pseudoazurin from *Methylobacterium extorquens* AM1 at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.* 50D (3): 317-328
- Ito S. (2003):** The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 16: 230-236
- Jackson I.J., Chambers D.M., Tsukamoto K., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Hearing V. (1992):** A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.*, 11 (2): 527-35
- Jaenicke E., Foll R., Decker H. (1999):** Spider Hemocyanin Binds Ecdysone and 20-OH-Ecdysone. *J. Biol. Chem.*, 274: 34267-34271
- Jaenicke E. (2002):** Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen. *Dissertation*. Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Jaenicke E., Decker H. (2003):** Tyrosinases from Crustaceans form Hexamers. *Biochem J.*, 371: 515-523
- Jaenicke E., Decker H. (2004a):** Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *Chem. Biochem.*, 5: 163-169

- Jaenicke E., Decker H. (2004b):** Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron* 35: 89-90
- Jara J.R., Aroca P., Solano F., Martinez J.H., Lozano J.A. (1988):** The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine and glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 967: 296-303
- Jiang J., Nadas I.A., Kim M.A., Franz K.J. (2005):** A Mets Motif Peptide Found in Copper Transport Proteins Selectively Binds Cu(I) with Methionine-Only Coordination. *Inorg. Chem.*, 44: 9787-9794
- Jiménez-Cervantes C., Solano F., Kobayashi T., Uraben K., Hearing V.J., Lozano J.A., Garcia-Borrón J.C. (1994):** A New Enzymatic Function in the Melanogenic Pathway The 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). *J. Biol. Chem.*, 269: 17993-18001
- Jiménez M., Garcia-Carmona F. (1996):** Kinetics of the Slow pH-Mediated Transition of Polyphenol Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 331 (1): 15-22
- Johansson M., Söderhäll K. (1996):** The Prophenoloxidase Activating System and Associated Proteins in Invertebrates. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 15 : 46-66
- Jolley R., Jr., Evans L., Makino N., Mason H. (1974):** Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 249 : 335-345
- Jurinic C.D., Engelmann U., Gasch J., Klippel K.F. (1988):** Immunotherapy in bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin: a randomized study. *J. Urol.*, 139: 723-726
- Jurinic C.D., Stöcker W., Markl J., Engelmann U., Gasch J., Klippel K.F. (1990):** Immunotherapy with Keyhole limpet haemocyanin (KLH) as prophylaxis against superficial bladder tumor recurrence. In *deKernion JB (ed): Immunotherapy of Urological Tumors. Edinburgh, Churchill Livingstone:* 139-143
- Jurincic-Winkler C.D, von der Kammer H., Beuth J., Scheit K.H., Klippel K.F. (1996):** Antibody response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) treatment in patients with superficial bladder carcinoma. *Anticancer Res.*, 16(4A): 2105-10
- Jurincic-Winkler C.D, Metz K.A, Beuth J., Klippel K.F. (2000):** Keyhole limpet hemocyanin for carcinoma in situ of the bladder: a long-term follow-up study. *Eur. Urol.*, 37 (3):45-49
- Kabsch W. (1993):** Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystall.*, 26: 795-800
- Kahn J.O., Stites D.P., Scillian J., Murcar N., Stryker R., Volberding P.A., Naylor P.H., Goldstein A.L., Sarin P.S., Simmon V.F. et al. (1992):** A phase I study of HGP-30, a 30 amino acid subunit of the human immunodeficiency virus (HIV) p17 synthetic peptide analogue sub-unit vaccine in seronegative subjects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8 (8):1321-1325
- Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. (1997):** Hemocyanins. In: Montreuil J., Vliegthart J.F.G., Schachter H. (Eds): *Glycoproteins. Elsevier Science, Amsterdam:* 123-142
- Kantelhardt S.R., Wuhrer M., Denis R.D., Doenhoff M.J., Bickle Q., Geyer R. (2002):** Fuc(α 1 \rightarrow 3)GalNAc: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity. *Biochem. J.*, 366: 217-223
- Keller H., Lieb B., Altenhein B., Gebauer D., Richter S., Stricker S., Markl J. (1999):** Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the ~ 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. *Eur. J. Biochem.*, 264: 27-38
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B. (1998):** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.*, 5: 1084-1090
- Klibanov A.M., Ahern T.J. (1987):** Thermal stability of proteins. In: Oxender, D.L., Fox C.F. (Eds.), *Protein Engineering, Liss A.R., New York:* 213-218

- Klippel K.F. (1991)** Weniger Blasenkrebs-Rezidive durch Hämocyanin. *Immuntherapie des Krebses*, 43 (7): 29-31
- Ko A.I., Harn D.A. (1987)**: Characterization of protective and non-protective surface membran carbohydrate epitopes of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*: 115-119
- Koay M., Zhang L., Yang B., Maher M.J., Xiao Z., Wedd A.G. (2005)**: CopC Protein from *Pseudomonas syringae*: Intermolecular Transfer of Copper from Both the Copper(I) and Copper(II) Sites. *Inorg. Chem.*, 44 (15): 5203-5205
- Kobayashi T., Urabe K., Winder A., Jiménez-Cervantes C., Imokawa G., Brewington T., Solano F., García-Borrón J.C., Hearing V.J. (1994)**: Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.*, 13: 5818-5825
- Kobayashi T., Vieira W.D., Potterf B., Sakai C., Imokawa G., Hearing V.J. (1995)**: Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to phaeomelanogenesis. *J. Cell. Sci.*, 108: 2301-2309
- Koch K.A., O Peña M.M. Thiele D.J. (1997)**: Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. & Biol.*, 4 (8): 549-560
- Konings W. N., Van Driel R., Van Bruggen E. F. J. , Gruber M. (1969)**: Structure and properties of hemocyanins. V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* Hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*, 194: 55-66
- Krøll J. (1973)**: Crossed-line immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.*, 2 (1): 57-59
- Kulkarni P.P., She Y.M., Smith S.D., Roberts E.A., Sarkar B. (2006)**: Proteomics of Metal Transport and Metal-Associated Diseases. *Chemistry*, 12 (9): 2410-2422
- Kurganov B.I., Lyubarev A.E., Sánchez-Ruiz J.M., Shnyrov V.L. (1997)**: Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.*, 65: 175-135
- Kurokawa T., Wuhrer M., Lochnit G., Geyer H., Markl J. (2002)**: Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(β1-6)Man-motifs. *Eur. J. Biochem.*, 269: 5459-5473
- Laemmli U.K. (1970)**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lamb A.L., Wernimont A.K., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (1999)**: Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat. Struct. Biol.*, 6 (8): 724-729
- Lamb A.L., Torres A.S., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (2001)**: Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat. Struct. Biol.*, 8 (9): 751-755
- Lamy J., Lamy J., Weill J. (1979a)**: Arthropod hemocyanin structure: isolation of eight subunits in the scorpion. *Arch. Biochem. Biophys.*, 193 (1): 1440-1449
- Lamy J., Lamy J., Weill J., Bonaventura J., Bonaventura C., Brenowitz M. (1979b)**: Immunological correlates between the multiple hemocyanin subunits of *Limulus polyphemus* and *Techypleus tridentatus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196 (2): 324-339
- Lamy J., Leclerc M., Sizaret P.-Y., Lamy J., Miller K.I., Mc Parland R., Van Holde K.E. (1987)**: *Octopus dofleini* hemocyanin: structure of the seven-domain polypeptide chain. *Biochem.*, 26: 3509-3518
- Lamy J., Gielens C., Lambert O., Taveau J.C., Motta G., Loncke P., De Geest N., Préaux G., Lamy J. (1993)**: Further Approaches to the Quaternary Structure of *Octopus* Hemocyanin: A Model Based on Immunoelectron Microscopy and Image Processing. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305(1): 17-29
- Lang W.H. (1988)**: cDNA cloning of the *Octopus dofleini* hemocyanin sequence of the carboxy-terminal domain. *Biochem.*, 27 (19): 7276-7282

