

**Isolierung, Sequenzierung und Untersuchung
physikalisch-chemischer Eigenschaften
von strukturellen Untereinheiten und
funktionellen Einheiten verschiedener
Arthropoden- und Molluskenhämocyanine**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Jürgen Schütz

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Juli 2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

Erstberichter:

Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter

Zweitberichter:

Prof. Dr. U. Weber

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. Wolfgang Voelter in der Zeit von November 1995 bis März 2000 an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Institutes der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Wolfgang Voelter danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Stellung des interessanten Themas und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl, Zoologisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, danke ich für die entgegenkommende Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Funktionellen Einheit KLH2-c. Frau Heide Storz danke ich herzlich für die Isolierung und die immer zeitgerechte Lieferung des Ausgangsmaterials.

Herrn Prof. Dr. Benedetto Salvato, Università degli Studi di Padova (Italien), danke ich sehr herzlich für die Überlassung der Hämocyanine von *Homarus americanus* und *Maja squinado*. Ihm, sowie Herrn Prof. Dr. Mariano Beltramini und Herrn Dr. Paolo DiMuro danke ich außerdem für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die richtungsweisenden Diskussionen über Proteinchemie und die gastfreundliche Aufnahme während meiner Aufenthalte in Padova. Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern dieses Arbeitskreises für die stets freundliche Arbeitsatmosphäre.

Den Mitarbeitern der Firma BioSyn, Fellbach, besonders Herrn Dr. Kottwitz und Herrn Dr. Bauer, gilt mein Dank für die Bereitstellung von Hämocyaninproben und die kollegiale Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. Stanka Stoeva bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit, ihr stetes Interesse und die fruchtbaren Diskussionen.

Meiner Kollegin Dr. Montserrat Huguet-Soler danke ich für die gute Zusammenarbeit im gemeinsamen Labor und für die ersten Einweisungen auf dem Gebiet der Proteinsequenzierung und der MALDI-Massenspektrometrie.

Meinen Kolleginnen und Kollegen, besonders Dr. Hartmut Echner, Dr. Afroditi Kapurniotu, Dr. Thomas Kaiser, Dr. Hans-Jürgen Kohlbau, Dr. Mark Meisenbach, Dipl.-Chem. (FH) Miriam Schick, Dr. René Thürmer, Dipl.-Chem. Roland Wacker und allen Auszubildenden, sowie Dipl.-Chem. Marc Rawer von der Arbeitsgruppe Duszenko danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Dipl.-Chem. (FH) Miriam Schick danke ich außerdem ganz herzlich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. Rakez Kayed danke ich für die vielen Hilfestellungen bei den CD-Experimenten und der Umsetzung der Ergebnisse auf dem PC.

Bei Frau Hella Engelfried und Herrn Dr. Wieland Stock bedanke ich mich sehr herzlich für viele interessante und motivierende Diskussionen und ihrem steten Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. Hans-Jürgen Hartmann (AK Prof. Weser) danke ich für die Einweisung und die Bereitstellung von Meßzeiten am Fluoreszenzspektrometer.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber und Herrn Dr. Hubert Kalbacher, sowie Frau Karin Steiger bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen des Chemischen Praktikum für Mediziner und Zahnmediziner.

Frau Brigitte Schäfer, Frau Karin Stein, Herrn Egon Theurer, Herrn Erwin Kunz, Herrn Horst Kannwischer und den Mitarbeitern der Werkstatt, Herrn Herrmann Liggesmeyer sowie Herrn Willi Haug danke ich für das gute Arbeitsklima und für viele kleine Handreichungen, die mir die Arbeit und meine sonstigen Aufgaben sehr erleichtert haben.

Ebenso danke ich allen hier namentlich nicht genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Physiologisch-chemischen Institut für die stets freundliche Atmosphäre.

Herrn Klaus-Peter Hohnsbeen (Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Tübingen) danke ich für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung von Rechenzeiten zur Erstellung der CF- und GOR-Plots.

Herrn Dr. Heinz Schwarz (Max-Planck-Institut, Tübingen) danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des *Homarus americanus*-Hämocyanins und für interessante Diskussionen auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie.

Frau Dr. Pavlina Dolashka-Angelova (Bulgarische Akademie der Wissenschaften, Sofia), gilt mein Dank für viele anregende Diskussionen und die Erarbeitung gemeinsamer Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit.

Dem Osteuropa-Verbindungsbüro des BMBF bei der Deutschen Forschungsanstalt für Luft- und Raumfahrt danke ich für die Möglichkeit zur Teilnahme an dem Seminar "Naturwissenschaften im 21. Jahrhundert: Herausforderungen und Perspektiven" an der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Prag vom 30.06. bis 03.07.1997, sowie für die Förderung eines Forschungsaufenthaltes an der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften in Sofia im September 1999.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und der Conferenza dei Rettori delle Università Italiane gilt mein Dank für die Förderung von Forschungsaufhalten an der Universität in Padova im Rahmen des VIGONI-Projektes in den Jahren 1998 und 1999.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder Uwe, die mich in all den Jahren unterstützt haben und mir stets motivierend zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VI
I. Einleitung	1
II. Allgemeiner Teil	2
2.1 Metalloproteine	2
2.1.1 Respiratorische Proteine	2
2.1.2 Hämocyanine	4
2.1.2.1 Arthropoden (Gliederfüßer)	5
2.1.2.2 Mollusken (Weichtiere)	8
2.1.2.3 Kohlenhydratgehalt der Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken	11
2.1.2.4 Kupferbindendes Zentrum und die Beziehungen zwischen Arthropoden, Mollusken und Tyrosinasen	12
2.1.3 Die Große Kalifornische Schlüssellochnapfschnecke (<i>Megathura crenulata</i>)	13
2.1.2 Der Amerikanische Hummer (<i>Homarus americanus</i>)	14
2.1.3 Die Große Meerspinne (<i>Maja squinado</i>)	18
2.2 Das Immunsystem	18
2.2.1 Funktionsweise des Immunsystems	18
2.3 Krebs	20
2.3.1 Ursachen der Tumorbildung	20
2.3.2 Metastasierung	21
2.3.3 Tumorantigene, Immuntherapie	22
2.3.4 KLH als Haptenträger	23
2.4 Ausgewählte, eingesetzte Untersuchungsmethoden	25
2.4.1 Matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie	25
2.4.2 Sequenzanalyse	27
2.4.3 Zirkulardichroismus	30
2.4.4 Fluoreszenzspektroskopie	32
III. Themenstellung	36

IV. Ergebnisse und Diskussion	37
4.1 Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 und die Aufklärung der Primärstruktur der Funktionellen Einheit KLH2-c des Hämocyansins von <i>Megathura crenulata</i>	37
4.1.1 Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 des Hämocyansins von <i>Megathura crenulata</i> ...	37
4.1.1.1 Isolierung von KLH1 und KLH2 aus IMMUCOTHEL®	37
4.1.1.2 Bestimmung der Konformationsstabilität von KLH, KLH1 und KLH2 unter dem Einfluß von Temperatur und Guanidinhydrochlorid	38
4.1.1.3 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie $\Delta G_D^{H_2O}$ von KLH, KLH1 und KLH2	42
4.1.1.4 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs ⁺ und I ⁻	43
4.1.1.5 Die Temperaturabhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz	46
4.1.1.6 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung	47
4.1.1.7 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer	48
4.1.2 Die Aufklärung der Primärstruktur der Funktionellen Einheit KLH2-c des Hämocyansins von <i>Megathura crenulata</i>	50
4.1.2.1 N-Terminale Sequenzierung	50
4.1.2.2 Verdau mit Endoproteinase Lys-C	52
4.1.2.3 Chymotryptischer Verdau	56
4.1.2.4 Umsetzung mit Bromcyan	58
4.1.2.5 Die Primärstruktur von KLH2-c	60
4.1.2.6 Homologie der Sequenz von KLH2-c zu anderen Funktionellen Einheiten von Molluskenhämocyaninen	67
4.1.2.7 Bestimmung der Molekülmasse	70
4.1.2.8 Kohlenhydratbestimmung	71
4.1.2.9 Bestimmung der Sekundärstruktur von KLH2-c	73
4.1.2.10 Bestimmung der Konformationsstabilität von KLH2-c unter dem Einfluß der Temperatur	76
4.1.2.11 Fluoreszenzlöschung mit Cäsiumchlorid	77
4.1.2.12 Bestimmung der Tryptophylfluoreszenz in Abhängigkeit der Temperatur ..	78
4.1.2.13 Tyrosin-Tryptophyl-Energieübertragung	80

4.2. Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Struktur des Hämocyanins von <i>Homarus americanus</i>	81
4.2.1 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten von <i>Homarus americanus</i>	81
4.2.2 N-Terminale Sequenzen der Untereinheiten	83
4.2.3 Untersuchungen mit Zirkulardichroismus	85
4.2.3.1 Bestimmung der Konformationsstabilität des <i>Homarus americanus</i> -Hämocyanins und der Strukturellen Untereinheiten unter dem Einfluß von pH-Wert, Temperatur und verschiedenen Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid	85
4.2.3.2 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$ des <i>H. americanus</i> -Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten	86
4.2.4 Fluoreszenzeigenschaften des <i>Homarus americanus</i> -Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten	89
4.2.4.1 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs ⁺ und I ⁻	89
4.2.4.2 Die Abhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz von pH-Wert und Temperatur	92
4.2.4.3 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung	94
4.3. Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Struktur des Hämocyanins von <i>Maja squinado</i>	96
4.3.1 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten von <i>Maja squinado</i>	96
4.3.2 N-Terminale Sequenzen der Untereinheiten des Hämocyanins von <i>Maja squinado</i>	98
4.3.3 Untersuchungen mit Zirkulardichroismus	101
4.3.3.1 Bestimmung der Konformationsstabilität des <i>Maja squinado</i> -Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten unter dem Einfluß von pH-Wert, Temperatur und Guanidinhydrochlorid	101
4.3.3.2 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$ des <i>Maja squinado</i> -Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten	105
4.3.4 Fluoreszenzeigenschaften des <i>Maja squinado</i> -Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten	106
4.3.4.1 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs ⁺ und I ⁻	107
4.3.4.2 Die Abhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz von pH-Wert und Temperatur	108
4.3.4.3 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung	112

V. Experimenteller Teil	114
5.1 Materialien	114
5.1.1 Chemikalien	114
5.1.2 Enzyme und Proteine	115
5.1.3 Verbrauchsmaterial	116
5.1.4 Geräte	116
5.1.4.1 Gelchromatographie	116
5.1.4.2 Polyacrylgelelektrophorese	116
5.1.4.3 HPLC	116
5.1.4.4 Gefriertrocknung	116
5.1.4.5 Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie	117
5.1.4.6 Sequenzanalyse	117
5.1.4.7 Zirkulardichroismus	117
5.1.4.8 UV-Spektroskopie	117
5.1.4.9 Fluoreszenzspektroskopie	117
5.1.4.10 Sonstige Geräte	117
5.2 Methoden	118
5.2.1 Isolierung von KLH2c aus nativem Hämocyanin	118
5.2.2 Isolierung von KLH2 aus Immucothel®	120
5.2.3 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten des Hämocyanins von <i>Homarus americanus</i>	120
5.2.4 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten des Hämocyanins von <i>Maja squinado</i>	121
5.2.5 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von apo-Hämocyanin	121
5.2.6 Enzymatische und chemische Spaltungen	121
5.2.6.1 Verdau mit Endoproteinase Lys-C	121
5.2.6.2 Chymotryptischer Verdau	122
5.2.6.3 Umsetzung mit Bromocyan	122
5.2.6.4 Umkehrphasen-HPLC mit UV-Detektion	122
5.2.7 Kohlenhydratanalyse	123
5.2.8 Allgemeine Vorschrift zur Reduktion und S-Pyridylethylierung von Cystein-Resten	123

5.2.9 Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)	124
5.2.9.1 Reagenzlösungen für die Elektrophorese	124
5.2.9.2 Trennungsgel 7.5% (SDS-PAGE)	124
5.2.9.3 Trennungsgel 10% (SDS-PAGE)	124
5.2.9.4 Stapelgel 5% (SDS-PAGE)	124
5.2.9.5 Denaturierungspuffer	125
5.2.9.6 Lösung zum Anfärben des Gels	125
5.2.9.7 Lösung zum Entfärben des Gels, Fixierlösung	125
5.2.9.8 Agarose-Gel für die Immunelektrophorese	125
5.2.10 Massenspektrometrie	125
5.2.11 Sequenzanalyse	126
5.2.12 Zirkulardichroismus	127
5.2.12.1 KLH, KLH1, KLH2	127
5.2.12.2 KLH2-c	127
5.2.12.3 <i>Homarus americanus</i> und <i>Maja squinado</i>	127
5.2.12.4 Messungen zur Temperaturstabilität	127
5.2.12.5 Denaturierung mit Guanidinhydrochlorid	128
5.2.12.6 Sekundärstrukturberechnungen	128
5.2.13 Fluoreszenzspektroskopie	128
5.2.13.1 Fluoreszenzpolarisation	129
5.2.13.2 Messungen zur Temperaturstabilität	130
5.2.13.3 Fluoreszenzlöschungsexperimente	130
5.2.14 Elektronenmikroskopie	132
VI. Zusammenfassung	133
VII. Literatur	135

Abkürzungen

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Enzyme

LC/Lys-C	Endoproteinase Lys-C
CT	Chymotrypsin
CB	Bromcyan

Allgemeine Begriffe

Abb.	Abbildung
------	-----------

ACA	<i>Amarantus caudatus</i> -Agglutinin
ASA	Aminosäureanalyse
ATZ	Anilinthiazolinon
ber.	berechnet
BRM	Biological Response Modifier
CD	Zirkulardichroismus
CF	Chou-Fasman
ConA	Concanavalin A
Da	Dalton
DMT	Dimethylamin
DMPTU	N,N'-Dimethyl-N'-phenylthioharnstoff
DPTU	N,N'-Diphenylthioharnstoff
DDT	N,N'-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fab	Antigenbindungsfragment "ab"
FE	Funktionelle Einheit/en
GOR	Garnier-Osguthorpe-Robson
gem.	gemessen
Ha	<i>Homarus americanus</i>
Hc	Hämocyanin
HpH	<i>Helix pomatia</i> -Hämocyanin
HPLC	Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie
h	Stunde/n
k	Kilo
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
λ	Wellenlänge
LD	Laserdesorption
M_r	relative Molekülmasse
MALDI	Matix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

VIII Abkürzungen

mg	Milligrammmin	Minute/n
mL	Milliliter	
MS	Massenspektrometrie	
MsH	<i>Maja squinado</i> -Hämocyanin	
N-Ac-Trp-NH ₂	N-Acetytryptophanamid	
OdH	<i>Octopus dofleini</i> -Hämocyanin	
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese	
PITC	Phenylisothiocyanat	
PNA	Erdnußagglutinin	
PTC	Phenylthiocarbamoyl	
PTH	Phenylthiohydantoin	
RT	Raumtemperatur	
s	Sekunde/n	
S	Svedbergeinheit (1×10^{-13} sec)	
SD	Strukturelle Domäne	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SoH	<i>Sepia officinalis</i> -Hämocyanin	
SU	Strukturelle Untereinheit/en	
T _R	Retentionszeit	
TFA	Trifluoressigsäure	
THF	Tetrahydrofuran	
TMA	Trimethylamin	
TEMED	Tetraethylmethyldiamin	
TOF	Flugzeitanalyse (time of flight)	
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	
UV	ultraviolett	

I. Einleitung

Das 1878 von Léon Fredericq [1] mit dem Namen "Hämocyanin" (blaues Blut) benannte Kupferprotein ist nur in Arthropoden und den Mollusken als respiratorisches Pigment verbreitet. Obwohl es durch die Bezeichnung impliziert werden könnte, trägt dieses Protein kein Häm. In den dreißiger Jahren führte Svedberg [2, 3] systematische Untersuchungen mit Ultrazentrifugation durch und beschrieb die enorme Größe vor allem der Gastropodenhämocyanine. Ebenfalls sehr früh wurde erkannt, daß KCN Hämocyanine entfärbt (Kobert 1903), aber erst Kubowitz beschrieb 1938 diese Beobachtung richtig als die reversible Entfernung der Kupferatome aus dem Protein durch Komplexbildung [4]. Untersuchungen der Hämocyanine mit Zirkulardichroismus ergaben eine komplexe Absorption des Kupferchromophors mit insgesamt vier Übergängen zwischen 300 und 800 nm [5], die bei Deoxygenierung vollständig verschwinden. Die Aminosäurezusammensetzung, die Kohlenhydratzusammensetzung und die Bindungsverhältnisse um das Aktivzentrum wurden eingehend untersucht und Vergleiche zwischen Arthropoden und Mollusken gezogen [6].