- Lang W.H., Van Holde K.E. (1991):** Cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin cDNA: derived sequences of functional units Ode and Odf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88 (1): 244-248
- Lambert O., Boisset N., Penczek P., Lamy J., Taveau J.C., Frank J., Lamy J.N. (1994):** Quaternary structure of *Octopus vulgaris* hemocyanin. Three-dimensional reconstruction from frozen-hydrated specimens and intramolecular location of functional units Ove and Ovb. *J. Mol. Biol.*, 238 : 75-87
- Lambert O., Boisset N., Taveau J.C., Lamy J.N. (1995a):** Three-dimensional reconstruction of *Sepia officinalis* hemocyanin from frozen-hydrated specimens. *Arch. Biochim. Biophys.*, 316: 950-959
- Lambert O., Taveau J.C., Boisset N., Lamy J.N. (1995b):** Three-dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen-hydrated specimens. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 231-243
- Land E.J., Riley P.A. (2000):** Spontaneous Redox Reactions of Dopaquinone and the Balance between the Eumelanin and Pheomelanin Pathways. *Pigment Cell. Res.*, 13 : 273-277
- Land E.J., Ito S., Wakamatsu K., Riley P.A. (2003):** Rate Constants for the First Two Chemical Steps of Eumelanogenesis. *Pigment Cell. Res.*, 16: 487-493
- Laskowski M. Jr., Kato I. (1980):** Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 593-626
- Laskowski M. Jr., Kato I., Ardelt W., Cook J., Denton A., Empie, W., Kohr W.J., Park S.J., Parks K., Schatzley R.L., Schoenberger O.L., Tashiro M., Vichot G., Whatley H.E., Wiczorek A., Wiczorek M. (1987):** Ovomuroid third domains from 100 avian species: isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry*. 26: 202-221
- Laurell C.-B. (1965):** Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 10: 358
- Laveda F., Nunez-Delgado E., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. (2000):** Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 379 (1): 1-6
- Lee S.C., Russell A.F., Laiding W.D. (1990):** Three-dimensional structure of bradykinin in SDS micelles. Study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular mechanics and dynamics. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 35 (5): 367-377
- Lee S.Y., Lee B.L., Söderhäll K. (2003):** Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.*, 278: 7927-7933
- Lee S.Y., Lee B.L., Söderhäll K. (2004):** Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(2): 490-496
- Leidescher T., Decker H. (1990):** Conformational changes of tarantula (*Eurypelma californicum*) haemocyanin detected with a fluorescent probe, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Eur. J. Biochem.*, 187: 617-625
- Leonard C., Söderhäll K., Ratcliffe N.A. (1985):** Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.*, 15: 803-810
- Lepock J.R., Richie K.P., Kolios M.C., Rodahl A.M., Heinz K.A., Kruuv J. (1992):** Influence of transition rates and scan rate on kinetic simulations of differential scanning calorimetry profiles of reversible and irreversible protein denaturation. *Biochem.*, 31: 12706-12712
- Lerch K. (1983):** *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.*, 52(2):125-38
- Lerner A., Fitzpatrick T.B., Calkins E. & Summerson W.H (1949):** Mammalian tyrosinase: Preparation and properties. *J. Biol. Chem.*, 178 : 185-195
- Li C., Yanagisawa S., Martins B.M., Messerschmidt A., Banfield M.J., Dennison C. (2006):** Basic requirements for a metal-binding site in a protein: The influence of a loop shortening on the cupredoxin azurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (19): 7258-7263