Fortschritte in der präparativen (Polyacrylgelelektrophorese [7]) und apparativen Technik (Elektronenmikroskopie, Gasphasen-Sequenator) führten zu weiteren grundlegenden Erkenntnissen über den Aufbau und die Zusammensetzung von Hämocyaninen [8]. Die Installierung einer effektiven Methode zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen brachte vor allem seit den achtziger Jahren einen raschen Aufschwung in der Kenntnis von Primärstrukturen [9 - 11]. Schon 1984 veröffentlichte Gaykema [12] die durch Röntgenstrukturanalyse erhaltene Tertiärstruktur eines Arthropodenhämocyanins. Mit der funktionellen Einheit HpH-d der Weinbergschnecke *Helix pomatia* wurde 1987 erstmals die vollständige Sequenz einer funktionellen Einheit eines Mollusken [13] veröffentlicht. Zwischen 1990 und 1997 wurde durch die Veröffentlichung einer weiteren FE von *Helix pomatia* [14], den partiellen Sequenzen von *Sepia officinalis* (Cephalopode) [15, 16] und von drei C-terminalen FE von *Octopus dofleini* (Cephalopode) [17, 18], sowie mit der Sequenz der N-terminalen funktionellen Einheit "a" von *Rapana thomasiana* Grosse (Gastropode) [19] das Spektrum an Primärstrukturen von Mollusken erheblich erweitert. 1998 wurde mit der Primärstruktur von *Octopus dofleini* erstmals die komplette Sequenz eines Molluskenhämocyanins mit 7 funktionellen Einheiten und die Tertiärstruktur der C-terminalen FE "g" dieses Hämocyanins veröffentlicht [20, 21].

II. Allgemeiner Teil

2.1 Metalloproteine

In der Natur finden sich sowohl in der Flora als auch in der Fauna Proteine, die Metallatome in einem aktiven Zentrum enthalten. Diese Metalloproteine sind in wichtige lebenserhaltende Vorgänge involviert. Das Chlorophyll, der grüne Blattfarbstoff der Pflanzen mit Magnesium-Ionen im aktiven Zentrum, absorbiert Licht und liefert damit die Energie zur Durchführung der Photosynthese, bei der CO_2 in O_2 umgewandelt wird. Ein anderes weitverbreitetes Metalloprotein ist die Superoxiddismutase, von der es Spezies mit Mangan-, Eisen-Ionen oder mit einem gemischten Metallionenpaar, Kupfer und Zink, im aktiven Zentrum gibt [22]. Ihre Aufgabe ist es, die giftigen Superoxidionen in ungefährliches O_2 umzuwandeln. Superoxiddismutasen kommen in hohen Konzentrationen in den Erythrozyten, der Leber und im Gehirn höherer Organismen vor, und wurden im Falle des Kupfer-Zink-Proteins lange bevor ihre enzymatische Aktivität erkannt wurde isoliert und beschrieben. Inzwischen wurden Superoxiddismutasen in vielen Bakterien, Hefen und Pilzen nachgewiesen. Ein sehr weiter Bereich, in dem Metalloproteine eine Funktion ausüben, ist der des Sauerstofftransportes und der -speicherung.

2.1.1 Respiratorische Proteine

Viele physiologische Vorgänge benötigen zu ihrem Ablauf Sauerstoff. Die einfachste Form, des Sauerstofftransportes ist die Diffusion. Diese Transportart ist jedoch viel zu langsam, als daß sie wirksam sein könnte. Zudem werden nur Bereiche, die nicht weit vom Atmungsepithel entfernt sind, erreicht. In den Körpern vieler größerer Insekten sind deshalb Luftkanäle, die Tracheen, ausgebildet, über die der Sauerstoff im Körper verteilt wird. Über längere Distanzen hinweg verlangsamt sich der Sauerstofftransport in diesen Röhren jedoch rapide. Deshalb bleibt der Gastransport trotz der Erhöhung der Transportgeschwindigkeit durch Ventilationstracheen begrenzt, so daß Tracheenatmer nur Körpergrößen von wenigen Zentimetern erreichen.

Viele höhere Lebewesen verwenden als Sauerstofftransporter Flüssigkeiten (Blut, Hämolymphe), die mechanisch in zirkulierende Strömung versetzt werden. Dadurch wird der Sauerstoff zwar sehr schnell über weite Distanzen transportiert, allerdings nehmen Flüssigkeiten etwa 20mal weniger Sauerstoff auf als Luft. Rein physikalisch in der Transportflüssigkeit gelöst liegt Sauerstoff deshalb nur in einigen wenigen Invertebraten (z. B. Nematoden) und einer Gruppe arktischer

Knochenfische (Chaenichthys) vor ($\text{max. } 10 \text{ mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). Diese geringe Löslichkeit von Sauerstoff wird dadurch erhöht, daß Organismen der Fauna, in denen "Blut" zirkuliert, respiratorische Pigmente ausgebildet haben, die eine höhere Bindungsaffinität (bis zu $200 \text{ mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) gegenüber Sauerstoff aufweisen als reine Flüssigkeiten, und die den Sauerstoff transportieren oder auch speichern [23]. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Proteine, die den Sauerstoff mittels eines aktiven Zentrums aus Metallatomen binden, wobei es sich abhängig von der Spezies um verschiedenartige Metalle handeln kann. Eine in den Blutzellen der Vertebraten und auch einiger Invertebraten weit verbreitete Gruppe von sauerstofftransportierenden Pigmenten enthalten ein aus einem Porphyrinring bestehendes aktives Zentrum, das Häm. Dieses enthält ein Fe^{2+} -Ion, welches kovalent sowohl an den Porphyrinring als auch an ein Histidin der Proteinkette gebunden ist. Das menschliche Hämoglobin besteht aus zwei α - (141 AS) und zwei β -Ketten (146 AS), die untereinander über eine Cysteinbrücke reversibel miteinander verbunden sind und jeweils ein Protoporphyrin mit einem aktiven Zentrum besitzen. Ein Hämoglobin kann also 4 Moleküle Sauerstoff binden. Jede Kette hat ein Molekulargewicht von etwa 16000 Da, das gesamte Hämoglobin also eine Molekülmasse von 64000 Da. Dem Hämoglobin verwandt ist das in den Muskelzellen vieler Wirbelloser und Wirbeltiere vorkommende Myoglobin, ein Sauerstoffträger und -speicher, das jedoch nur aus einer, 153 Aminosäuren enthaltenden, Polypeptidkette besteht. Ein weiteres hämtragendes respiratorisches Protein ist das Chlorocruorin, bei dem jedoch der Porphyrinring geringfügige Unterschiede in den Seitenketten aufweist, und welches extrazellulär im Blut einiger Polychaeten vorkommt. In einigen *Serpula*-Arten treten Hämoglobin und Chlorocruorin gleichzeitig auf.

Ein ebenfalls eisenhaltiger Blutfarbstoff ist das Hämyerthrin, bei welchem jedoch zwei Eisenatome direkt über Histidinreste an die Polypeptidkette gebunden sind. Hämyerthrin tritt im allgemeinen als Oktamer auf, es werden jedoch verschiedentlich auch Trimere oder Monomere gefunden. Um die Erhöhung des osmotischen Wertes der Transportflüssigkeit durch die Transportproteine möglichst gering zu halten, sind diese zu großen Molekülaggregaten vereinigt oder in speziellen Transportzellen (Erythrocyten, Coelomocyten) eingelagert. Die Molekulargewichte der frei in der Hämolymphe gelösten Transportproteine sind wesentlich höher als die der zellulär gebundenen, die allerdings extrem hohe Packungsdichten aufweisen [24].

Tabelle 1. Sauerstofftransportproteine (respiratorische Pigmente) nach [23]. oxy: oxygeniertes (O₂-reiches) Blut, desoxy: desoxygeniertes (O₂-armes) Blut. Grau unterlegt: In der Transportflüssigkeit frei gelöst.

	Molekulargewicht [kDa]	Farbe		Vorkommen
		<u>oxy</u>	<u>desoxy</u>	
Hämoglobin (Fe-Porphyrin-Protein)	17 - 68	<u>hellrot</u>	<u>dunkelrot</u>	Vertebraten einige Invertebraten: Nemertinen, <i>Cucumaria</i> (Echinodermen)
	1500 - 3000	<u>hellrot</u>	<u>dunkelrot</u>	Invertebraten, z.B. <i>Ascaris</i> (Nematoden) <i>Lumbricus</i> , <i>Arenicola</i> (Anneliden) <i>Planorbis</i> (Mollusken)
Chlorocruorin (Fe-Porphyrin-Protein)	2750	<u>gelbgrün</u>	<u>blaßgrün</u>	einige wenige Anneliden: Serpuliden, Sabelliden
Hämerythrin (Fe-Protein)	108	<u>violett</u>	<u>farblos</u>	einige Brachiopoden, Pripuliden Sipunculiden und Anneliden
Hämocyanin (Cu-Protein)	400 - 9000	<u>blau</u>	<u>farblos</u>	Mollusken: Prosobranchier, Pulmonaten, Gastropoden, Cephalopoden Arthropoden: Xiphosuren, Cheliceraten, Crustaceen

2.1.2 Hämocyanine

Das als Hämocyanin bezeichnete blaue Kupferprotein ist in Weichtieren (Mollusken) und Gliederfüßern (Arthropoden) weit verbreitet. Hämocyanine sind extrazelluläre Proteine, die frei in der Hämolymphe flottieren und in Spezies wie Tintenfischen (Cephalopoden), Käferschnecken (Chitonen), vielen Schneckenarten (Gastropoden) sowie einer Gruppe von Muscheln (Bivalva)

vorkommen. Bei den Gliederfüßern (Arthropoden) findet man Hämocyanin bei vielen Spinnentieren (Arachniden), bei Skorpionen, den albertümlichen Pfeilschwänzen (Xiphosuren), höheren Krebsen (Crustaceen) oder Tausendfüßern der Gattung Scutigera. Die beiden Kupferatome des aktiven Zentrums sind jeweils über drei Histidinreste direkt an das Protein gebunden. Die blaue Farbe des Hämocyanins verliert sich stets bei Sauerstoffentzug und kann in einigen Fällen auch durch andere Blutpigmente überdeckt sein. Insgesamt findet man ca. 50000 Arten blaublütiger Mollusken und etwa ebenso viele Arthropoden. Die weitaus größte Arthropodenklasse, die Insekten, besitzen meist kein respiratorisches Protein, sondern Tracheen, durch die der Sauerstoff direkt zu den Zielorganen diffundiert. Jedoch findet man in einigen in sauerstoffarmer Umgebung lebenden Wasserinsekten rotes Hämoglobin und in der Hämolymphe anderer Insekten finden sich dem Hämocyanin strukturverwandte Proteine. Auffällig ist, daß es keine dem Myoglobin oder Myohämerythrin verwandte Struktur eines Myocyanins gibt. Wird ein O₂-Speicherprotein benötigt, wie es in den Muskeln der Radula (Raspelzunge) von Gastropoden der Fall ist, so wird dafür Myoglobin verwendet. Dies ist insofern bemerkenswert als es zeigt, daß auch Organismen, die Hämocyanine zum O₂-Transport verwenden, Globinproteingene tragen und somit prinzipiell in der Lage gewesen wären, hämtragende O₂-Transportproteine zu entwickeln [25].

2.1.2.1 Arthropoden (Gliederfüßer)

Die Molekulargewichte der Hämocyanine von Arthropoden sind außerordentlich groß. Sie setzen sich aus zahlreichen Polypeptiden, den Strukturellen Untereinheiten, zusammen und erreichen mit einer Größe von etwa 25 nm die Größe von Ribosomen [26]. Eine SU des Arthropoden-Hämocyanins hat ein Molekulargewicht von 75000 Da, und ist damit größer als das gesamte menschliche Hämoglobin. Sie besteht aus 620 Aminosäureresten bei den Cheliceraten und aus ungefähr 660 Aminosäureresten bei den Crustaceen und besitzt im Aktivzentrum zwei Kupferionen, die ein Sauerstoffmolekül reversibel binden können. Die Strukturelle Untereinheit erscheint bohnenförmig und enthält drei aufgrund ihrer unterschiedlichen Sekundärstrukturen klar voneinander unterscheidbare Strukturelle Domänen. SD "1" besteht vorwiegend aus α -Helices, SD "2" enthält in ungefähr gleicher Anzahl α -Helices und β -Faltblattstrukturen, SD "3" ist überwiegend aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut und überdeckt große Teile der SD "1". In der

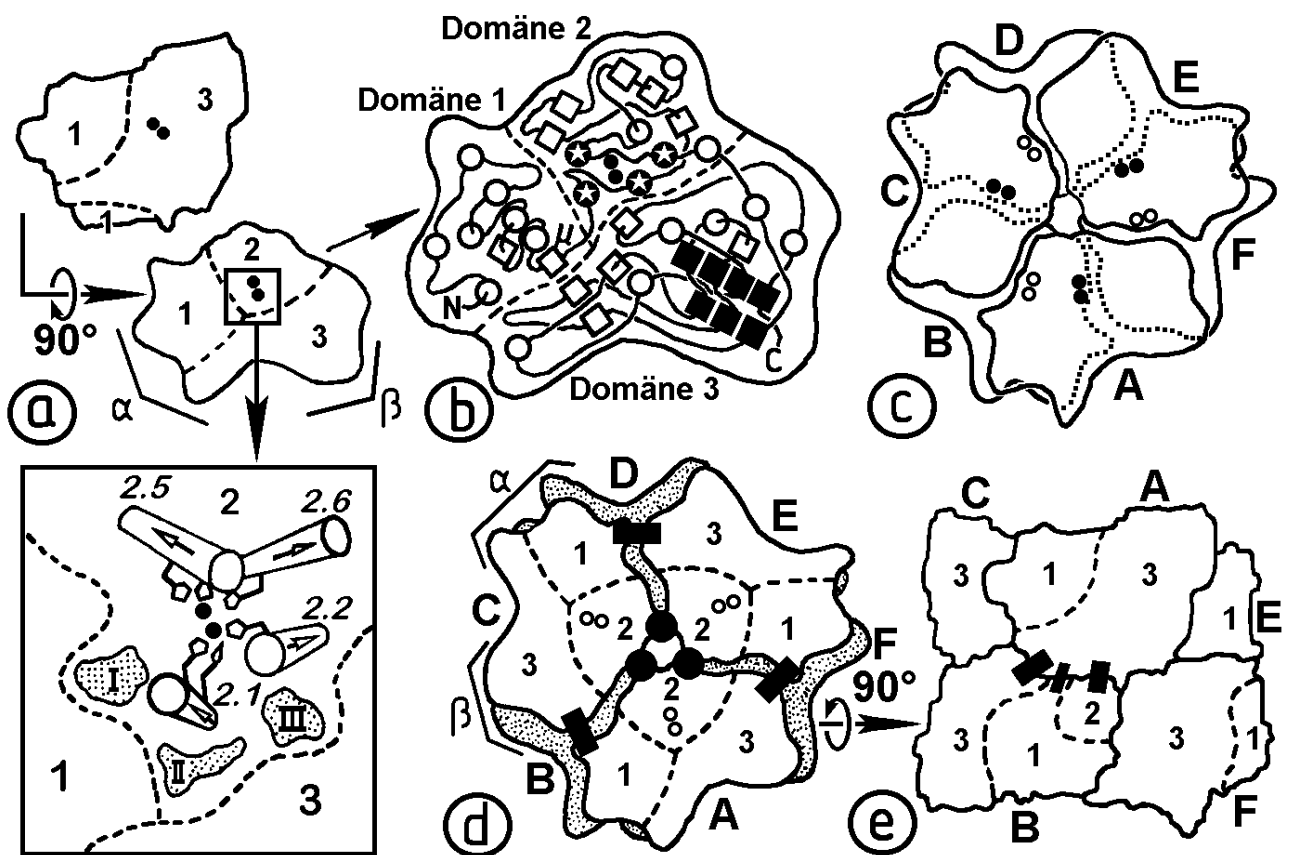


Abb. 1. Der Aufbau der Strukturellen Untereinheit eines Arthropodenhäemocyanins (nach [26]). a) Ventral- und Dorsalansicht der Untereinheit; Kreise und schwarze Punkte: Kupferatome; gestrichelte Linien: Grenzen zwischen den Strukturellen Domänen 1 - 3; α : α -helixreiche Region; β : β -faltblattreiche Region; die vergrößerte Darstellung des Aktivzentrums: 2.1, 2.2, 2.5, 2.6: die 4 antiparallelen, an der Kupferbindung beteiligten α -Helices; I - III: eingeschlossenes Wasser. b) die Sekundärstrukturen der Strukturellen Domänen: α -Helices (O), β -Faltblatt (□), kupferbindende α -Helices (⊛), die siebenfache antiparallele β -Faltblattstruktur (■). c) Das aus 6 Strukturellen Untereinheiten (A - F) zusammengesetzte Hämocyanin. d) Ansicht des Hexamers in Richtung der dreizähligen Drehachse; "lockere" Kontaktregionen zwischen den Strukturellen Untereinheiten: schwarze Kreise (●) und Rechtecke (■); die Strukturelle Domäne "2" ist in Richtung des zentralen Kanals orientiert und wird von den Strukturellen Domänen "1" und "3" nach außen abgeschirmt. e) Ansicht des Hexamers senkrecht zur dreizähligen Drehachse; "enge" Kontaktregionen zwischen den Funktionellen Untereinheit: schwarze Rechtecke (■).