- Lieb B., Altenhein B., Lehnert R., Gebauer W., Markl J. (1999):** Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. *Eur. J. Biochem.*, 265: 134-144
- Lieb B., Altenhein B., Markl J. (2000):** The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J. Biol. Chem.*, 275: 5675-5681
- Lieb B., Altenhein B., Markl J., Vincent A., van Olden E., van Holde K.E., Miller K.I. (2001):** Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 4546-4551
- Lieb B., Boisguerin V., Gebauer W., Markl J. (2004):** cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an ophistobranch gastropod. *J. Mol. Evol.*, 59: 1-10
- Lippard S.J. (1999):** Free copper ions in the cell? *Science*, 284 (5415): 748-749
- Livingston P.O., Ragupathi G. (2006):** Cancer vaccines targeting carbohydrate antigens. *Hum. Vaccin.*, 2 (3):137-43
- Loehr J.S., Freedman T.B., Loehr T.M. (1974):** Oxygen binding to hemocyanin: a resonance Raman spectroscopic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56 (2): 510-515
- Loewe R. (1978):** Hemocyanins in Spiders, V. Fluorimetric Recording of Oxygen Binding Curves, and its Application to the Analysis of Allosteric Interactions in *Eurypelma californicum* Hemocyanin. *J. Comp. Physiol.*, 128B : 161-168
- Lommerse J.P., Thomas-Oates J.E., Gielens C., Preaux G., Kamerling J.P., Vliegthart J.F. (1997):** Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from alphaD-hemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.*, 249: 195-222
- Loncke P., Vanderzande M., Gielens C., Preaux G. (1990):** Identification of the missing functional unit in *Octopus vulgaris* hemocyanin from a comparison with *Sepia officinalis* hemocyanin. In: Preaux G., Lontie R., (Eds.): Invertebrate Dioxygen Carriers. *Leuven University Press, Leuven*: 295-298
- Lontie R. (1983):** Components, functional units, and active sites of *Helix pomatia* hemocyanin. *Life Chem. Rep.*, Suppl. 1: 109-120
- Lu L., Lundahl P. (1996):** Quantitative micellar chromatographic analysis of interaction between peptides and sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Chromatography*, 741 (1) A: 49-57
- Lu Y., LaCroix L.B., Lowery M.D., Solomon E.I., Bender C.J., Peisach J., Roe J.A., Gralla E.B., Valentine J.S. (1993):** Construction of a "blue" copper site at the native zinc site of yeast copper-zinc superoxide dismutase. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 5907-5918
- Luk E., Jensen L.T., Culotta V.C. (2003):** The many highways for intracellular trafficking of metals. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8 (8): 803-809
- Lumry R., Eyring H. (1954):** Conformation changes of proteins. *J. Phys. Chem.*, 58: 110-120
- Lyubarev A.E., Kurganov B.I. (2000):** Analysis of DSC data relating to proteins undergoing irreversible thermal denaturation. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 62: 51-62
- MacColl R., Galivan J., Berns D. S., Zimec Z., Guard-Friar D., Wagoner D. (1990):** The chromophore and polypeptide composition of *Aplysia* ink. *Biol. Bull.*, 179: 326-331
- Mangum C.P., Lykkeboe G. (1979):** The influence of inorganic ions and pH on oxygenation properties of the blood in the gastropod mollusc *Busycon canaliculatum*. *J. Exp. Zool.*, 207: 417-430
- Mangum C.P. (1983):** Oxygen transport in the blood. In: Mantel L.H (Eds.): The biology of Crustacea. *Academic Press, New York*, 5: 373 – 429

- Magnus K., Hazes B., Ton-That H., Bonaventura C., Bonaventura J., Hol W. (1994):** Crystallographic Analysis of Oxygenated and Deoxygenated States of Arthropod Hemocyanin Shows Unusual Differences. *Proteins*, 19: 302-309
- Makino N. (1987):** The oxygenation-linked binding of neutral red to spiny lobster hemocyanin. A structural study of the partially oxygenated protein. *Eur. J. Biochem.*, 163(1): 35-41
- Markl J., Savel-Niemann A., Wegener-Strake A., Süling M., Schneider A., Gebauer W., Harris J.R. (1991a):** The role of two distinct subunit types of Keyhole Limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften*, 78: 512-514
- Markl J., Nour El Din M., Winter-Simanowski S., Simanowksi U.A., (1991b):** Specific IgG activity of sera from egyptian Schistosomiasis patients to Keyhole Limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften*, 78: 30-31
- Markl J., Decker H. (1992):** Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv. In Comp. & Envir. Physiol.*, 13: 325-376
- Markwardt F., Walsmann P., Richter M., Klöcking H.-P., Drawert J., Landmann H. (1971):** Aminoalkylbenzolsulfofluorides as ferment inhibitors. *Pharmazie*, 26: 401-404
- Markwardt F., Drawert J., Walsmann P. (1974):** Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein. *Biochem. Pharmacol.*, 23: 2247-2256
- Marmaras V.J., Charalambidis N.D., Zervas C.G. (1996):** Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 31:119-33
- Martin A.G., Depoix F., Stohr M., Meissner U., Hagner-Holler S., Hammouti K., Burmester T., Heyd J., Wriggers W., Markl J. (2006):** *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers. *J. Mol. Biol.*, 366(4):1332-50
- Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H., Inlow J.K. (2006):** Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.*, 100: 108-123
- Mason H.S. (1948):** The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 172: 83-99
- Mason H.S. (1956):** Structures and functions of phenolase complex. *Nature*, 177: 79-81
- Mason H.S. (1965):** Oxidases. *Annu. Rev. Biochem.*, 34: 595-634
- Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H., Sugiyama M. (2006):** Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* 281: 8981-8990
- Mayer A.M., Harel E. (1979)** Review: Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215
- McCoy A., Grosse-Kunstleve R.W., Storoni L.C., Read R.J. (2005):** Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystall.*, 61D: 458-464
- McRee D.E. (1999):** XtalView/Xfit – A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.*, 125: 165-165
- Meckel H. (2005):** Bioinformatische Untersuchungen an Phenoloxidasen und Hämocyaninen. *Diplomarbeit*. Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Meissner U., Dube P., Harris J.R., Stark H., Markl J. (2000):** Structure of a molluscan hemocyanin didecamer (HtH1 from *Haliothis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 298: 21-34