zweiten SD, zwischen 4 antiparallelen α -Helices, sind die beiden Kupferatome des Aktivzentrums lokalisiert [27, 28] (Abb. 1). Innerhalb der Untereinheit kann eine "alpha"- und eine "beta"-Region unterschieden werden. Jeweils sechs solcher Untereinheiten vereinigen sich zu einem Hexamer, wobei sie die Ecken eines trigonalen Antiprismas besetzen. Jeweils drei Untereinheiten aggregieren mit der aus den Strukturellen Untereinheiten "1" und "2" gebildeten konvexen Seite und generieren eine dreizählige Drehachse. Zwei solcher Trimeren sind spiegelbildlich, jedoch entlang der Drehachse um 60° gegeneinander verdreht, zusammengelagert. Die sechs Domänen "2" sind in dieser Anordnung im Zentrum des Hexamers um einen Kanal angeordnet, der sich entlang der Drehachse durch das Aggregat zieht, während die Strukturellen Untereinheiten "1" und "3" die aktiven Zentren nach außen hin abschirmen (Abb. 1). Der Kontakt zwischen zwei aufeinanderliegenden Strukturellen Untereinheiten ist dabei enger als der zwischen den Untereinheiten der Trimeren, so daß das Hexamer eher als ein "Trimeres von Dimeren" als ein "Dimeres von Trimeren" angesehen werden kann [29]. Von der Seite betrachtet erscheint das Hexamer als Kubus, in Richtung der Drehachse als Hexagon [30]. Das Hämocyanin einer ganzen Anzahl von Crustaceen, wie z. B. Shrimps, Krill, Langusten, Krabben oder vielen Isopoden besteht aus solchen solitären Hexameren [12, 27]. In anderen Hämocyaninen bilden sie die Grundlage für höhere Aggregate. So findet man Dimere von Hexameren neben 1×6 Molekülen in einigen Flußkrebse [31], wobei die 2×6 Moleküle um 90° gegeneinander verdreht und an einer Stelle über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [32]. Das Hämocyanin von *Cupiennius salei*, einer Spinnenart [33], wird von zwei übereinander gestapelten 2×6 Molekülen gebildet, und beim Heuschreckenkrebs *Squilla mantis* sind die 2×6 -Aggregate so übereinander geschoben, daß die hexagonalen Oberflächen sich zu 60% überlappen [34]. 4×6 Moleküle werden im Hämocyanin von *Callinassa californiensis* als tetraederförmige, aus zwei 2×6 Molekülen aufgebaute Aggregate gefunden [35, 36]. Beim Skorpion *Androctonus australis* und der Vogelspinne *Eurypelma californicum* bilden jeweils zwei 2×6 Moleküle quadratisch-planare Aggregate [37-39]. Größere Aggregate wurden bei *Scutigera coleoptrata* (drei 2×6 Moleküle, oktaedrisch [40]) oder bei *Limulus polyphemus* (vier 2×6 Moleküle, antiparallel quadratisch-planar [41-43]) nachgewiesen. Auch wenn es zu Überlappungen und Unschärfen kommt, so können doch die kleineren Aggregate von Hexameren den Cheliceraten (Spinnenartigen) und die größeren den Crustaceen (Krebsartigen) zugeordnet werden.

2.1.2.2 Mollusken (Weichtiere)

Ein noch höheres Molekulargewicht als die O₂-Transportpigmente der Arthropoden haben die Molluskenhämocyanine. Mit einem Durchmesser von ca. 35 nm erreichen sie die Dimensionen eines mittelgroßen Virus. Der Aufbau ist bei allen Molluskenhämocyaninen gleich: Eine hohle zylindrische Struktur [44, 45] mit ungefähr 30 nm Durchmesser, einer Höhe von ca. 15 nm und einer fünf- oder zehnzähligen Symmetrie in der Zylinderachse. Dabei können kleinere Variationen in der Größe und anderen Details auftreten. Alle diese Hämocyanine weisen Sedimentationskoeffizienten von 48S - 61S auf [46], was einem Molekulargewicht zwischen 3.5 und 4.5×10⁶ g·mol⁻¹ entspricht [6, 47]. Es werden auch Strukturen mit Sedimentationskoeffizienten von 100S gefunden, die sich jedoch als dimere Form der 65S-Strukturen herausgestellt haben, in die sie durch Erhöhen des pH-Wertes und/oder durch die Entfernung von zweiwertigen Kationen dissoziiert werden können. Aggregate mit Sedimentationskoeffizienten von 69S, 105S, 131S, 153S und 175S wurden erstmals bei der Untersuchung des Hämocyanins des Seehasen *Dolabella auricularia* (Hinterkiemer, Gastropode) gefunden [48]. Solche Aggregate wurden danach bei weiteren Gastropoden, wie z. B. dem Seehasen *Aplysia limacina* [49], der Großen Schlüssellocknapfschnecke *Megathura crenulata* [50], oder bei *Marisa cornuarietis* Linné und anderen Spezies aus den Familien der Melongenidae und Naticidae [51-53] gefunden und als Multimere der 61S-Einheiten identifiziert. In Anbetracht dessen, daß Hämocyanine in bedeutenden Konzentrationen in der Hämolymphe vorliegen, wurde untersucht inwieweit das Assoziationsverhalten mit der Konzentration zusammenhängt [44]. Die Experimente ergaben, daß z.B. das Hämocyanin von *Pleuroploca gigantea* auch bei höheren Konzentrationen keine größeren Aggregate als 100S bildet, während bei anderen mit Erhöhung der Konzentration eine schrittweise Aggregation sogar über 100S hinaus erfolgt und bei Cephalopodenhämocyanin überhaupt keine Tendenz zur Aggregation festgestellt werden konnte [54]. Diese Phänomene ließen sich mit zunehmender Kenntnis des genauen Aufbaus der Hämocyanine leicht erklären. Seit es gelang, in Lösungen von 6M Harnstoff die Hämocyaninmoleküle in ihre Untereinheiten zu zerlegen [55, 56] und verbesserte Untersuchungsmethoden sogar erlaubten die Zahl der Funktionellen Einheiten (FE) der Untereinheiten zu ermitteln [13, 17, 57], herrscht über den Aufbau des Molluskenhämocyanins weitgehende Klarheit. Demnach setzen sich die Strukturellen Untereinheiten aus Ketten von je 7 (z.B. *Octopus dofleini* [58]) oder 8 (z.B. *Sepia officinalis* (Gemeiner Tintenfisch, Cephalopode) [59]), *Helix pomatia* β-Kette (Weinbergschnecke, Pulmonate [60]), *Rapana thomasi* SU1

(Gastropode [61, 62]), durch kurze Verbindungszonen (Linker) miteinander verbundenen Funktionellen Einheiten zusammen. In jeder FE befindet sich ein aus zwei Kupferionen gebildetes Aktivzentrum. Die FE besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa und bestehen aus 400 bis 500 Aminosäureresten was ein Molekulargewicht zwischen 350 und 450 kDa pro Struktureller Untereinheit ergibt. Je 10 Untereinheiten bilden ein zylindrisches Dekamer, wobei ein Dimer der Funktionellen Einheiten als Aggregationskeim wirkt [63, 64]. Die Strukturellen Untereinheiten sind dabei so gefaltet, daß 6 FE in drei Lagen die Zylinderwand bilden und eine oder zwei FE in den inneren Hohlraum des Zylinders weisen und einen sogenannten "Kragen" bilden. Ist das eben beschriebene Baumuster sowohl bei Cephalopoden als auch bei Gastropoden dasselbe, so gibt es dennoch signifikante Unterschiede in der Anordnung der den "Kragen" bildenden FE und damit des Aggregationsverhaltens. Untersuchungen an *S. officinalis* (Cephalopode) ergaben, daß es sich sowohl bei der N-terminalen FE SoH-a als auch der C-terminalen FE SoH-h um kragenbildende FE handelt [59], was zu einem Kragen aus 10 FE auf beiden Seiten des Hämocyaninmoleküls und einer somit zu einer 10-zähligen Rotationssymmetrie führt. Bei *Octopus dofleini* (Cephalopode) wurde eine antiparallele Zusammenlagerung der SU gefunden, wodurch ein aus jeweils fünf FE gebildeter Kragen auf beiden Seiten des Moleküls mit einer 5-zähligen Symmetrie entsteht [65, 66]. Beide Hämocyanine sind also senkrecht zur Zylinderachse symmetrisch. Bei *Helix pomatia* (Gastropode) sind die Funktionellen Einheiten so angeordnet, daß die kragenbildenden FE alle auf einer Seite des Dekamers konzentriert sind und eine offene und eine Kragenseite bilden [67]. Durch diese Anordnung der Untereinheiten ist das Gesamtmolekül unsymmetrisch senkrecht zur Zylinderachse. Bei *Helix pomatia*, wie auch bei einigen anderen Gastropoden, werden Didekamere, aber auch tubulare Strukturen mit Sedimentationskoeffizienten größer als 100S gefunden. Zusammenfassend ergibt sich, daß der Aufbau des Hämocyanins von Cephalopoden keine Aggregation größer als 60S (Monodekamer) zuläßt [8, 68], während beim Hämocyanin von Gastropoden Multidekamere mit Sedimentationskoeffizienten größer 100S möglich sind. Die Aggregation hängt dabei sehr stark von der Konzentration an divalenten Kationen ab [69 - 72]. Beispielhaft wurde dies am Hämocyanin von *Busycon canaliculatum* demonstriert [53], wo neben dem Didekamer mit 106S noch Tridekamere (133S, 1340 kDa) und Tetradekamere (160S, 1740 kDa) gefunden wurden. Erste Hinweise auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Spezies von Strukturellen Untereinheiten im selben Tier lieferten die Untersuchungen an *Helix pomatia* [73] und *O. dofleini* [17, 18, 57]. Dies wurde auch bei der kalifornischen Schlüsselloch- napfschnecke *Megathura crenulata*, bei *Rapana thomasi* [74] und *Haliotis tuberculata* [75] gefunden. Auch hier existieren jeweils zwei Untereinheiten, die immunologisch klar unterscheidbar

sind. Wie das Hämocyanin von *Helix pomatia*, enthalten z. B. KLH1 und KLH2 [76, 77] 8 FE, von denen jeweils zwei in den Hohlraum ragen und einen doppelten Kragen aus 20 FE bilden. Hier besteht die Strukturelle Untereinheit also aus einer offenen und einer durch einen "Kragen" geschlossenen Seite. Bei beiden Untereinheiten lagern sich die Dekamere mit der offenen Seite zusammen und bilden Doppelmoleküle (Didekamere), die der zuvor beschriebenen 100S-Einheit entsprechen. Wurde in früheren Veröffentlichungen beschrieben, daß bei KLH1 damit der höchste Aggregationsgrad erreicht wäre, während KLH2 durch Anlagerung von weiteren Dekameren Makrostrukturen (Multidekamere) ausbildet [25], ist heute unstrittig, daß beide Strukturellen Untereinheiten Multimere ausbilden [78].

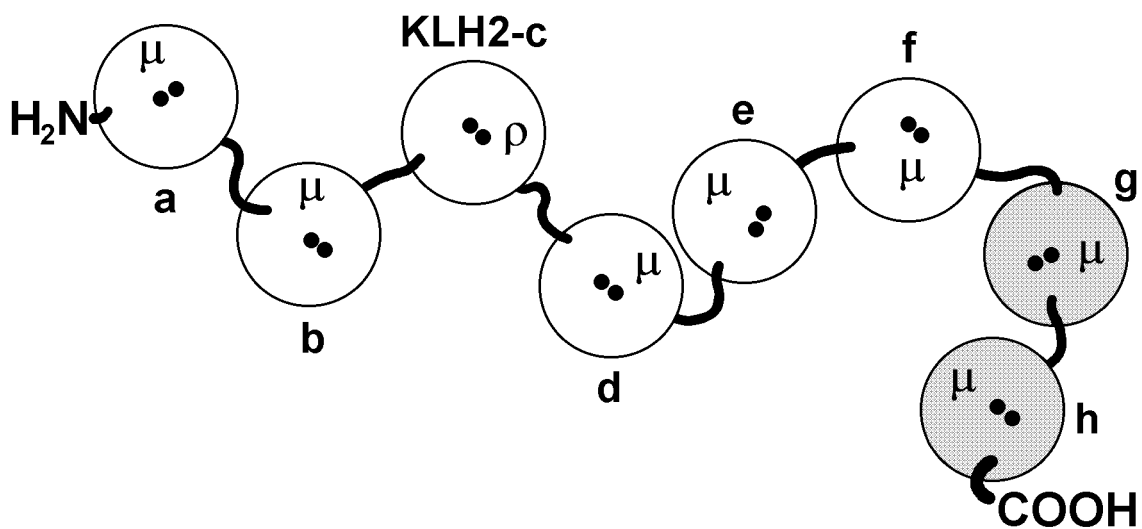


Abb. 2. Aufbau einer Strukturellen Untereinheit eines Molluskenhämocyanins am Beispiel von KLH2 des Hämocyanins der Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke *Megathura crenulata*. Die Strukturelle Untereinheit besteht aus 8 Funktionellen Einheiten (a - h) [77], die über kurze Peptidabschnitte (Linker) miteinander verbunden sind. Jede FE trägt in ihrem Aktivzentrum zwei Kupferionen (schwarze Kreise), an die je ein Sauerstoffmolekül gebunden wird. NH₂: N-Terminus; COOH: C-Terminus; KLH2-c: Diese Funktionelle Einheit ist Gegenstand der Untersuchungen in Kapitel 4.1.2 dieser Arbeit. μ: N-Glykane; ρ: O-Glykane; Die grau unterlegten FE g und h bilden den Kragen im Dekamer.

Weitgehende Unkenntnis herrscht über die Faktoren, die zu einer Polymerisation des Hämocyanins führen, bzw. diese erlauben. Diskutiert werden z. B. das Vorhandensein von Regionen bevorzugter Wechselwirkung oder Bindungsregionen für divalente Kationen an den Nahtstellen der Didekamere und der addierten Dekameren, die sonst in der Kragen- bzw. Schwanzregion der Dekameren fehlen, eine Modifizierung der Kontaktregion durch begrenzte Proteolyse, oder eine Komplementarität der Domänen an den Nahtstellen, durch die eine Polymerisation bevorzugt ermöglicht würde [46]. Von Interesse ist hierbei die Feststellung der immunologischen Unterscheidbarkeit der einzelnen Domänen beim KLH2 [76]. Während neuere Erkenntnisse das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Hämocyanine für *Megathura* bestätigen [78], ist man heute der Auffassung, daß die bei *O. dofleini* gefundenen korrespondierenden mRNA vor allem geringe Unterschiede in den Verbindungszonen der Untereinheiten bewirken [47].

2.1.2.3 Kohlenhydratgehalt der Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken

Ein weiterer Aspekt, der nicht unbeachtet bleiben darf, ist der Kohlenhydratgehalt der Hämocyanine. Für die Arthropoden wurden sehr geringe Zuckergehalte festgestellt. Sie bewegen sich zwischen 0.8 und 2% der Gesamtmasse des Proteins. Der höchste Zuckergehalt mit 4.9% wurde bei *Scutigera coleoptrata* [79] nachgewiesen, während das Hämocyanin von *Limulus* überhaupt keine Kohlenhydrate besitzt [80]. Bei Arthropodenhämocyaninen, die Kohlenhydratseitenketten tragen, sind diese durchweg N-glykosyliert, an Asparagin gebunden und setzen sich aus N-Acetylglucosamin- und Mannoseresten zusammen. Ob Hämocyanine glykosyliert sind oder nicht, hängt wohl vom Ort der Biosynthese ab [26].

Die Kohlenhydratgehalte der Mollusken sind signifikant höher als die der Arthropoden. Sie schwanken bei den untersuchten Spezies zwischen 2.3% (*Octopus vulgaris*, Cephalopode) und 9% (*Helix pomatia*, Gastropode, Pulmonate). Auch die Zusammensetzung der Zucker ist variantenreicher als bei den Arthropoden. So wurde neben N-Acetylgalactose und Mannose auch N-Acetylglucose, Galactose und Fucose (nicht bei *Octopus*) gefunden. Zusätzlich fanden sich bei einigen Spezies noch ungewöhnliche Monosaccharide. So enthält *Helix*-Hämocyanin zusätzlich noch 3-O-Methyl-D-galactose und die Hämocyanine des Gastropoden *Lymnea stagnalis*, der Bivalve *Acila castrensis* sowie des Chitoniden *Stenoplax conspicua* enthalten 3-O-Methyl-D-mannose [80]. Bei den beiden letztgenannten Spezies wird weder Xylose noch 3-O-Methyl-D-galactose gefunden. Als besonders variantenreich, was die Zusammensetzung der Kohlenhydratseitenketten betrifft, hat sich das Hämocyanin der Meeresschnecke *Lymnea stagnalis* erwiesen

[81]. Lommerse *et al.* [82] haben 1997 insgesamt 21 N-glykosylierte Kohlenhydratseitenketten am α_D -Hämocyanin von *Helix pomatia* beschrieben.