- Meissner U., Gatsogiannis C., Moeller A., Depoix F., Harris J.R., Markl J. (2007):** Comparative 11 Å structure of two molluscan hemocyanins from 3D cryo-electron microscopy. *Micron.*, 38(7):754-65
- Menze M.A., Hellmann N., Decker H., Grieshaber M.K. (2005):** Allosteric models for multimeric proteins: oxygen-linked effector binding in hemocyanin. *Biochem.*, 44 (30): 10328-10338
- Mikkelsen F.F., Weber R.E. (1992):** Oxygen transport and hemocyanin function in the pulmonate land snail, *Helix pomatia*: Physiological and molecular implications of polyphasic oxygen-binding curves. *Physiol. Zool.*, 65: 1057-1073
- Miller K.I., Van Holde K.E., Toumadje A., Johnson W.C.-Jr., Lamy J. (1988):** Structure and Function of the Carboxy-Terminal Oxygen-Binding Domain from the Subunit of *Octopus dofleini* Hemocyanin. *Biochem.*, 27: 7282-7288
- Miller K.I., Schabtach E., van Holde K.E., (1990):** Arrangement of subunits and domains within the *Octopus dofleini* hemocyanin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1496-1500
- Miller K.I., Cuff M.E., Van Holde K.E. (1998):** Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.*, 278 (4): 827-842
- Montefiori D.C., Zhou J.Y. (1991):** Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Res.*, 15 (1):11-25
- Moon J.L., Banbula A., Oleksy A., Mayo J.A., Travis J. (2001):** Isolation and Characterization of a Highly Specific Serine Endopeptidases from an Oral Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.*, 382: 1095-1099
- Moon J.-K., Keum Y.-S., Hwang E.-C., Park B.-S., Chang H.-R., Q. X. Li, Kim J.-H. (2007):** Hapten Syntheses and Antibody Generation for a New Herbicide, Metamifop. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 5416-5422
- Moore B., Flurky W. (1990):** Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.*, 265: 4982-4988
- Morioka C., Tachi Y., Suzuki S., Itoh S. (2006):** Significant Enhancement of Monooxygenase Activity of Oxygen Carrier Protein Hemocyanin by Urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 788-6789
- Mouche F., Boisset N., Lamy J., Zal F., Lamy J.N., (1999):** Structural comparison of cephalopod hemocyanins: Phylogenetic significance. *J. Struct. Biol.*, 127: 199-212
- Murdock G.R., Vogel S. (1978):** Hydrodynamic induction of water flow through a keyhole limpet (Gastropoda, Fissurellidae), *Comp. Biochem. Physiol.*, 61A: 227-231
- Murphy M.E.P., Moulton J., Bleackly R.C., Gershenfeld H., Weissman I.L., James M.N.G. (1988):** Comparative molecular model building of two serine proteinases from cytotoxic T lymphocytes. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 4: 190-204
- Musselli C., Livingston P.O., Ragupathi G. (2001):** Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 127 (Suppl. 2): R 20-26
- Nagai K., Yano M., Morimoto K., Miyamoto H. (2007):** Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146B: 207-214
- Nagai T., Kawabata S. (2000):** A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.*, 275: 29264-29267
- Nagai T., Osaki T., Kawabata S. (2001):** Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.*, 276: 27166-27170
- Naish-Byfield S., Riley P.A. (1992):** Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.*, 288: 63-67

- Nakahara A., Suzuki S., Kino J. (1983):** Tyrosinase Activity of Squid Hemocyanin. *Life Sci. Rep.*, Suppl. 1: 319-322
- Naraoka T., Uchisawa H., Mori H., Matsue H., Chiba S., Kimura A. (2003):** Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusc *Illex argentinus*. *Eur. J. Biochem.*, 270: 4026-4038
- Nellaiappan K., Kalyani R. (1989):** Mantle phenoloxidase activity and its role in sclerotization in a snail *Achatina fulica*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 97 (1): 45-51
- Nellaiappan K., Vinayakam A. (1993):** A Method for Demonstrating Prophenoloxidase after Electrophoresis. *Biotechnic and Histochemistry*, 68: 193-195
- Nellaiappan K., Sugumaran M. (1996):** On the Presence of Phenoloxidase in the Hemolymph of the Horseshoe Crab, *Limulus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 163-169
- Nillius D. (2007):** Aktivierung von Hämocyanin zur Tyrosinase. *Dissertation*. Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Nienaber V.L., Breddam K., Birktoft J.J. (1993):** A glutamic acid specific serine protease utilizes a novel histidine triad in substrate binding. *Biochem.*, 32: 11469-11475
- Nojiri M., Xie Y., Inoue T., Yamamoto T., Matsumura H., Kataoka K., Deligeer, Yamaguchi K., Kai Y., Suzuki S. (2007):** Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (11):4315-4320
- O'Halloran T.V., Culotta V.C. (2000):** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.*, 275 (33): 25057-25060
- Okuda K., Kaneko T., Yamakawa T., Tanaka S., Hamajima K., Shigematsu T., Yamamoto A., Kawamoto S. (1993):** Strong synergistic effects of multicomponent vaccine for human immuno-deficiency virus infection. *J. Clin. Immunol.*, 40 (3): 97-113
- Olianas A., Sanjust E., Pellegrini M., Rescigno A. (2005):** Tyrosinase activity and hemocyanin in the hemolymph of the slipper lobster *Scyllarides latus*. *J. Comp. Physiol.*, 175B: 405-411
- Olianas A., Sanna M.T., Messana I., Castagnola M., Masia D., Manconi B., Cau A., Giardina B., Pellegrini M. (2006):** The hemocyanin of the shamefaced crab *Calappa granulata*: structural-functional characterization. *J. Biochem.*, 139(6): 957-66
- Olsson, C.A., Chute R., Rao, C.N. (1974):** Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J. Urol.*, 111: 173-176
- Orlova E.V., Dube P., Harris J.R., Beckman E., Zemlin F., Markl J., Van Heel M. (1997).** Structure of Keyhole Limpet Hemocyanin Type 1 (KLH1) at 15 Å Resolution by Electron Cryomicroscopy and Angular Reconstitution. *J. Mol. Biol.*, 271: 417-437
- Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Ishiguru I. (1997):** Chemical characterization of phaeo-melanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336: 539-548
- Palumbo A., Misuraca G., D'Ischia M., Prota G. (1985):** Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.*, 228 (3): 647-51
- Parvanova K., Idakieva K., Stoeva S., Genov N., Voelter W. (2000):** Fluorescence properties and stability of dioxygen-binding functional units from the *Rapana thomasiana* hemocyanin subunit RHSS2. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 56 (3): 615-22
- Parvanova K., Idakieva K., Todinova S., Genov N. (2003):** C-terminal functional unit of *Rapana thomasiana* (marine snail, gastropod) hemocyanin isoform RtH1: isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1651 (1-2): 153-62

- Paul R., Pfeffer-Seidl A., Efinger R., Pörtner H., Storz H. (1994):** Gas Transport in the Haemolymph of Arachnids - Carbon Dioxide Transport and Acid-Base Balance. *J. Exp. Biol.*, 188: 47-63
- Pawelek J.M. (1991):** After dopachrome? *Pigment Cell Res.*, 4 (2): 53-62
- Peña M.M.O., Lee J., Thiele D.J. (1999):** A delicate balance. Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*, 129: 1251-1260
- Perbandt M., Guthohrlein E.W., Rypniewski W., Idakieva K., Stoeva S., Voelter W., Genov N., Betzel C. (2003):** The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry.*, 42: 6341-6346
- Peterson C.W., Narula S.S., Armitage I.M. (1996):** 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.*, 379: 85-93
- Petratos K., Dauter Z., Wilson K.S. (1988):** Refinement of the structure of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 at 1.55 Å resolution. *Acta Cryst.*, 44B: 628-636
- Pifferi P.G., Baldassari L. (1973):** A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone. *Anal. Biochem.*, 52 (2): 325-35
- Pless D., Aguilar M., Falcón A., Álvarez E., Heimer de la Cotera E. (2003):** Latent Phenoloxidase Activity and N-Terminal Amino Acid Sequence of Hemocyanin from *athynomus giganteus*, a Primitive Crustacean. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409: 402-410
- Prasad L., Leduc Y., Hayakawa K., Delbaere T.J. (2003):** The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallograph.*, 60D: 256-259
- Préaux G., Gielens C. (1984):** Hemocyanins. In: Lontie R. (Ed.): Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. II. *CRC Press. Boca Raton, FL*: 159-205
- Prota G. (2000):** Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res.*, 13: 283-293
- Puig S., Lee J., Lau M., Thiele D.J. (2002a):** Biochemical and Genetic Analyses of Yeast and Human High Affinity Copper Transporters Suggest a Conserved Mechanism for Copper Uptake. *J. Biol. Chem.*, 277 (29): 26021-26030
- Puig S., Rees E.M., Thiele D.J. (2002b):** The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure*, 10 (10): 1292-1295
- Puig S., Thiele D.J. (2002):** Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6 (2): 171-180
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. (1999):** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284 (5415): 805-808
- Ragupathi G., Cappello S., Yi S.S., Canter D., Spassova M., Bornmann W.G., Danishefsky S.J., Livingston P.O. (2002):** Comparison of antibody titers after immunization with monovalent or tetravalent KLH conjugate vaccines. *Vaccine.*, 20 (7-8): 1030-1038
- Ragupathi G., Koide F., Sathyan N., Kagan E., Spassova M., Bornmann W., Gregor P, Reis C.A., Clausen H., Danishefsky S.J., Livingston P.O. (2003):** A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent KLH-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunol. Immunother.*, 52 (10): 608-616
- Raper H.S. (1928):** The Aerobic Oxidases. *Physiol. Rev.*, 8: 245-282
- Rescigno A., Sollai F., Pisu B., Rinaldi A., Sanjust E. (2002):** Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 17 (4): 207-218

- Ricchelli F., Filippi B., Salvato B. (1981):** In: Lamy J., Lamy J. (Eds.): Invertebrate Oxygen-binding Proteins. *Marcel Dekker, Inc. New York und Basel*: 31-39
- Ricchelli F., Beltramini M., Flamigni L., Salvato B. (1987):** Emission quenching mechanisms in *octopus vulgaris* hemocyanin: steady state and time-resolved fluorescence studies. *Biochem.*, 26: 6933-6939
- Riggs D.R., Jackson B., Vona-Davis L., McFadden D. (2002):** *In vitro* Anticancer Effects of a Novel Immunostimulant: Keyhole Limpet Hemocyanin. *J. Surg. Res.*, 108 (2): 279-84
- Riggs D.R., Jackson B.J., Vona-Davis L., Nigam A., McFadden D.W. (2005):** *In vitro* effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regards to cell growth, cytokine production, and apoptosis. *Am. J. Surg.*, 89 (6): 680-684
- Riley P.A. (1997):** Melanin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29: 1235-1239
- Riley P.A. (1999):** The great DOPA mystery: the source and significance of DOPA in phase I melanogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45 (7): 951-960
- Riley P.A. (2003):** Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res.*, 16 (5): 548-552
- Rimke T., Decker H. (1997):** The Respiratory Protein Hemocyanin of Tarantula shows Phenoloxidase/Tyrosinase Activity. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 90: 66
- Rodríguez-López J.N., Tudela J., Varón R., García-Carmona F., García-Cánovas F. (1992a):** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 267 (6): 3801-3810
- Rodríguez-López J.N., Banón-Arno M., Martínez-Ortiz F., Tudela J., Acosta M., Varón R., García-Cánovas F. (1992b):** Catalytic oxidation of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine by tyrosinase: identification and evolution of intermediates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160 (2): 221-228
- Rodríguez-López J.N., Escribano J., García-Cánovas F. (1994):** A Continuous Spectrophotometric Method for the Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase Using 3-Methyl-2-benzothiazoline Hydrazone. *Anal. Biochem.*, 216: 205-212
- Ros J.R., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F. (1993):** Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1163 (3): 303-308
- Rosenzweig A.C. (2001):** Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc. Chem. Res.*, 34 (2): 119-128
- Salvato B., Jori G., Piazzese A., Ghiretti F., Beltramini M., Lerch K. (1983):** Enzymatic Activities of Type 3 Copper Pair in *Octopus vulgaris* Haemocyanin. *Life Chem. Rep.*, Suppl. 1: 313-317
- Salvato B., Beltramini M. (1990):** Hemocyanins: Molecular architecture, structure and activity of the binuclear copper active site. *Life Chem. Rep.*, 8: 1-47
- Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G., Casella L. (1998):** The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry*, 37 (40): 14065-14077
- Salzbrunn K.U. (2007):** Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*. *Dissertation*. Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Sánchez-Ferrer Á., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F., García-Carmona F. (1995)** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1): 1-11
- Sánchez-Ruiz J.M., López-Lacomba J.L., Cortijo M., Mateo P.L. (1988):** Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry*, 27 (5): 1648-1652
- Sander C., Schneider R., (1991):** Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 9: 56-68
- Sargent E.R., Williams R.D. (1992):** Immunotherapeutic alternatives in superficial bladder cancer. Interferon, interleukin-2, and keyhole-limpet hemocyanin. *Urol. Clin. North. Am.*, 19 (3): 581-590