2.1.2.4 Das kupferbindende Zentrum, Beziehungen zwischen Arthropoden, Mollusken und Tyrosinasen

Die beiden Kupferatome in den Hämocyaninen von Arthropoden und Mollusken werden mit den Indizes "A" und "B" bezeichnet. Das kupferbindende Zentrum "A" befindet sich in der N-terminalen Region, das Kupferatom "B" in einem zentralen Bereich des Proteins. Betrachtet man die kupferbindenden Aktivzentren von Arthropoden und Mollusken, so fällt auf, daß zwischen den Primärstrukturen, die das sogenannte "B-Zentrum" ("Cu_B") umgeben, große Übereinstimmung in der Aminosäurezusammensetzung herrscht. In allen bisher bekannten Primärstrukturen findet sich bei "Cu_B" das Motiv (FxxxHxxxD/E), wobei der Histidinrest als Kupferligand fungiert. In Arthropodenhämocyaninen wurden zwei weitere Histidine in der "Cu_B"-Region als Kupferliganden identifiziert, die das Motiv (HxxxH) aufweisen und das auch bei Molluskenhämocyaninen gefunden wird. Im Gegensatz zu dieser großen Übereinstimmung des "Kupfer-B-Zentrums" unterscheiden sich die "Kupfer-A-Regionen" von Arthropoden und Mollusken grundlegend. Während bei den Arthropoden das Motiv (HxxxH) von "Cu_B" wiederholt wird und mit "Cu_A" bezeichnet wird, erscheint bei den Mollusken als Motiv (HxxxxxxxxWHRxxxxxxxxE) sowie ein Motiv (AxxH) und das "Kupfer-A-Zentrum" der Mollusken wird mit "Cu_A" bezeichnet. Beide Motive werden auch in Tyrosinasen gefunden, und es wird heute als gesichert angesehen, daß Molluskenhämocyanine und Tyrosinasen sich aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt haben [26, 83]. Über die Bindung der Kupferatome und die Funktionsweise der Sauerstoffbindung wurde in der Vergangenheit sehr viel diskutiert [6, 8, 55]. Schon sehr bald wurde dabei festgestellt, daß sich die Bindungsarten und die Oxidationsstufen der Kupferatome in Arthropoden und Mollusken stark unterscheiden. Felsenfeld und Printz [84] stellten fest, daß die Kupferatome im Arthropodenhämocyanin von H₂O₂ irreversibel oxidiert werden, während Molluskenhämocyanine den Prozeß bis zur Entstehung von O₂ fortzusetzen in der Lage sind. Außerdem wurde in mehreren Studien festgestellt, daß bei Behandlung mit CN⁻ bei Arthropodenhämocyaninen beide Kupferatome unmittelbar aufeinanderfolgend entfernt werden, und nur das apo-Protein detektiert werden kann.

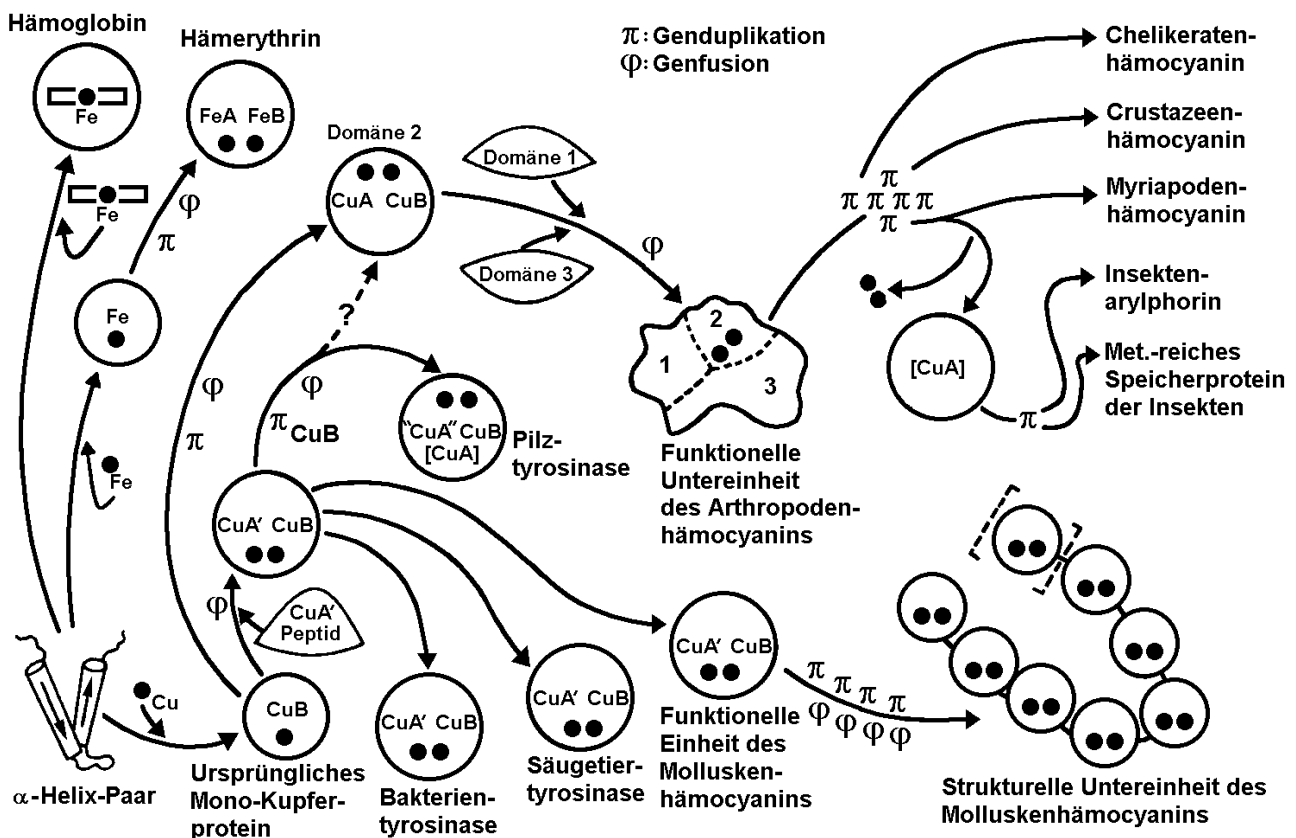


Abb. 3. Hypothetische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Blutfarbstoffen Hämoglobin, Hämerythrin und Hämocyanin, sowie der Entwicklung der unterschiedlichen Kupferzentren bei Arthropoden- und Molluskenhämocyaninen und deren Verwandtschaft zu den Tyrosinasen [54].

Bei Molluskenhämocyaninen erfolgt die Entfernung des zweiten Kupferatoms weitaus langsamer, so daß eine halbapo-Form des Proteins dargestellt werden kann [85]. Die Bindung des Kupfers erfolgt über einen $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Komplex, wie dies schon früher von Freedman [86] angenommen und später durch Röntgenstrukturanalysen [87] und ramanspektroskopische Studien [88] bestätigt wurde.

2.1.3 Die Große Kalifornische Schlüssellocknapfschnecke (*Megathura crenulata*)

Die Große Kalifornische Schlüssellocknapfschnecke (Keyhole Limpet) gehört im Tierstamm der Mollusken (Weichtiere) zur Klasse der Gastropoden (Schnecken, Unterklasse: Prosobranchia) und ist an den Küsten Kaliforniens von Monterey bis Mexiko zu finden. Die Tiere leben in der Brandungszone und bis in Tiefen von 40 m. Mit ihrem breiten Fuß saugen sie sich auf Steinen fest,

die sie abweiden. Sie ernähren sich von Algen und Tunikaten. *Megathura* ist eine Meeresschnecke von sehr ursprünglicher Form, d. h. von bilateralem Körperbau und mit einem flachen Rückenschild ausgestattet, das eine Größe von bis zu 12,5 cm erreichen kann. Im Zentrum des Rückenschildes, das deutlich sichtbare Wachstumsringe aufweist, befindet sich das "Schlüsselloch", eine ovale Körperöffnung die als Atmungsöffnung dient und in der gleichzeitig auch der Verdauungstrakt und die Fortpflanzungsorgane als pallialer Organkomplex münden. Das auffälligste Merkmal ist bei *Megathura crenulata* der überdimensional ausgebildete Mantel, der den Rückenschild fast vollständig bedeckt. Die Färbung des Mantels reicht von Schwarz über Braun bis zu einem hellen Grau und ist meistens getigert [89] (Abb. S.15).

2.1.4 Der Amerikanische Hummer (*Homarus americanus*)

Der Amerikanische Hummer zählt in der Klasse der Arthropoden (Gliederfüßer) zu den Crustaceen (Krebse) und hier zur Ordnung der Decapoden (Zehnfußkrebse). Der Amerikanische Hummer ist mit bis zu 60 cm Länge etwas größer als der europäische und bewohnt die felsigen Atlantikküsten Nordamerikas von Labrador bis Cape Hatteras, wo er in Tiefen zwischen 30 m und 700 m zu finden ist. Wie alle Krebse besitzt er eine symmetrische Carapax und einen breiten Schwanzfächer. Kennzeichen der Hummer sind die großen Scheren am ersten Schreitbeinpaar, von denen (meist die linke) als Schneide- oder Greifschere mit Zähnen besetzt ist, während die andere, etwas dickere, mit Höckern bedeckt ist und zum Öffnen von Muscheln und kleinen Krebsen dient, von welchen sich Hummer hauptsächlich ernähren. Tagsüber halten sich die Hummer in Felsspalten oder Höhlen auf, die sie nachts zur Jagd verlassen. Auch während der Häutung verbleiben die Tiere über mehrere Tage in ihren Unterschlupfen, bis der neue Panzer ausgehärtet ist. Die männlichen Tiere häuten sich jährlich und wachsen deshalb schneller als die Weibchen, die sich in einem Zweijahresrhythmus häuten und auch nur bis zu 40 cm groß werden. Das Fleisch der Hummer, besonders das der Scheren, gilt als Delikatesse [90] (Abb. S. 16).

a



b



Abb. 4. *Megathura crenulata*. a) Auf dem Bild ist sehr gut der Rand des vom Mantel überwachsenen Rückenschildes zu erkennen. b) Ein getigertes Exemplar (Abb. mit freundlicher Genehmigung der Fa. Biosyn, Fellbach).

a



b

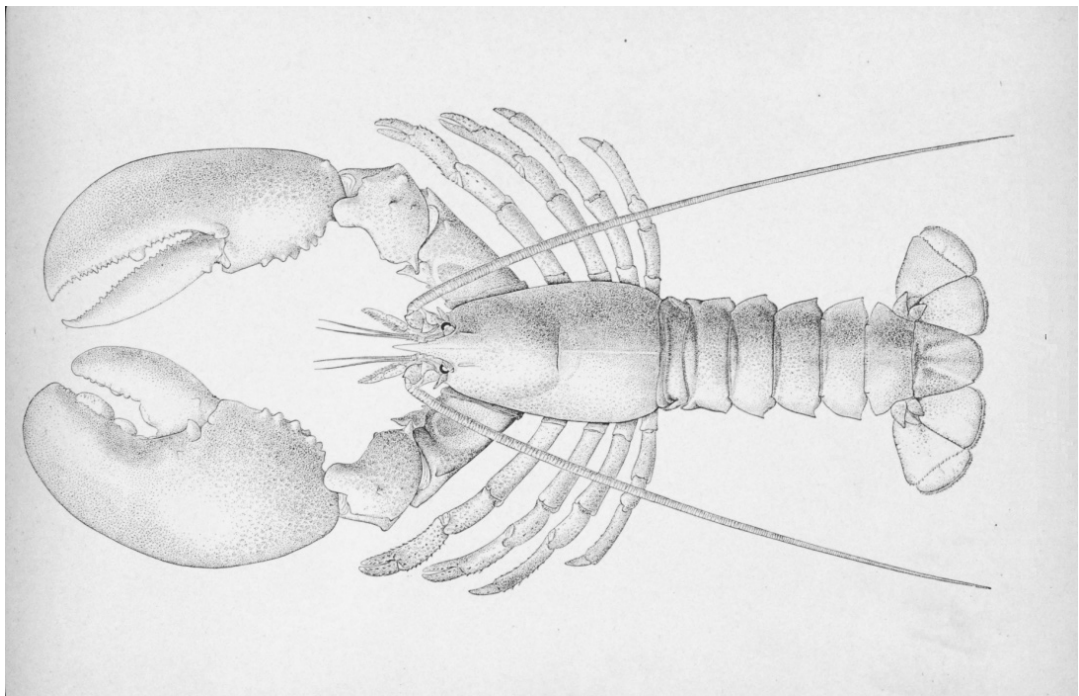


Abb. 5. *Homarus americanus*. a) Ein Prachtexemplar in seiner natürlichen Umgebung [91]. b) Eine Schemazeichnung auf der alle wichtigen Merkmale zu erkennen sind [92].

a



b

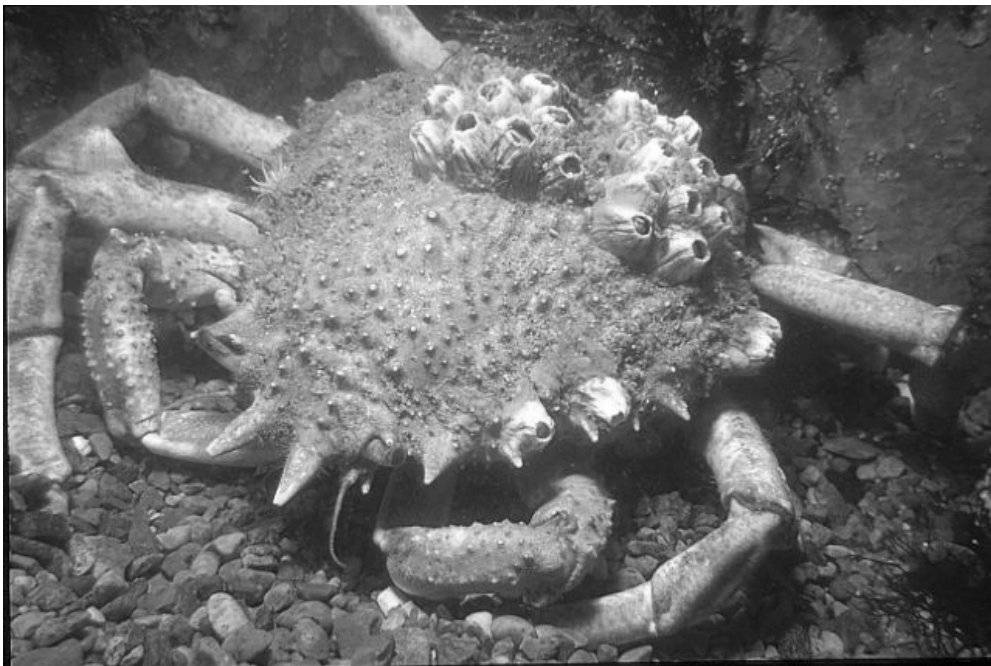


Abb. 6. *Maja squinado*. a) Ein älteres, ungetarntes Exemplar [93]. Auf Abb. b) ist sehr gut der dreieckige Körpergrundriss zu erkennen; das Tier trägt Seeanemonen als Tarnung [94].

2.1.4 Die Große Meerspinne (*Maja squinado*)

Die bis zu 11 cm lange Große Meerspinne (Abb. S. 17) lebt an den europäischen Atlantikküsten und im Mittelmeer und gehört zur Familie der Krabben (Brachyura), einer Unterordnung der Zehnfüßkrebse. Von den Seespinnen oder Dreieckskrabben sind ungefähr 800 Arten bekannt. Ihr auffälligstes Merkmal ist die zwischen 13 und 25 cm lange, sich nach vorn verjüngende Carapax, die den Tieren ihr dreieckiges Aussehen verleiht. Neben orange-braun gefärbten wurden jedoch auch blau gefärbte Tiere gefunden [94]. Die Beine sind spinnenartig dünn und lang, ein Merkmal das bei *Maja squinado* nicht so sehr ausgeprägt ist. Carapax und Beine sind mit Angelhaaren besetzt, an denen die Tiere Algen, Hydrozoen oder Schwammstücke befestigen. Diese lebenden Organismen bedecken so mit der Zeit den gesamten Körper und die Beine der Seespinnen und gewährleisten dem Tier eine hervorragende Tarnung. Von *Maja squinado* ist allerdings bekannt, daß erwachsene Tiere keinerlei Tarnung mehr anlegen [95].

2.2 Das Immunsystem

Vertebraten - und in Ansätzen auch Invertebraten - verfügen zur Aufrechterhaltung ihrer Integrität über ein komplexes, aber sehr wirkungsvolles Immunsystem. Dieses erfüllt Überwachungs- und Abwehraufgaben gegenüber Pathogenen, d. h. krankheitserregende Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren. Andererseits dient es auch der Erkennung und Beseitigung krankhaft veränderten körpereigenen Zellmaterials. Um seiner Aufgabe gerecht zu werden, benötigt das Immunsystem einerseits Erkennungsmechanismen, die "eigen" und "fremd" zu unterscheiden vermögen, andererseits Abwehrmechanismen, durch die eingedrungenen Pathogene neutralisiert oder eliminiert werden können. Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung von Immunreaktionen ist das Erinnerungsvermögen des Immunsystems.