- Savel-Niemann A., Wegener-Strake A., Markl J. (1990):** Keyhole Limpet hemocyanin: On the structure of a widely used immunological tool. In: Preaux G., Lontie R. (Eds.): Invertebrate dioxygen carriers. *Univ. of Leuven Press, Louvain, Belgium*: 351-356
- Schartau W., Leidescher T. (1983):** Composition of the Hemolymph of the Tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Comp. Physiol.*, 152: 73-77
- Schütz J. (2000):** Isolierung, Sequenzierung und Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften von strukturellen Untereinheiten und funktionellen Einheiten verschiedener Arthropoden- und Mollusken-hämocyanine. *Dissertation*. Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Schütz J., Dolashka-Angelova P., Abrashev R., Nicolov P., Voelter W. (2001):** Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1546 (2): 325-36
- Schweikardt T., Olivares C., Solano F., Jaenicke E., García-Borrón J.C., Decker H. (2007):** A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Res.*, 20 (5): 394-401
- Senozan N.M., Landrum J., Bonaventura J., Bonaventura C. (1981):** Hemocyanin of the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*. In: Lamy, J., Lamy, J. (Eds.): Invertebrate Oxygen-binding Proteins. *Dekker, New York*: 703-717
- Senozan N.M., Briggs M. (1989):** Hemocyanin Levels in the Giant Keyhole Limpet, *Megathura crenulata*, from the Coast of California. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94A (2): 195-199
- Siddiqui N., Preaux G., Gielens C. (2004):** Intrinsic and Induced *o*-Diphenoloxidase Activity of beta-Hemocyanin of *Helix pomatia*. *Micron*, 35: 91-92
- Siddiqui N., Akosung R., Gielens C. (2006):** Location of Intrinsic and Inducible Phenoloxidase Activity in Molluscan Hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348: 1138-1144
- Sidibe S., Saal F., Rhodes-Feetilette A., Lagaye S., Pelicans L., Canivet M., Paries J., Dianoux, L. (1996):** Effects of serstonin and melanin on in vitro HIV-1 infection. *J. Biol. Regul. Hemeost. Agents*, 10 (1): 19-24
- Siezen R.J., Van Bruggen E.F. (1974):** Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin: quaternary structure. *J. Mol. Biol.*, 90: 77-89
- Silver S., Phung L.T. (1996):** Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 753-789
- Simkiss K., Mason A.Z. (1983):** Metal ions. Metabolic and toxic effects. In: Hochachka P.W. (Ed.): The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology. *Academic, Vol. 2, New York*: pp 102-164
- Smith V.J., Söderhäll K. (1991):** A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.*, 15: 251-261
- Söderhäll K., Häll L. (1984):** Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta*, 797: 99-104
- Söderhäll K. (1992):** Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.*, 59: 141-151
- Söderhäll K., Cerenius L. (1998):** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 23-28
- Söhngen S.M., Stahlmann A., Harris J.R., Muller S.A., Engel A., Markl J. (1997):** Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Eur. J. Biochem.*, 248: 602-614
- Solomon E.I., Baldwin M.J., Lowery M.D. (1992):** Electronic Structures of Active Sites in Cooper Proteins: Contributions to Reactivity. *Chem. Rev.*, 92: 521-542

- Solomon E.I., Lowery M.D. (1993):** Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 259: 1575-1581
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996):** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, 96: 2563-2606
- Sørensen S.B., Sørensen T.L., Breddam K. (1991):** Fragmentation of proteins by *S. aureus* strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid. *Fed. Europ. Biochem. Soc.*, 294 (3): 195-197
- Spinozzi F., Gatto S., De Filippis V., Carsughi F., Di Muro P., Beltramini M. (2005):** Contribution of the copper ions in the dinuclear active site to the stability of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 439 (1): 42-52
- Spritz R.A., Ho L., Furumura M., Hearing V.J., Jr. (1997):** Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.*, 109 (2): 207-212
- Sritunyalucksana K., Söderhäll K. (2000):** The proPO and Clotting System in Crustaceans. *Aquaculture*, 191: 53-69
- Sterner R. (1991):** Allosterie bei Arthropoden-Hämocyaninen: Analyse der Bindung von Sauerstoff und Protonen sowie Nachweis von Konformationsübergängen. *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Sterner R., Bardehle K., Paul R., Decker H. (1994):** Tris: An Allosteric Effector of Tarantula Haemocyanin. *FEBS Lett.*, 339: 37-39
- Sterner R., Vogl T., Hinz H.J., Penz F., Hoff R., Föll R., Decker H. (1995):** Extreme thermostability of tarantula hemocyanin. *FEBS Lett.*, 364 (1): 9-12
- Stoeva S., Schütz J., Gebauer W., Hundsdorfer T., Manz C., Markl J., Voelter W. (1999):** Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochim. Biophys. Acta*, 1435: 94-109
- Stoeva S., Idakieva K., Betzel C., Genov N., Voelter W. (2002):** Amino acid sequence and glycosylation of functional unit Rth2-e from *Rapana thomasiana* (gastropod) hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 399: 149-158
- Strothkamp K.G., Jolley R.L., Mason H.S. (1976):** The quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 70: 519-524
- Stryer L. (1978):** Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.*, 47: 819-846
- Sugumaran M., Hennigan B., O'Brian J. (1987):** Tyrosinase Catalyzed Protein Polymerization as an *in vitro* Model for Quinon Tanning of Insect Cuticle. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 6: 9-25
- Sugumaran M. (1991):** Molecular mechanisms of mammalian melanogenesis: comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.*, 293: 4-10
- Sugumaran M., Nellaippan K. (1991):** Lysoeithin – a potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 1371-1376
- Sugumaran M., Semensi V. (1991):** Quinone Methide as A New Intermediate in Eumelanin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 266 (10): 6073-6078
- Sugumaran M., Kanost M. (1993):** Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. In: Beckage N., Thompson S., Frederick B. (Eds.): Parasites and pathogens. *Academic press, San Diego*: 317-342.
- Sugumaran M. (1996):** Role of Insect Cuticle in Immunity. In: Söderhäll K., Iwanaga S., Vastha G.: New Directions in Invertebrate Immunity. *SOS Publications, Fair Haven*

- Sugumaran M. (1998):** Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect. Physiol.*, 27: 229-334
- Sugumaran M. (2002):** Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenol-oxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.*, 15 (1): 2-9
- Swanson M.A., Schwartz R.S. (1967):** Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence. *N. Engl. J. Med.*, 277 (4): 163-170
- Swerdlow R.D., Ebert R.F., Lee P., Bonaventura C., Miller K.I. (1996):** Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 537-548
- Teale F.W. (1960):** The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.*, 76: 381-388
- Tepper A.W., Bubacco L., Canters G.W. (2002):** Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by halide ions. *J. Biol. Chem.*, 277 (34): 30436-30444
- Tepper A.W. (2005):** Structure and Mechanism of the Type-3 Copper Protein Tyrosinase. *Dissertation*. Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen en die der Geneeskunde, Universiteit Leiden, Nederland
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C., Meyhofer E., Morse M.P. (1988):** Bivalve hemocyanins -- a comparison with other molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 89 (1): 189-195
- Terwilliger T. (2004):** Using prime-and-switch phasing to reduce model bias in molecular replacement. *Acta Crystall.*, 60D: 2144-2149
- Terwilliger N., Ryan M. (2006):** Functional and Phylogenetic Analyses of Phenoloxidases from Brachyuran (*Cancer magister*) and Branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) Crustaceans. *Biol. Bull.*, 210: 38-50
- Topham R., Tesh S., Westcott A., Cole G., Mercatante D., Kaufman G., Bonaventura C. (1998):** Active-Site Disruption in Native *Limulus* Hemocyanin and Its Subunits by Disulfide-Bond Reductants: A Chemical Probe for the Study of Structure-Function Relationships in the Hemocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 352 (1): 103-113
- Topham R., Tesh S., Westcott A., Cole G., Mercatante D., Kaufman G., Bonaventura C. (1999):** Disulfide Bond Reduction: A Powerful, Chemical Probe for the study of Structure-Function Relationships in the Hemocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369 (2): 261-266
- Tsukamoto K., Jackson I.J., Urabe K., Montague P.M., Hearing V.J. (1992):** A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPochrome tautomerase. *EMBO J.*, 11 (2): 519-526
- Uglow R.F. (1969a):** Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. I. Studies on adult *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30: 1083-1090
- Uglow R.F. (1969b):** Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. II. The effect of imposed feeding on *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 31: 957-967
- Van Gastel M., Bubacco L., Groenen E.J., Vijgenboom E., Canters G.W. (2000):** EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Lett.*, 474 (2-3): 228-232
- Van Gelder C.W.G., Flurkey W.H., Wichers H.J. (1997):** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochem.*, 45: 1309-1323
- Van Holde K.E., Miller K.I. (1985):** Association-dissociation equilibria of *Octopus* hemocyanin. *Biochem.*, 24: 4577-4582
- Van Holde K.E., Miller K.I., Lang W.H. (1992):** Molluscan hemocyanins: structure and function. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 13: 257-300

- Van Holde K.E., Miller K.I. (1995):** Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.*, 47: 1-81
- Van Holde K.E., Miller K.I., Decker H. (2001):** Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.*, 276: 15563-15566
- Van Kuik J.A., Van Halbeek H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. (1985):** Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin. Xylose as a constituent of N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 260: 13984-13988
- Van Kuik J.A., Sijbesma R.P., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., Wood E.J. (1986):** Primary structure of a low-molecular-mass N-linked oligosaccharide from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-mannose as a constituent of the xylose-containing core structure in an animal glyco-protein. *Eur. J. Biochem.*, 160: 621-625
- Van Kuik J.A., Kamerling J.P., Vliegthart J. F. G. (1990):** Carbohydrate analysis of hemocyanins. In: Preaux G., Lontie R. (Eds.): Invertebrate Oxygen Carriers. *Leuven University Press, Leuven*: 157-163
- Vanneste W.H., Zuberbühler A. (1974):** In: Nayaishi O. (Ed.) Molecular mechanism of oxygen activation. *Academic Press, New York*: 371-402
- Vannoppen-Ver Eeckee, Th., Lontie R. (1973):** The effect of alkaline earth ions on the co-operativity of the oxygenation of *Helix pomatia* haemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, 945-954
- Volbeda A., Hol W.G. (1989):** Crystal structure of hexameric hemocyanin from *Panulirus interruptus* at 3,2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 209 (2): 249-279
- Walsmann P., Richter M., Markwardt F. (1972):** Inactivation of trypsin and thrombin by 4-amidino-benzolsulfofluoride and 4-(2-aminoethyl)-benzolsulfofluoride. *Acta biol. Med. germ.*, 28: 577
- Walter R.L., Ealick S.E., Friedman A. M., Blake R.C., Proctor P., Shoham M. (1996):** Multiple Wavelength Anomalous Diffraction (MAD) Crystal Structure of Rusticyanin: a Highly Oxidizing Cupredoxin with Extreme Acid Stability. *J. Mol. Biol.*, 263 (5): 730-751
- Wang W., Ballatori N. (1998):** Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.*, 50 (3): 335-356
- Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.-K. (1989):** How do serine proteases really work? *Biochem.*, 28: 3629-3637
- Waterhous D.V., Johnson W.C. Jr. (1994):** Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochem.*, 33 (8): 2121-2128
- Weber K., Osborn M. (1969):** The reliability of molecular weight determination by SDS gelelectrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412
- Weeke B. (1973):** Crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.*, 2 (1): 47-59
- Weigle W.O. (1964):** Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochem.*, 1: 295-302
- Wells R.M.G., Baldwin J., Speed S.R., Weber R.E. (1998):** Haemocyanin function in the New Zealand abalones *Haliotis iris* and *H. australis*: relationship between oxygen-binding properties, muscle metabolism and habitat. *Mar. Freshwater Res.*, 49: 143-149
- Wichertjes T., Gielens C., Schutter W.G., Preaux G., Lontie R., Van Bruggen E.F.J. (1986):** The quaternary structure of *Sepia officinalis* haemocyanin. *Biochem. Biophys. Acta*, 872: 183-194
- Wilcox D.E., Porras A.G., Hwang Y.T., Lerch K., Winkler M.E., Solomon E.I. (1985):** Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, 107: 4015-4027
- Winder A.J., Harris H. (1991):** New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.*, 198: 317-326