2.2.1 Funktionsweise des Immunsystems

Die Oberflächen aller Körperzellen besitzen ein spezielles Proteinmuster, das für die jeweiligen Individuen charakteristisch ist. Codiert werden diese Proteine vom Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) durch sogenannte MHC-Proteine. Deren Präsentation auf Zelloberflächen bewirkt die Erkennung als "körpereigen" [96]. Zur Unterscheidung von "eigen" und "fremd" dienen als

Antikörper bezeichnete Rezeptoren, welche pathogene Fremdsignale (Antigene) erkennen und mit ihnen Antikörper-Antigen-Komplexe eingehen (Immunkomplexe). Antigene Stoffe sind sowohl körperfremde als auch denaturierte körpereigene Glyko-, Nucleo- oder Lipoproteine in einer Größenordnung von $M_r = 5000$ Da. Alle Substanzen mit kleineren Molekulargewichten wirken erst antigen, wenn sie als Haptene an größere Proteine gebunden präsentiert werden [97].

Für die Immunität bei Wirbeltieren sind die Lymphozyten verantwortlich, weiße Blutzellen, die aus den Stammzellen im Knochenmark gebildet werden und, im Gegensatz zu den roten Blutzellen, das Blutgefäßsystem verlassen können, um in den Interzellulärräumen nach Fremdkörpern zu suchen. Es werden zwei Arten von Lymphozyten unterschieden - die direkt im hämatopoietischen Gewebe gebildeten B-Zellen und die in der Thymusdrüse aus Vorläuferzellen heranreifenden T-Zellen. B-Lymphozyten sind für die humorale, d. h. gegen Bakterieninfektionen und die extrazelluläre Phase von Virusinfektionen gerichtete Immunität verantwortlich und produzieren eine enorme Vielfalt von Proteinen, die als Antikörper oder Immunglobuline bezeichnet und in fünf Klassen eingeteilt werden. Die zellvermittelte Immunität wird von den T-Lymphozyten bewerkstelligt und richtet sich gegen Parasiten, Pilze oder Fremdgewebe. Einen weiteren wichtigen Zelltyp des Immunsystems stellen die Makrophagen, die großen Freßzellen, dar. Sie endocytieren eingedrungene Antigene und präsentieren diese anschließend an ihrer Oberfläche den Lymphozyten zur Erkennung. Vielfach besitzen Antigene mehrere verschiedene Bereiche, sogenannte Determinanten oder Epitope, die zu ganz unterschiedlichen Immunantworten führen können [98].

Antikörper werden stets spezifisch gegen ein Antigen gebildet und sind Glycoproteine (Immunglobuline). Mit Hilfe der membranständigen Antikörper bindet eine B-Zelle ein Antigen, endocytiert es und präsentiert es in Assoziation mit MHC-Molekülen auf seiner Membran. An dieses Assoziat aus Antigen und MHC-Molekül bindet der Rezeptor einer Helfer-T-Zelle. Die auf diese Weise aktivierte T-Zelle bildet Lymphokine, die aktivierte B-Zelle Lymphokinrezeptoren. Unter dem Einfluß rezeptorgebundener Lymphokine differenziert die B-Zelle sich zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle. Die sezernierten Antikörper binden alle vorhandenen Antigene und markieren diese für den Abbau durch Phagozyten. Dieser Vorgang ist die sogenannte "Primärantwort" auf ein Antigen und erfolgt innerhalb weniger Tage. Durch langlebige B- und T-Zellen ist der Organismus jedoch in der Lage ein "Immunologisches Gedächtnis" aufzubauen. Treffen solche Zellen auf ihr spezifisches Antigen, so wird eine erneute Proliferation induziert. Diese sogenannte "Sekundärantwort" oder erworbene Immunität erfolgt sehr viel schneller und stärker als die Primärreaktion und führt zu einem langfristigen Schutz gegen bestimmte Antigene [99].

2.3 Krebs

2.3.1 Ursachen der Tumorbildung

Gegenwärtig sind etwa 100 Krebsarten bekannt, die meist nach dem Organ oder dem Zelltyp benannt werden, in dem sie ursprünglich entstanden sind. Unterschieden werden Karzinome, deren Ursprung in epithelialen Zellen liegt, und Sarkome die aus Bindegewebszellen entstehen. Unter Krebs versteht man die Ausbildung bösartiger (maligner) Tumoren, die durch unregelmäßiges Wachstum von Zellen hervorgerufen werden. Verursacht werden solche Wucherungen durch genetische Veränderungen wie Mutationen, Deletionen oder Gentranslokationen in somatischen Zellen. Durch jede dieser Veränderungen kann es zu einer Aktivierung oder einer Fehlregulierung eines Onkogens kommen. Onkogene sind für die Steuerung des geregelten Wachstums der Zellen zuständig. Man geht heute davon aus, daß die Mehrzahl der Krebsarten durch Umwelteinflüsse generiert wird. Dazu gehören Strahlen (UV-Licht, ionisierende Strahlung), die berufsbedingte Exposition gegenüber bestimmten Substanzen (z. B. Kohlenstaub, Asbestpartikel) aber auch Genußmittel (Tabakinhaltsstoffe) und bestimmte Viren.

Schon 1914 hat Boveri auf die anomale Morphologie der Chromosomen in Krebszellen hingewiesen und es wird heute davon ausgegangen, daß die meisten krebsauslösenden Risikofaktoren einen schädigenden Effekt auf die aus DNA bestehende Erbsubstanz ausüben. Inzwischen konnte durch ausführliche Untersuchungen der RNA-Tumoviren auch die von Hübner und Todaro [100] formulierte Hypothese von der Existenz spezieller Krebsgene belegt werden. Demnach stellen sogenannte Protoonkogene kritische Wirkungsorte in der zellulären DNA dar. Heute sind etwa 40 verschiedene Typen von Onkogenen bekannt, die als Protoonkogene in allen Körperzellen vorhanden sind und z. B. eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen spielen. Es scheint hierbei entscheidend zu sein, daß sie zur rechten Zeit ein- und nach Erfüllung ihrer Aufgabe auch wieder ausgeschaltet werden. Geschieht dies nicht, kann eine Tumorzelle entstehen. Eine andere Gruppe von Genen, die bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielen, sind die Tumor-Suppressor-Gene. Hierbei handelt es sich um Wildtypallele von Genen, die wichtige regulatorische Funktionen z. B. bei der Zellproliferation, Differenzierung oder der Signaltransduktion haben. Im Gegensatz zur aktiven Beeinflussung der Karzinogenese durch Onkogene führt bei den Tumor-Suppressor-Genen eine verminderte Expression zum Krebswachstum. Sowohl Onkogene als auch Tumor-Suppressor-Gene beeinflussen also das Zellwachstum und dessen Regulation. Krebszellen jedoch unterliegen allem Anschein nach nicht mehr diesen Regulationsmechanismen, und so kann es

dazu kommen, daß sich ein Teil oder alle Nachkommen einer Krebszelle unkontrolliert vermehren können, wobei es indirekte Evidenzen gibt, daß viele Tumore klonalen Ursprungs sind, sich also von einer Zelle ableiten lassen. Klinisch sichtbar wird eine Geschwulst erst, wenn sie ungefähr 10^9 Zellen umfaßt, was einem Gewicht von 1 g entspricht. Bis zu dieser Größe hat eine transformierte Zelle etwa 30 Zellteilungen durchlaufen. Nach weiteren 10 Verdoppelungen (10^{12} Zellen) erreicht die Geschwulst ein Gewicht von 1 kg, was der für den Organismus maximal ertragbaren Tumorgröße entspricht. Bis also ein Tumor klinisch festgestellt werden kann, können unter Umständen schon Sekundärtumore an anderen Orten des Organismus entstanden sein [100].

2.3.2 Metastasierung

Das unregelmäßige Wachstum von Zellen und die Bildung eines Tumors sind primär nur insoweit lebensbedrohlich, als die Geschwulst etwa lebenswichtige Organe in ihrer Funktion beeinträchtigt. Als bösartig oder maligne wird ein Tumor dann bezeichnet, wenn er in das normale umgebende Gewebe eindringt oder seine Zellen sich über den Organismus ausbreiten und Tochtergeschwulste (Metastasen) bilden. Diese Metastasierung findet vor allem über das Blutgefäßsystem statt, in welches Tumorzellen sowohl primär nach Überwindung der Basalmembranen und der extrazellulären Matrixkomponente eindringen als auch sekundär über das Lymphgefäßsystem gelangen können. Von den Systemflüssigkeiten werden die Krebszellen dann über weite Strecken in andere Regionen des Körpers transportiert. Auch wenn die Tumorzellen im Blutgefäßsystem vielfältigen Interaktionen mit Blutkomponenten oder dem Immunsystem (z. B. natürliche Killerzellen) ausgesetzt sind, können sich doch die wenigen überlebenden Zellen in engen Kapillargefäßen ablagern und von dort aus in umgekehrter Richtung in extravaskuläre Gewebeschichten eindringen. Hiervon sind besonders Organe wie Lunge und Leber betroffen, die von sehr vielen Kapillargefäßen durchzogen sind. Auffällig ist die Fähigkeit von Krebszellen die Metastasierung zu vererben. Obwohl der klonale Ursprung von Metastasen als gesichert gilt, kommt es im Laufe des Tumorwachstums wiederum zu einer Heterogenisierung und Diversifikation der Zellen, die erneut Metastasen bilden. Tumore durchlaufen in ihrem Wachstum verschieden Versorgungsstadien. Bis zu einer Größe von etwa 1 mm nimmt ein Tumor Nährstoffe durch Diffusion aus der interzellulären Flüssigkeit des umgebenden Gewebes auf. Überschreitet der Tumor diese kritische Größe, induziert er durch Freisetzen von Angiogenesefaktoren das Auswachsen von Blutkapillaren und baut sich damit ein Versorgungssystem auf. Da die Basalmembran an den Spitzen dieser Blutgefäße fragmentiert ist, können Tumorzellen auf diesem

Wege sehr leicht in die Zirkulation gelangen, was einer weiteren Metastasierung Vorschub leistet [101].

2.3.3 Tumorantigene und Immuntherapie

Die Oberfläche von Tumoren ist im Gegensatz zu normalen Zellen in vielen Fällen verändert. Zum einen kann es zu einem Verlust von Oberflächenstrukturen kommen, zum anderen können aber auch tumorspezifische antigene Epitope neu exprimiert werden, die auf herkömmlichen Zellen selten oder gar nicht vorhanden sind. Oft werden Antigene exprimiert, die normalerweise nur auf fötalem Gewebe erscheinen und als onkofötale Antigene bezeichnet werden. Alle diese Antigene sind jedoch körpereigen und lösen deshalb nur untergeordnete Immunreaktionen aus. Etwas anders verhält es sich mit viralen Proteinen, die auf Tumorzellen exprimiert werden, die durch eine Infektion mit einem Tumovirus entartet sind. Bei diesen Epitopen handelt es sich meist um sterisch veränderte Eiweißmoleküle, Kohlenhydratdeterminanten oder Glykolipidstrukturen. Diese können von Antikörpern und von antikörperproduzierenden B-Zellen erkannt werden. Mutierte Peptide, die von MHC-Molekülen auf der Tumoroberfläche präsentiert werden, können von T-Zellen über deren Rezeptor erkannt werden. Trotz veränderter Oberflächenstrukturen, und sogar wenn sie ein antigenes Epitop tragen, lösen Tumore meist keine umfassende Antitumor-Immunantwort aus. Es kommt also offensichtlich darauf an, daß mehr als eine antigenen Determinante auf der Oberfläche eines Tumors erkannt wird. Für die Immuntherapie werden zwei Strategien angewandt. Zum einen wird versucht durch die Gabe bestimmter bakterieller Präparate oder immunmodulatorisch wirksamer biologischer Substanzen eine unspezifische Immunantwort gegen den Tumor auszulösen. Die andere, sogenannte aktiv-spezifische Immuntherapie, arbeitet mit Impfstoffen aus inaktivierten - möglichst körpereigenen - Tumorzellen die, zusammen mit Hilfsstoffen (Adjuvantien), welche die Immunantwort noch zusätzlich verstärken sollen, das Immunsystem gezielt gegen Antigene des Tumors mobilisieren sollen. Alle in Richtung Tumorgenese durchgeführten Untersuchungen liefern Hinweise darauf, daß eine Immunogenisierung durch Lysate von Tumorzellen allein nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu stellen Onkolysate - durch virale Einflüsse zerstörte Tumorzellen - starke Immunogene dar, die z. B. durch Infektion mit einem Virus noch immunogener gemacht werden, wobei das infizierende Virus eine wichtige Rolle als Adjuvans spielt [101]. Die Tatsache, daß eine spezifische Immuntherapie vor allem bei metastasierenden Tumoren jedoch sehr oft fehlschlägt, läßt sich mit der Diversifizierung der

Metastasezellen erklären, die dadurch bestimmte antigene Epitope verlieren oder hinzugewinnen und daraufhin vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden ("Immune-Escape"-Mechanismus).

Tabelle 2. Verschieden Formen der Immuntherapie.

Therapie	Wirkungsweise
Aktive Immuntherapie	Immunsystem wird spezifisch mit Tumorstoffen stimuliert
Adoptive Immuntherapie	Immunkapazität wird durch Transfer von immunen und aktivierten Lymphozyten erweitert
Restaurative/immunmodulierende Immuntherapie	Einsatz von BRM oder Cyclophosphamid um Defizienzen auszugleichen und suppressorisch wirkende Einflüsse zu inhibieren
Passive Immuntherapie	Transfer von Antiseren und (monoklonalen) Antikörpern bzw. Antikörper-Toxin-Konjugaten (Immunotoxine)

Zur Immuntherapie stehen heute Verfahren zur Verfügung, die in vier Gruppen eingeteilt werden können (Tabelle 2). Obwohl bei dieser großen Vielfalt von Verfahren ein enormes Potential für Therapiemöglichkeiten geboten ist, gibt es bis heute für keine bedeutende Krebserkrankung eine adäquate Immuntherapie. Große Fortschritte auf den Gebieten der Immunologie und Molekularbiologie ermöglichen heute die Herstellung von Wirkstoffen wie Lymphokinen, Wachstumsfaktoren oder monoklonalen Antikörpern in reiner Form und großen Mengen. Dies läßt hoffen, daß in Zukunft die natürlich gegebenen Wirkungen des Immunsystems auch klinisch nutzbar gemacht werden und die Diagnose und Therapiemöglichkeiten von Krebserkrankungen wesentlich verbessert werden können.

2.3.4 KLH als Antigen und Haptenträger

Das Hämocyanin der Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocyanin, KLH) wurde 1967 erstmals zur Überprüfung des Immunstatus am Menschen eingesetzt [102]. Das Hämocyanin schien hierfür besonders geeignet, da es sich bei ihm um ein

starkes immunogenes Glykoprotein einer nicht zum Verzehr geeigneten Meeresschnecke handelt. Dadurch konnte ein unkontrollierter Kontakt nahezu ausgeschlossen werden und zudem wies das Hämocyanin ein geringes Allergie- und Anaphylaxerisiko auf. Der amerikanische Urologe Olsson verwendete 1974 ebenfalls KLH zu immunodiagnostischen Zwecken bei Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom [103]. In der Folgezeit wurde festgestellt, daß die überprüften Tumorpatienten weniger Rezidive entwickelten als die nichtgetesteten Patienten. Während das Harnblasenkarzinom in den ersten beiden Jahren nach der Primäroperation bei 50 bis 90% der Patienten rezidiert, sinkt diese Rezidivrate nach einer prophylaktischen Immunocyaninbehandlung auf etwa 30%. Als Immucothel® ist Immunocyanin seit 1997 in den Niederlanden als Therapeutikum zur Behandlung von Harnblasenkarzinom zugelassen. Lange Zeit war der klinische Einsatz von KLH durch seine mangelhafte Stabilität in Lösung eingeschränkt [104] und erst die Aufspaltung in die Untereinheiten, die als Lyophilisat über mehrere Jahre hinweg stabil bleiben (Immunocyanin), und deren Reassoziaton unter physiologischen Bedingungen [105], führten zu einem klinisch verwertbaren Produkt. Die immunmodulatorische und antitumorale Wirkung des Hämocyanins läßt sich zum Teil mit der Feinstruktur und den antigenen Determinanten auf der Oberfläche der Hämocyaninproteine erklären. Es wurden Sekundärstrukturen aufgeklärt, die in verblüffender Weise der Grundstruktur von Immunglobulinen, Histokompatibilitätsmolekülen oder Bence-Jones-Proteinen gleichen [106]. Immunocyanin gehört als Immunmodulator zur Gruppe der BRM-Substanzen (biological response modifier), der T-Lymphozyten aktiviert und das T4/T8-Verhältnis zugunsten der Helfer-T-Zellen verschiebt, wodurch es am Ort der Applikation zu einer Invasion von Makrophagen kommt.

Neben dieser direkten therapeutischen Bedeutung wird KLH bzw. Immunocyanin verstärkt als Haptenträger verwendet. Nachdem zunehmend Resistenzphänomene von Erregern gegenüber Antibiotika beobachtet wurden, wurde nach neuen Wegen auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung gesucht. Fortschritte in der Biochemie und der Mikrobiologie ermöglichen heute die Isolierung von Bestandteilen der Zellmembran von Bakterien oder Viren und deren vollständige strukturelle Aufklärung. Diese für den Erreger spezifischen Moleküle können dann synthetisiert und als Impfstoff eingesetzt werden. Nun besitzen solche Bruchstücke jedoch oft geringere Molekülmassen als sie für die Erkennung durch das Immunsystem notwendig wären (siehe Kap. 2.3.1) und somit auch eine geringere Antigenität. Diese kann erhöht werden, indem das niedermolekulare Erregerbruchstück als Hapten an einen entsprechend großen, stark antigen wirkenden Träger gebunden und auf diese Weise dem Immunsystem präsentiert wird. Als Träger werden verschiedene Albumine, Globuline oder Toxine verwendet. Wegen seiner starken antigenen

Wirkung wird jedoch immer häufiger KLH bzw. Immunocyanin als Haptenträger eingesetzt. In der Form des Immunocyanins ist es aufgrund der vergrößerten Oberfläche möglich, die Antigene in hoher Anzahl zu präsentieren, was zu einer ausgeprägten Antihapten-Antwort führt. Diese Strategie wird neuerdings auch verstärkt in der Tumorbekämpfung eingesetzt. Nach der Identifizierung von Strukturen, die auf der Tumorzelloberfläche exprimiert werden und vom Immunsystem toleriert werden, sollen diese mit Hilfe von Haptenträgern oder Adjuvantien antigenisiert werden, um eine gezielte Immunreaktion gegen den gesamten Tumor auszulösen [104]. Wenn es also in Zukunft gelingen würde, ein umfassendes Reservoir an tumorspezifischen Strukturen zu identifizieren und zu synthetisieren, könnten mit KLH als stark antigen wirkendem Haptenträger weitreichende Erfolge in der Bekämpfung von frühen Tumorstadien erzielt werden.

2.4 Ausgewählte, eingesetzte Untersuchungsmethoden

2.4.1 Matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie

Die Matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist eine attraktive Methode mit der unter sehr geringen Aufwand an Probenvorbereitung exakte und reproduzierbare Massenbestimmungen durchgeführt werden können.

1985 entwickelten Hillenkamp und Karas [107] die matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie von Biomolekülen und deren Massenbestimmung über Flugzeitanalyse (TOF, time-of-flight). Hierbei erfolgt die Ionisation unter vermindertem Druck, wobei eine wesentliche Voraussetzung für das Gelingen der Messungen ist, daß die Probe sich unzersetzt verdampfen läßt. Die Probe wird mit einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung (337 nm, ca. 3 ns Pulsbreite) beschossen, wobei die Laserstrahlung durch eine Quarzlinse fokussiert wird. Die entstehenden Ionen bewegen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen unterschiedlich schnell und werden mit einem linearen oder einem Reflektron-Flugzeitanalysator getrennt und analysiert. Es ist zu beachten, daß Reflektron-Flugzeitanalysatoren eine höhere Massenauflösung gewährleisten, jedoch im detektierbaren Massenbereich eingeschränkt sind.

Für die Messungen werden Proben in einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 10^{-4} M eingesetzt [108]. Auf einen Probenträger wird Matrixlösung aufgetragen und angetrocknet. Auf diese erste Matrixschicht werden 0.1 bis 0.5 μ L Probenlösung aufgetragen und nach dem Trocknen von einer weiteren Schicht Matrixlösung bedeckt (Sandwich-Verfahren). Die Matrix liegt somit in einem 1000- bis 10000-fachen Überschuß vor. Abhängig von der Substanzklasse und dem

Wellenlängenbereich des benutzten Lasers werden unterschiedliche Substanzen als Matrix verwendet. Für Peptide, Proteine und Glycoproteine hat sich α -Cyano-4-hydroxycyansäure als am geeignetsten erwiesen. Die Matrixmoleküle absorbieren die Laserenergie und lösen sich von der Oberfläche des Probensträgers, wobei sie die Probenmoleküle in die Gasphase transportieren. Angeregte, ionisierte Matrixmoleküle übertragen ein Proton auf die Probenmoleküle. Außerdem verhindert die Matrix eine Assoziation der Probenmoleküle und deren Zerfall, da sie den Hauptanteil der Laserenergie absorbiert. Die ionisierten Moleküle werden mit einer Spannung von 20 keV in ein Hochvakuum beschleunigt. Da die Ionen somit alle die selbe kinetische Energie besitzen, wirkt nur ihre Masse entscheidend auf die Geschwindigkeit, mit der sie sich bewegen. Durch die Aufnahme des Detektorsignals als Funktion der Zeit werden Spektren mit nach den Massen gestaffelten Peaks erhalten.

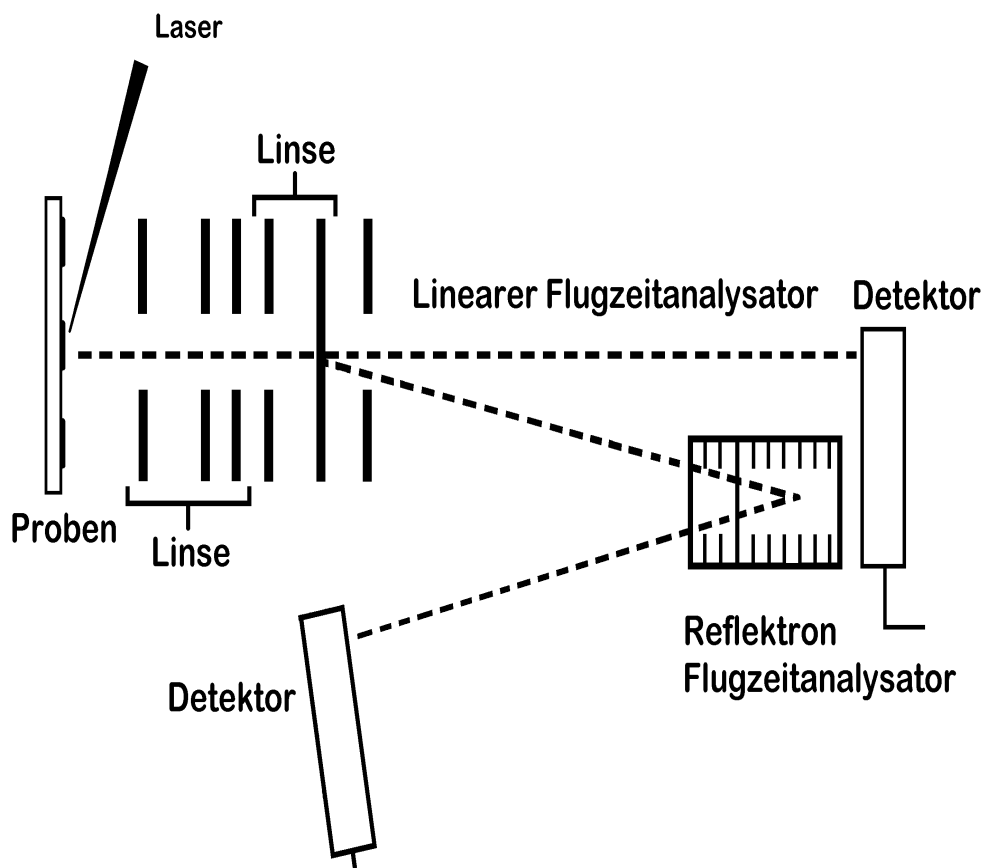


Abb. 7. Prinzip der Matrixunterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie.

Ein klarer Vorteil der MALDI-MS liegt in der Möglichkeit, unfragmentierte Proben zu vermessen, die überwiegend die Massen $z = [\text{MH}]^{+1}$ und $[\text{MH}]^{+2}$ aufweisen. Die Verwendung eines internen Standards erlaubt die Bestimmung der Molekülmasse mit einer Genauigkeit von bis zu 0,01%. Da

die Massenpeaks, wie schon erwähnt, nach ihrer Masse über eine Zeitachse verteilt im Spektrum erscheinen, ist es auch möglich, Peptidgemische, wie sie beispielsweise bei einem enzymatischen Verdau auftreten, direkt zu vermessen. Außerdem ist die LD-MS gegenüber Puffersalzen und Detergentien unempfindlich und erlaubt die Erfassung eines Massenbereiches von 100 bis 100000 D mit einer Empfindlichkeit von weniger als 1 pmol. Mit Na^+ - und K^+ -Ionen, die in Spuren immer in einer Probe vorliegen, können Addukte gebildet werden, die mit den Massen $[\text{MNa}]^+$ oder $[\text{MK}]^+$ die jeweiligen Probenpeaks begleiten oder sogar überlagern.

2.4.2 Sequenzanalyse

Die Kenntnis der Struktur von Proteinen als den Trägern biologischer Funktionen ist nach wie vor von höchstem Interesse. Struktur und Funktion eines Proteins werden bestimmt und beeinflusst von der Abfolge der das Protein aufbauenden Aminosäuren, der Aminosäuresequenz. Zur Aufklärung solcher Sequenzen, welche die Primärstruktur eines Proteins darstellen, wurden vielfältige Anstrengungen unternommen. Mit der Entschlüsselung der vollständigen Sequenz des Insulins, eines aus zwei, über zwei Disulfidbrücken miteinander verbundenen Peptidketten von je 21 bzw. 30 Aminosäureresten bestehenden Proteins durch Sanger *et al.* [109] war erstmals der Nachweis erbracht, daß spezifische Proteine genau definierte Aminosäuresequenzen besitzen. Sanger benutzte für die Identifizierung der Aminosäuren die von ihm entwickelte Endgruppenmarkierung, bei der die N-terminale Aminosäure mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol umgesetzt wird. Durch Hydrolyse wird die so markierte AS freigesetzt und kann identifiziert werden. Der große Nachteil dieser Methode ist es allerdings, daß durch die Hydrolyse alle Peptidbindungen zerstört werden, und deshalb nicht sequentiell analysiert werden konnte. Dieses Problem wurde von Edman [110] insofern gelöst, als er zur Umsetzung der N-terminalen AS Phenylisothiocyanat verwendete. In Anwesenheit von Säure erfolgt eine Umlagerung des Phenylisocabamyl-Derivates (PTC) wobei das Schwefelatom die Peptidbindung nucleophil angreift und hydrolisiert. Neben einer Anilinothiozolinon(ATZ)-Aminosäure entsteht wieder ein neuer N-Terminus. Nach Abtrennung des ATZ-Derivates kann ein neuer Abbauzyklus ablaufen. Das ATZ-Derivat wird unter dem Einfluß wässriger Säure in das stabile, UV-absorbierende 3-Phenyl-2-thiohydantoin(PTH)-Derivat der Aminosäure konvertiert das in einer Verteilungschromatographie identifiziert werden kann. Mit der Methode von Edman war es somit möglich eine Sequenz vom N-Terminus her zu bestimmen. Die Edman-Technologie fand ihren Niederschlag in der Entwicklung des Spinning-Cup-Proteinsequenators [111], eines Flüssigphasensequenators, den die Firma Beckmann Instruments

1969 auf den Markt brachte und mit dem ein rasanter Aufschwung im Bereich der Proteinsequenzierung möglich wurde. Ein wesentliches Problem war, daß während der verschiedenen Reinigungsschritte das Protein nach und nach ausgewaschen wurde, ein Umstand der stark limitierend auf die Effizienz der Sequenzierung wirkte. Weitere Verbesserungen (Festphasensequenator [112]) führten schließlich zur Entwicklung der adsorptiven Sequenzierungsstrategie, bei der das Reaktionsgefäß mit polyquarternären Amin-Polybrenen vorbehandelt wird, die das Protein über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen binden. Mit dem Einsatz von Polybren wurde das Auswaschverhalten günstig beeinflusst, was zu einer weiteren Verminderung der zu einer Sequenzierung benötigten Probenmenge in den Nanomolbereich führte.

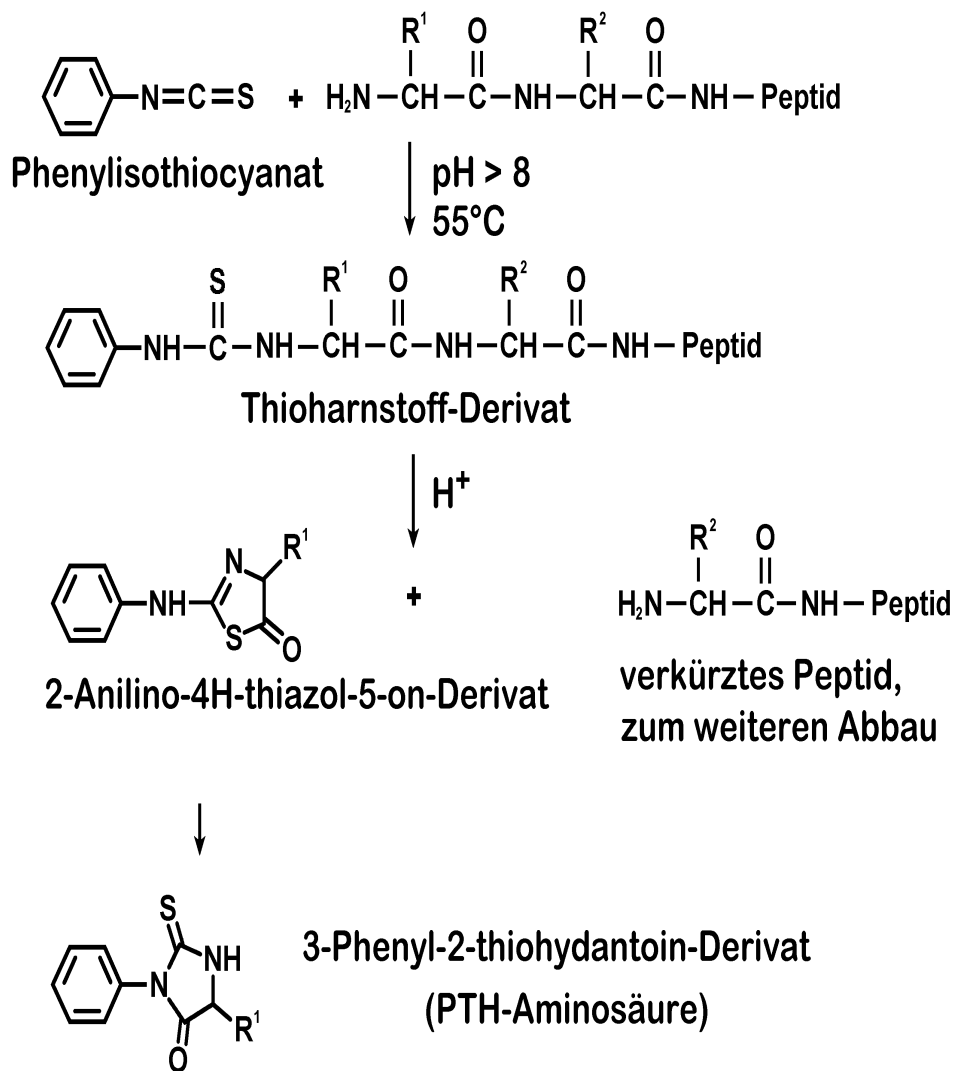


Abb. 8. Der Edman-Abbau.

Im Jahre 1981 veröffentlichten Hewick und Hunkapiller ein völlig neues Konzept für einen Proteinsequenator [113]. Wesentliches Merkmal dieser sogenannten Gasphasensequenzierung war die gasförmige Zuführung der die Kupplung des PITC katalysierenden Base und der die Abspaltungsreaktion katalysierenden Säure. Dies ermöglichte das Auftragen des Proteins auf eine Matrix (Glasfaserfilter, das zuvor mit Polybren behandelt wurde) an die es nicht mehr kovalent gebunden werden mußte. Die zur Sequenzierung benötigte Probenmenge konnte auf Mengen zwischen 100 pmol und 1 nmol reduziert werden. Der Einsatz flüssiger TFA zur Abspaltung der ATZ-Aminosäure konnte zur Extraktion des Aminosäurederivates genutzt werden. Um eine Auswaschung des Proteins zu verhindern werden jetzt spezielle Membranen aus Fluorpolymer (PVDF) benutzt. Die Zuführung der Reagentien und des Schutzgases erfolgt totvolumenfrei über spezielle Ventilblöcke. Eine bikonische Reaktionskammer mit einem Volumen von 150 µL wird von zwei Glasblöcken gebildet, die thermostatisierbar sind. Nach der Abspaltung der ATZ-Aminosäure wird diese direkt in eine ebenfalls thermostatisierte Glasflasche überführt und in das PTH-Derivat konvertiert. Aus dieser "Conversion flask" wird die PTH-Aminosäure in ein HPLC-System eingetragen und mittels einer Verteilungschromatographie identifiziert. Der in Abb. 6 dargestellte Edman-Abbau verläuft in drei Schritten: Kupplung, Spaltung, Umlagerung. Jeder Reaktionsschritt erfordert andere chemische Bedingungen. Unter milden alkalischen Bedingungen (TMA in Wasser oder N-Methylpiperidin in Wasser/Methanol) wird PITC mit der N-terminalen Aminogruppe des Proteins verknüpft und bildet das PTC-Addukt. Dieser Schritt wird von zwei Nebenreaktionen begleitet, deren Produkte für prominente Peaks im HPLC-Chromatogramm verantwortlich sind, die auch zur Kontrolle der Reagenzverfügbarkeit herangezogen werden können. TMA bildet DMA, welches mit PITC zu Dimethylphenylthioharnstoff (DMPTU) reagiert. Durch Hydrolyse von PITC entsteht Diphenylthioharnstoff (DPTU). DMPTU, DPTU, überschüssiges PITC und überschüssige Base werden mit Ethylacetat aus dem System entfernt. Im nächsten Schritt erfolgt mit wasserfreier TFA die Spaltung des PTC-Proteins in das cyclische ATZ-Derivat und das nun um eine Aminosäure verkürzte Peptid mit einer neuen freien Aminogruppe. Die ATZ-Aminosäure wird mit Ethylacetat in die 'Conversion flask' überführt und durch Behandlung mit TFA und Wasser in die stabilere PTH-Aminosäure umgelagert. Die PTH-Aminosäure wird in Acetonitril gelöst, in ein Umkehrphasen-HPLC-System überführt. Das UV-absorbierende PTH-Derivat wird bei 269 nm detektiert und über seine Retentionszeit identifiziert.