- Winder A. (1994):** A Stopped Spectrophotometric Assay for the Dopa Oxidase Activity of Tyrosinase. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 28: 173-183
- Winter R., Noll F. (1998):** Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner-Studienbücher: Chemie. Teubner, Stuttgart*
- Wirguin I., Suturkova-Milosevic L., Briani C., Latov N. (1995):** Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(β 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol. Immunother.*, 40 (5): 307-310
- Woolley G.A., Deber C.M. (1987):** Peptides in membranes: lipid-induced secondary structure of substance P. *Biopolymers*, 26: Suppl. S109-S121
- Wootton E.C., Pipe R.K. (2003):** Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish Shellfish Immunol.*, 15 (3): 249-262
- Wuhrer M., Dennis R.D., Doenhoff M.J., Bickle Q., Lochnit G., Geyer R. (1999):** Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Mol. Biochem. Para.*, 103: 155-169
- Wuhrer M., Dennis R.D., Doenhoff M.J., Geyer R. (2000):** A fucose-containing epitope is shared by keyhole limpet haemocyanin and *Schistosoma mansoni* glycosphingolipids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 110 (2): 237-246
- Wuhrer M., Robijn M.L.M., Koeleman C.A.M., Balog C.I.A., Geyer R., Deelder A.M., Hokke C.H. (2004):** A novel Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)-core modification attached to the proximal *N*-acetyl-glucosamine of keyhole limpet hemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem. J.*, 378 (2): 625-632
- Wuttke D.S., Gray H.B. (1993):** Protein engineering as a tool for understanding electron transfer. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 555-563
- Yamaguchi K., Kobayashi M., Kataoka K., Suzuki S. (2003):** Characterization of two Cu-containing protein fragments obtained by limited proteolysis of *Hyphomicrobium denitrificans* A3151 nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300 (1): 36-40
- Yamaguchi K., Kataoka K., Kobayashi M., Itoh K., Fukui A., Suzuki S. (2004):** Characterization of Two Type 1 Cu Sites of *Hyphomicrobium denitrificans* Nitrite Reductase: A New Class of Copper-Containing Nitrite Reductases. *Biochem.*, 43: 14180-14188
- Young J.K., Graham W.H., Beard D.J., Hicks R.P. (1992):** The Use of UV-Visible Spectroscopy for the Determination of Hydrophobic Interactions Between Neuropeptides and Membrane Model Systems. *Biopolymers*, 32: 1061-1064
- Yuan S.M., Clarke N.D. (1998):** A hybrid sequence approach to the paracelsus challenge. *Proteins*, 30 (2): 136-143
- Zatta P. (1984):** Zinc transport in the haemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *J. mar. Biol. Ass. UK*, 64: 801-807
- Zhang L., Koay M., Maher M.J., Xiao Z., Wedd A.G. (2006):** Intermolecular Transfer of Copper Ions from the CopC Protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal Structures of Fully Loaded Cu^ICu^{II} Forms. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 5834-5850
- Zhong L., Johnson W.C. Jr. (1992):** Environment affects amino acid preference for secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(10): 4462-4465
- Zlateva T., Di Muro P., Salvato B., Beltramini M. (1996):** The *o*-Diphenol Oxidase Activity of Arthropod Hemocyanin. *FEBS Lett.*, 384: 251-254

I Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei...

...Herrn Prof. Dr. [REDACTED] und Herrn Prof. Dr. [REDACTED] für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Vielen Dank auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Betreuung zahlreicher Studenten, so dass ich einen Einblick in die Lehrtätigkeit bekommen konnte.

...Herrn Prof. Dr. [REDACTED] für die Zweitkorrektur meiner Arbeit.

...Jun.-Prof. Dr. [REDACTED], HD Dr. [REDACTED] und Dr. [REDACTED] für die fachkundige Betreuung meiner Arbeit und die hervorragende Zusammenarbeit. Außerdem danke für das stets offene Ohr bei alltäglichen Labor-Problemen.

...Herrn Prof. Dr. [REDACTED] und Herrn Dr. habil. [REDACTED] für die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Antigenspezifische Immuntherapie“.

...der gesamten AG [REDACTED] und AG [REDACTED] für die freundliche Aufnahme, das hervorragende Arbeitsklima und die zahlreichen, unvergessenen Promotions-, Weihnachts-, Geburtstags- und Grillpartys. Unvergessen auch die unschlagbaren Kegel- und Minigolf-Turniere.

Ein besonderer Dank gilt den Zimmerkollegen beider Institute, [REDACTED] für die zahlreichen und sehr unterhaltsamen Gespräche der letzten drei Jahre.

...Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED], und [REDACTED] für die zahlreichen gemeinsamen „Sitzungen“ bezüglich Tabellenkalkulationen, Formatierungen und mathematischen Berechnungen.

...Herrn Prof. Dr. [REDACTED] und Dr. [REDACTED] für die Unterstützung und Beratung zur Vermeidung des „Proteasenproblems“.

...der AG Prof. Dr. [REDACTED] und Dr. [REDACTED] vom MPI für Medizinische Forschung in Heidelberg für die Röntgenstrukturanalyse.

...[REDACTED] für die weiterführende Auswertung der Röntgenstrukturdaten und der Bereitstellung zahlreicher Cryo-EM-Bilder.

...dem *Hauptman Woodward Medical Research Institute* in Buffalo, USA für die Möglichkeit, zahlreiche Kristallisationsbedingungen in kurzer Zeit mit Erfolg austesten zu lassen.

...der Firma Biosyn Arzneimittel GmbH in Fellbach für die Bereitstellung des Hämocyanins der Schnecke *Megathura crenulata*.

Ein ganz besonderer Dank gilt...

...meinen Eltern und Angehörigen, die mir immer den nötigen Rückhalt gegeben und mich in den ganzen Jahren tatkräftig unterstützt haben.

...meiner Mutter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

...meiner Freundin [REDACTED] für die langjährige Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Danke, dass es dich gibt!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz niedergelegt sind, eingehalten.

.....

Ort, Datum

Unterschrift