2.4.3 Zirkulardichroismus

Eine linear polarisierte Welle läßt sich in zwei zirkular polarisierte Komponenten zerlegen, bei denen die E-Feldvektoren um die Ausbreitungsrichtung rotieren. Es werden rechts- und linkspolarisierte Vektoren unterschieden. Unterscheiden sich die beiden Wellen in ihrer Amplitude, so entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Linear polarisiertes Licht wird durch Polarisationsfilter erzeugt, Materialien, die vorwiegend für eine bestimmte Richtung des Lichts durchlässig sind. Meist werden Folien mit einer speziellen Kristallanordnung verwendet oder aber Polarisatoren deren Wirkung auf Doppelbrechung, Streuung oder Reflexion beruht. Zirkular polarisiertes Licht wird dadurch erzeugt, daß zwei linear polarisierte Wellen um eine viertel Wellenlänge gegeneinander verschoben werden. Der resultierende Summenvektor durchläuft dabei eine Spiralbahn um die Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Der Gangunterschied von 90° wird durch sogenannte $\lambda/4$ -Plättchen, die aus doppelbrechenden Kristallen in geeigneter Schichtdicke bestehen, erzeugt. Durch Neigung der Polarisationssebene um 45° bzw. $315^\circ (= -45^\circ)$ gegen die optische Achse entsteht rechts- bzw. linkszirkular polarisiertes Licht. Um beide Komponenten messen zu können muß das $\lambda/4$ -Plättchen um 90° gedreht werden. Die Drehung des Viertelwellenlängenplättchens wird durch Ausnutzung des piezoelektrischen Effektes im Kristall erreicht (CD-Modulator). Nach dem Durchstrahlen der Probe mißt ein Photomultiplier abhängig im Takt des CD-Modulators die Lichtintensitäten I_L und I_R . Durchläuft nun linear polarisiertes Licht eine optisch aktive Substanz, so können nicht nur die Lichtgeschwindigkeiten der beiden zirkular polarisierten Komponenten, sondern auch die Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R verschieden sein. Die stärkere Absorption einer Komponente macht sich durch die Verkürzung des entsprechenden Vektors bemerkbar, was zu elliptisch polarisiertem Licht führt. Der resultierende Unterschied $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ ist die eigentliche Meßgröße der CD-Spektroskopie [114]. Der Zirkulardichroismus kann außerdem durch die Elliptizität quantifiziert werden

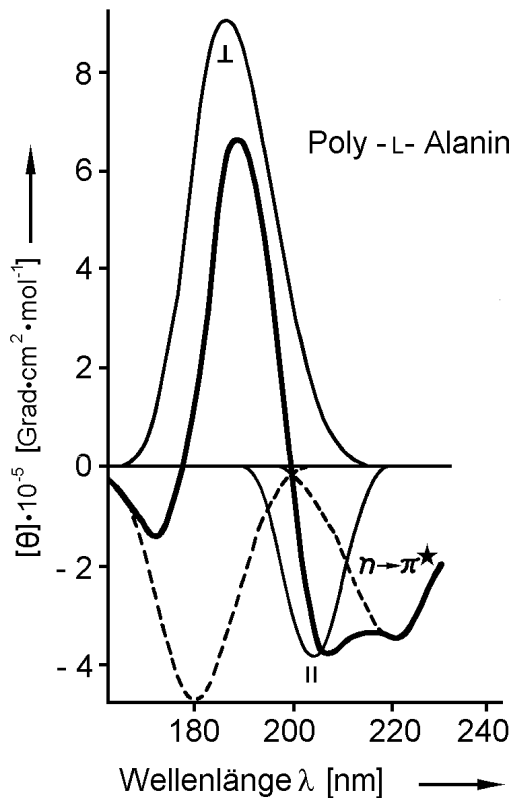
$$\Theta_{(\lambda)} = \text{konst} \cdot (\varepsilon'_L - \varepsilon'_R) \cdot c \cdot d \text{ [Grad]} \quad (1)$$

mit der Schichtdicke d in cm, der Konzentration c in $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ und dem Extinktionskoeffizienten ε' in $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$. Der Vorfaktor $\text{konst} = \ln 10 \cdot 180 \cdot (2\pi)^{-1}$ hat einen Betrag von ungefähr 33. Die molare Elliptizität wird mit

$$[\Theta]_\lambda = M_r \cdot \Theta_{(\lambda)} \cdot (10 \cdot c \cdot d)^{-1} [\text{grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}] \quad (2)$$

angegeben, mit der Molekülmasse M_r in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Wird der molare Extinktionskoeffizient verwendet erhält man $[\Theta]_\lambda = 3300 \cdot \Delta\epsilon$. Die Abhängigkeit der Elliptizität des Lichts ergibt das CD-Spektrum in Form einer Absorptionsbande, wobei wieder ein positiver bzw. negativer Zirkulardichroismus unterschieden wird, je nachdem, ob die rechts- oder die linkszirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird.

a



b

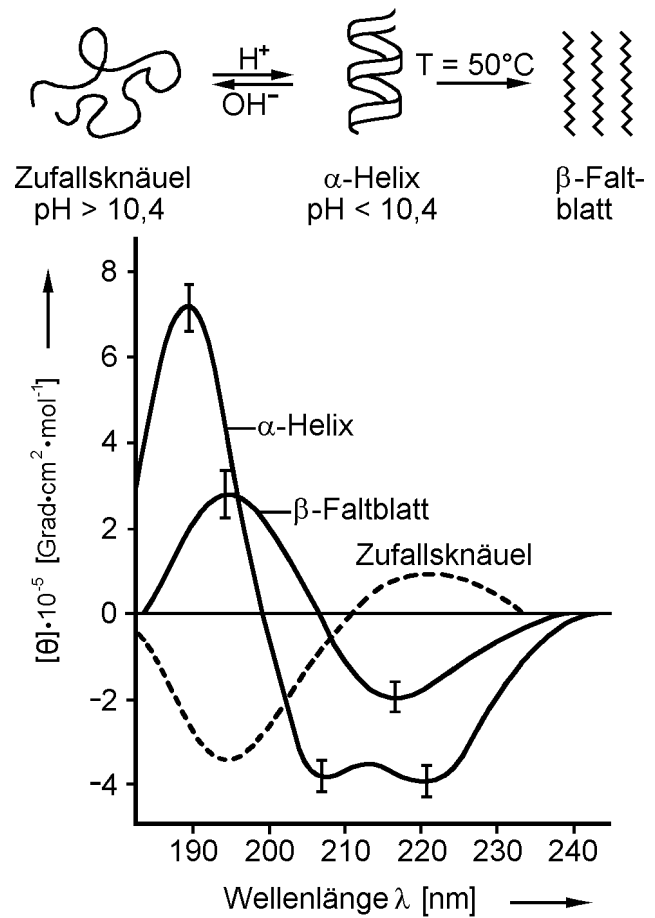


Abb. 9. a) Die ein CD-Spektrum generierenden Banden des parallel () und senkrecht (\perp) polarisierten $\pi \rightarrow \pi^*$ -Überganges bei 190 bzw. 204 nm und des $n \rightarrow \pi^*$ -Überganges bei 220 nm am Beispiel der α -Helix-Form des Poly-L-Alanins [115]. b) Die in der CD-Spektroskopie auftretenden Cotton-Effekte für α -Helix-, β -Faltblatt- und Random Coil-Strukturen [116].

Optische Aktivität kann sowohl durch chirale C-Atome als auch durch eine chirale Kristallstruktur verursacht werden. Asymmetrische Sekundärstrukturen in Proteinen, wie z. B. eine α -Helix,

erzeugen optisch aktive Chromophore durch Bildung gekoppelter Oszillatoren ohne Symmetrieebene oder -zentrum. Hier resultiert die Chiralität also aus der Struktur eines Makromoleküls. Typische Sekundärstrukturen sind neben der α -Helix, die β -Faltblattstruktur und Bereiche ungeordneter Zufallsknäuel (random-coil). Neben diesen Strukturen, deren Cotton-Effekte zu typischen Absorptionsbanden führen (Abb. 8b), werden im Absorptionsspektrum in einem Bereich von 180 bis 240 nm auch $\pi \rightarrow \pi^*$ - und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge aufgenommen (Abb. 8a) [115]. Die Überlagerung aller Banden führt zu einem typischen Spektrum (Abb. 9), aus dem durch Vergleich mit Standardsubstanzen dann die unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile berechnet werden können [116].

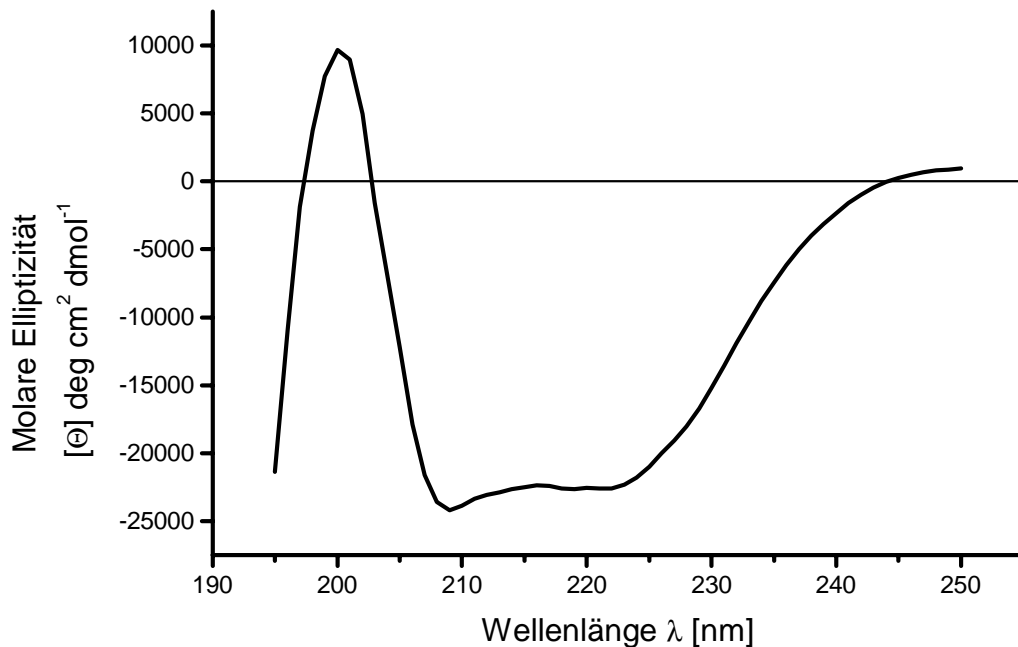


Abb. 10. CD-Spektrum der Funktionellen Einheit KLH2-c von *Megathura crenulata*. Die Ordinate wurde unter Zugrundelegung von 420 AS-Resten und der Molekülmasse von 56126 Da kalibriert. Proteinkonzentration: $0.22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Puffer: Natriumhydrogenphosphat (pH 7.0).

2.4.4 Fluoreszenzspektroskopie

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung mit einer Frequenz im ultravioletten oder sichtbaren Bereich führt zu einem elektronisch angeregten, energiereicheren Zustand eines Moleküls. Die aufgenommene Energie kann sowohl strahlungslos als auch unter Emission von Strahlung (Luminiszenz) wieder abgegeben werden. Die Luminiszenz wird in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Fluoreszenz und Phosphoreszenz wird vor allem bei aromatischen

oder heterocyclischen Molekülen beobachtet, insbesondere wenn zwei oder mehr kondensierte Ringe vorhanden sind. Durch Absorption eines Photons können die π -Elektronen von bindenden π -Orbitalen in nichtbindende π^* -Orbitale höherer Energie überführt werden. Je nach Orientierung des Spins entstehen angeregte Singulett- ($S = 0$) oder Triplettzustände ($S = 1$), wobei die Energie der Triplettzustände niedriger ist als die der entsprechenden Singulettzustände [117].

Die Fluoreszenz einer Substanz kann stark von ihrer Umgebung beeinflusst werden. So kann z. B. durch Löschermoleküle (Quencher) die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluorophors herabgesetzt werden. Hierbei wird der Absorptionsprozeß des Fluorophors nicht gestört, sondern die Energie des angeregten Zustandes wird strahlungslos auf die Löschermoleküle übertragen. Für die dynamische Fluoreszenz-Löschung gilt, daß bei konstanter Konzentration des Fluorophors die Übergangsrates k_Q für die Fluoreszenzlöschung proportional zur Konzentration c_Q der Löschermoleküle ist:

$$k_Q = K_{SV} \cdot c_Q \quad (3)$$

Die Proportionalitätskonstante K_{SV} wird als Löscherkonstante bezeichnet. Unter Berücksichtigung der Proportionalität von Quantenausbeute und Fluoreszenzbanden-Intensität ergibt sich die Stern-Volmer-Gleichung:

$$(F_0 \cdot F^{-1}) - 1 = K_{SV} \cdot c_Q \cdot \tau_0 \quad (4)$$

mit F_0 und F als der Fluoreszenzintensität ohne bzw. mit Löschermolekülen. Wird $(F_0 \cdot F^{-1}) - 1$ in einem Diagramm gegen verschiedene Konzentrationen c_Q an Löschermolekülen aufgetragen, kann bei bekannter Lebensdauer τ_0 aus der Steigung der Geraden die Löscherkonstante bestimmt werden.

Durch die Verwendung von spezifisch geladenen Ionen ist es möglich, Rückschlüsse auf die Mikroumgebung von aromatischen Resten in Proteinen zu ziehen, weil durch die geladenen Löschermoleküle eine zusätzliche Verstärkung oder Abschwächung der Fluoreszenzlöschung beobachtet werden kann. Auch hier ist die Kenntnis von τ_0 unabdingbar. Um ohne die Kenntnis der Lebensdauer τ_0 arbeiten zu können, wird durch die Verwendung zweier entgegengesetzt geladener Ionen mit ungefähr gleichem Ionenradius, z. B. Cs^+ und I^- ein elektrostatischer Parameter E eingeführt, der in folgendem Zusammenhang steht

$$E = K_{SV}^- \cdot (K_{SV}^+)^{-1} \quad (5)$$

mit K_{SV}^+ = Löscherkonstante eines positiv geladenen Löschermoleküls und K_{SV}^- = Löscherkonstante eines negativ geladenen Löschermoleküls [118].

Für die statische Fluoreszenzlöschung gelangt man trotz anderer Voraussetzungen zu demselben Ergebnis jedoch ohne die zusätzliche Abhängigkeit von der Lebensdauer des angeregten Fluorophors, was eine Unterscheidung der beiden Prozesse ermöglicht.

$$(F_0 \cdot F^{-1}) - 1 = k_a \cdot c_Q \quad (6)$$

In beiden Prozessen findet man eine lineare Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses ($F_0 \cdot F^{-1}$) von der Konzentration der Löschermoleküle.

Die Fluoreszenzstrahlung eines Moleküls ist außer durch die Wellenlänge bzw. Frequenz auch durch ihre Polarisationsrichtung, d. h. durch die Richtung des elektrischen Feldstärkevektors, charakterisiert. Die Emission von Fluoreszenz wird durch das Emissions-Übergangsdipolmoment μ_E beschrieben. In einem molekularen Achsensystem haben Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment eine definierte Orientierung und sind deshalb von der Bewegung der Moleküle abhängig. Aus der Analyse der Polarisation von Fluoreszenzstrahlung können Aussagen über die Rotationsbeweglichkeit, die Orientierung, sowie über die Viskosität in der Umgebung der betrachteten Moleküle getroffen werden. Das polarisierte Licht wird in der x-Richtung eines Moleküls eingestrahlt und in y-Richtung werden die Komponenten der Fluoreszenzintensität parallel (F_{\parallel}) und senkrecht (F_{\perp}) zur einfallenden Strahlung detektiert. Als quantitatives Maß für die Polarisation werden der Polarisationsgrad P bzw. die Anisotropie A definiert.

$$P = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + F_{\perp}} \quad (7)$$

$$A = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}} \quad (8)$$

Für $P \rightarrow 0$ ist die Strahlung nicht polarisiert ($F_{\parallel} \cong F_{\perp}$), für $P = 1$ ist die Strahlung vollständig polarisiert. Die Polarisation kann auf zwei Arten gemessen werden. Mit kontinuierlich eingestrahlttem Licht, werden gemittelte Intensitätswerte für F_{\parallel} und F_{\perp} gemessen, was zu zeitlichen Mittelwerten für P und A führt. Zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Polarisation wird die Probe mit einem kurzen Laserpuls angeregt und der zeitliche Verlauf der Intensitäten $F_{\parallel}(t)$ und $F_{\perp}(t)$ gemessen. Beide Fluoreszenz-Intensitäten klingen exponentiell mit der Zeit ab. In

unmittelbarem Anschluß an den Laserpuls ist die Polarisierung der Fluoreszenz durch die Anisotropie der Absorption gegeben. Moleküle, die zu einem späteren Zeitpunkt fluoreszieren, haben dagegen schon eine mehr oder weniger starke Rotationsbewegung ausgeführt. Die Messung der Fluoreszenz-Polarisierung in Abhängigkeit der Zeit nach dem Puls zeigt daher eine Abnahme von P_0 bzw. A_0 auf einen Endwert, der durch Fluoreszenz-Lebensdauer und Rotationskorrelationszeit bestimmt ist. Kugelförmige Moleküle zeigen eine exponentielle Abnahme der Polarisierung. Die Zeit in der der Polarisierungsgrad bzw. die Anisotropie gerade auf den Bruchteil $1 \cdot e^{-1}$ ihres ursprünglichen Wertes zurückgegangen sind, entspricht der Rotationskorrelationszeit τ_c , die direkt aus dem Experiment bestimmt werden kann.

III. Themenstellung

Seit bei Untersuchungen zur Immunstabilität von Karzinompatienten festgestellt wurde, daß die Applikation des Hämocyanins der kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke *Megathura crenulata* (Keyhole Limpet Hemocyanin - KLH) eine überaus starke Immunantwort auslöst [102], rückte dieses Makroprotein immer mehr in den Mittelpunkt des medizinischen Interesses, besonders im Bereich der Immunologie. Noch weiter gesteigert wurde das wissenschaftliche Interesse an KLH, als beobachtet wurde, daß bei Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkrebs nach Verabreichung von KLH-Präparaten die Rezidivrate des Karzinoms um bis zu 90% reduziert wurde [103, 119]. Grzych *et al.* [120] berichteten über eine spezifische Immunantwort auf KLH bei Schistosomias(Bilharziose)-Patienten, was z. B. zur Entwicklung eines Detektionsverfahrens für Bilharziose mit KLH führte [121].

Als problematisch gestaltet sich allerdings immer mehr die Gewinnung des Proteins aus lebenden Tieren, die zunehmend von restriktiven Artenschutzgesetzen eingeschränkt wird. Da KLH in großen Mengen zur Antikörpergewinnung medizinisch eingesetzt wird, wäre die Synthese von immunologisch relevanten Fragmenten von Interesse. Hierzu muß jedoch die genaue Struktur von KLH bekannt sein. Ein erster Schritt dazu ist die Aufklärung der Primärsequenz der beiden strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels geeigneter enzymatischer und chemischer Fragmentierungen und anschließender Sequenzierung durch Edman-Abbau die Primärstruktur der funktionellen Einheit KLH2-c aufzuklären. Zur Ermittlung verschiedener proteinchemischer Eigenschaften sollen das native KLH, seine beiden Untereinheiten KLH1 und KLH2, und die funktionelle Einheit KLH2-c mit spektroskopischen Methoden auf ihr Verhalten gegenüber denaturierenden Einflüssen wie Temperatur, pH-Wert, Guanidinhydrochlorid und Harnstoff untersucht werden. Die für das Molluskenhämocyanin gewonnenen Erkenntnisse sollen mit Hämocyaninen der Arthropoden *Homarus americanus* und *Maja squinado* verglichen werden.

Mit der Arbeit soll durch die Strukturaufklärung von KLH2-c nicht nur ein Beitrag zur medizinischen Anwendung von KLH geleistet, sondern durch vergleichende Betrachtung von Mollusken- und Arthropodenhämocyaninen sollen auch weitere Erkenntnisse über den phylogenetischen Zusammenhang zwischen beiden Proteinspezies gewonnen werden.

IV. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 und die Aufklärung der Primärstruktur der Funktionellen Einheit KLH2-c des Hämocyanins von *Megathura crenulata*

4.1.1. Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 des Hämocyanins von *Megathura crenulata*

4.1.1.1 Isolierung von KLH1 und KLH2 aus IMMUCOTHEL®

Aufbauend auf früheren Veröffentlichungen [122] und unter Verwendung einer neuartigen Anionenaustauscher-Trennsäule wurden die beiden Untereinheiten KLH1 und KLH2 direkt aus IMMUCOTHEL® isoliert. Die Eluierung der KLH enthaltende Lösung auf einer POROS HQ/M Säule ergab zwei scharf getrennte Fraktionen (Abb. 11) deren Reinheit und vollständige Trennung mittels PAGE bestätigt wurde (Abb. 12).

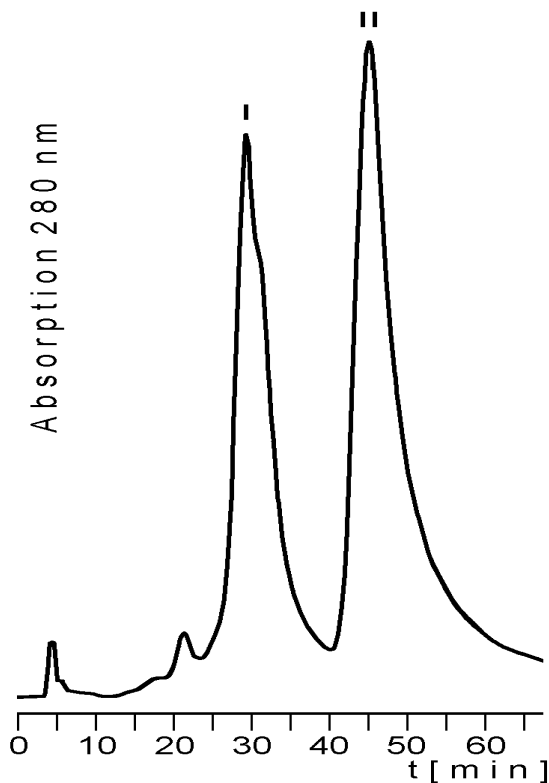


Abb. 11. Trennung von IMMUCOTHEL® nach 24 h Dialyse gegen 0.1 M Tris·HCl, (pH 6.5) mit 1 mM CaCl₂ und 0.5 mM MgCl₂. Bedingungen: Säule: POROS HQ/M-Anionenaustauschersäule (3.6 × 100 mm); Elutionsmittel: Puffer A: 0.1 M Tris·HCl (pH 6.5) mit 1 mM CaCl₂ und 0.5 mM MgCl₂; Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl; Gradient: 10 min 100% Puffer A, 0% -100% Puffer B in 70 min; Fließgeschwindigkeit: 1 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 0.3 mg Protein in 500 µL Lösung; Detektion bei $\lambda = 214$ nm. Fraktion I: KLH2, Fraktion II: KLH1.

Die in Fraktion I enthaltenen Proteine wurden als KLH2 (380 kDa), die in Fraktion II enthaltenen als KLH1 (420 kDa) identifiziert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früher veröffentlichten Arbeiten, in denen beschrieben wurde, daß KLH in zwei elektrophoretisch trennbare Polypeptidketten dissoziiert werden kann. Wie auf den Abbildungen 11 und 12 zu sehen ist, gelang unter Verwendung der POROS-Säule eine ausgezeichnete Trennung der beiden Strukturellen Untereinheiten des KLH, die unter Anwendung von HPLC-Bedingungen außerdem hocheffizient und unter geringem Zeitaufwand durchzuführen war.

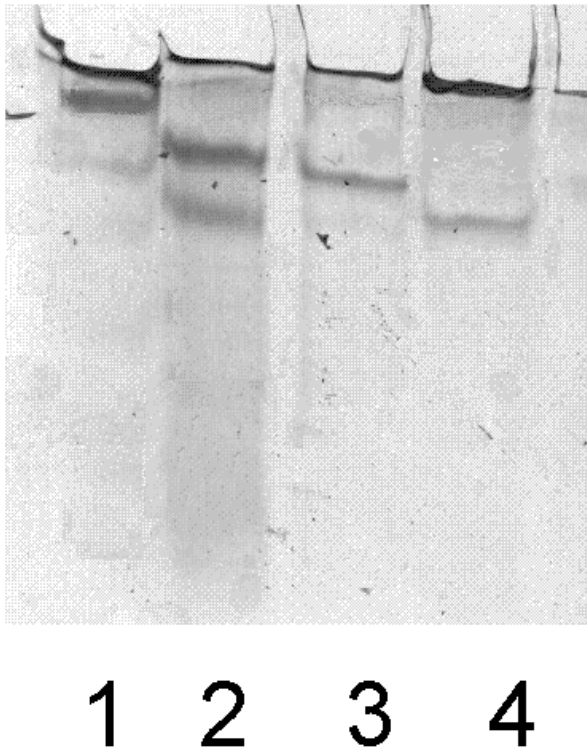


Abb. 12. PAGE von KLH, KLH1 und KLH2; (Gel 7.5%). 1: Standard: Ferritin ($M = 440$ kDa); 2: dissoziiertes KLH; Das Hämocyanin nach der Trennung auf der POROS HQ/M-Anionenaustauschersäule; 3: KLH1; 4: KLH2.

4.1.1.2 Bestimmung der Konformationsstabilität von KLH, KLH1 und KLH2 unter dem Einfluß von Temperatur und Guanidinhydrochlorid

Thermostabilität und die Stabilität gegen chemischen Denaturierung spielen bei Biomolekülen eine große Rolle, auch im Hinblick auf ihre praktische Verwendbarkeit. Die Thermostabilität wurde an den apo-Formen von KLH und seinen Untereinheiten untersucht. Hierzu wurden die Proteine schrittweise von 20°C auf 95°C erhitzt und die CD-Spektren im Bereich zwischen 200 und 260 nm aufgenommen,

in welchem die für die Sekundärstruktur typischen Cottoneneffekte auftreten. Zur Feststellung der Konformationsänderung wurden die Werte der Elliptizität bei 222 nm gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 13). Aus den Wendepunkten der sigmoidalen Kurven wurde die jeweilige Denaturierungstemperatur der Proteine bestimmt. Das native KLH (KLH1 + KLH2) war bis 68°C stabil, KLH1 entfaltete bei 63°C und KLH2 verlor seine Struktur bei 54°C.

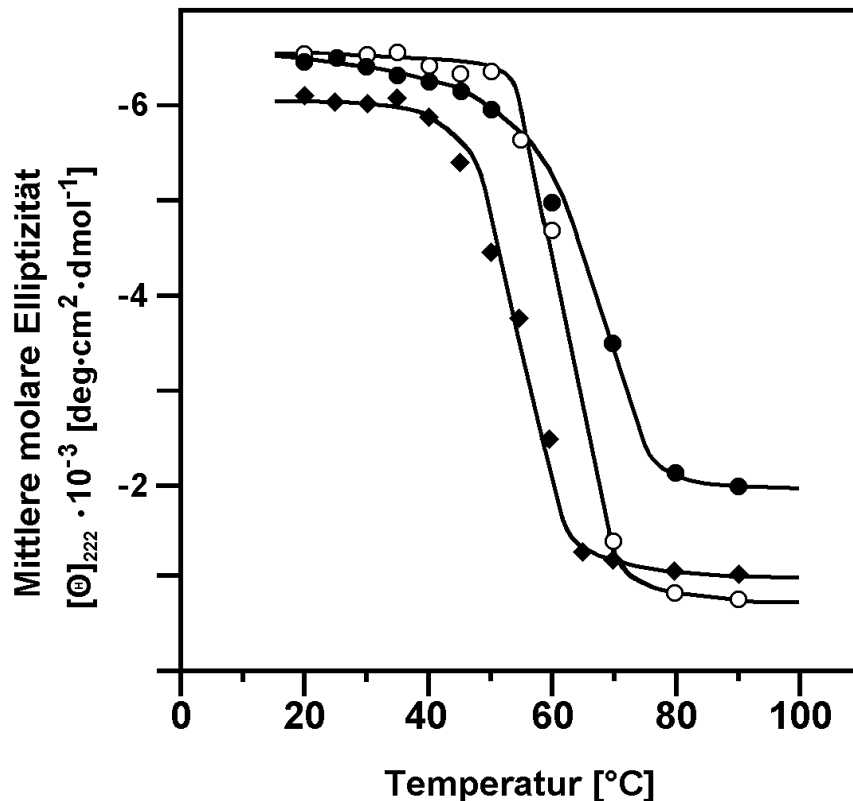


Abb. 13. Temperaturabhängigkeit der Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm von KLH (●-●) und seinen strukturellen Untereinheiten KLH1 (○-○) und KLH2 (◆-◆). $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein in einem Puffermedium aus 0.05 M Tris·HCl (pH 8) mit 10 mM CaCl_2 wurden 10 min bei der gewählten Temperatur equilibriert.

Für die Faltung eines Proteins, seinen Transport durch Membranen oder auch für die Proteolyse sind denaturierte Zustände von großer Bedeutung. Die Entfaltung von KLH und seinen Untereinheiten unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid wurde ebenfalls durch Zirkulardichroismus beobachtet. Hierzu wurde die Änderung der Elliptizität bei

222 nm gegen die Konzentration von Gdn-HCl aufgetragen (Abb. 14, untere Graphik) und aus den Wendepunkten der erhaltenen Kurven die Konzentration von Gdn-HCl bestimmt bei der das Molekül denaturiert. Bei Gdn-HCl-Konzentrationen zwischen 0 und 2.0 M ändert sich die Elliptizität nur geringfügig. Konzentrationen zwischen 2.0 M und 5.0 M Gdn-HCl führen jedoch zu einer starken Abnahme der Elliptizität, wodurch die mit der Denaturierung einhergehenden Konformationsänderungen zum Ausdruck kommen. Für Konzentrationen zwischen 6.0 M und 8.0 M Gdn-HCl wurden CD-Spektren erhalten, die für denaturierte Proteine typisch sind.

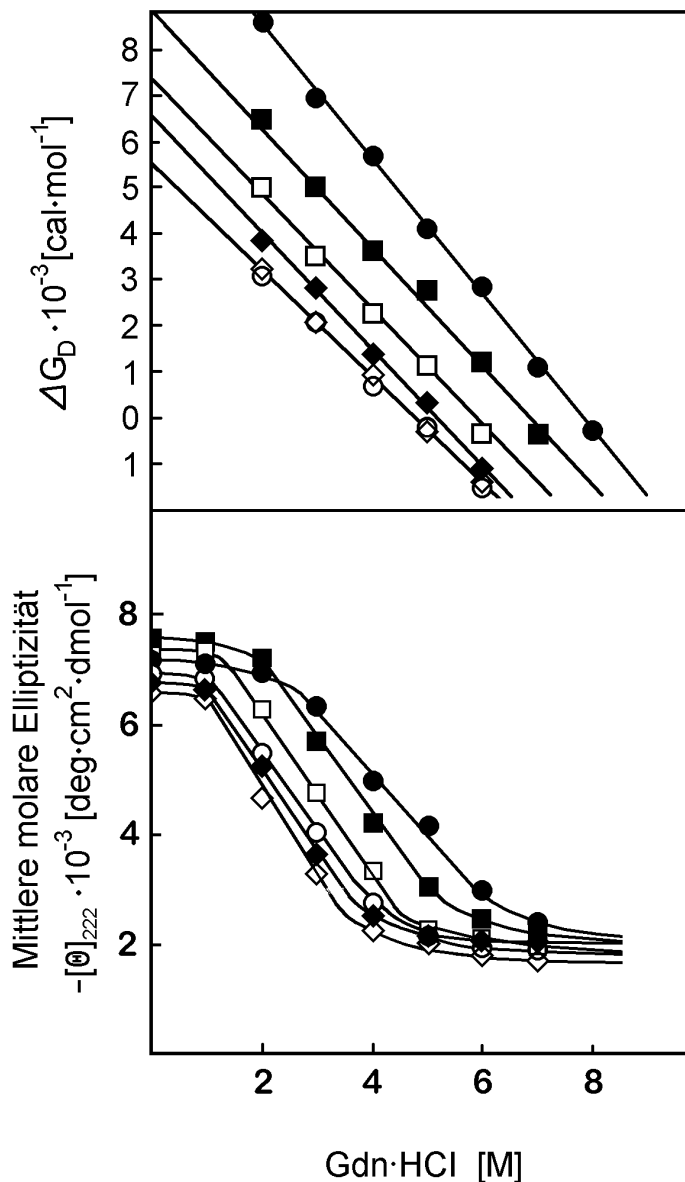


Abb. 14. Die Änderung der Freien Energie ΔG_D (obere Graphik) und der Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm (unten) als Funktion der Gdn-HCl-Konzentration für oxy-KLH (\bullet - \bullet) und seine Strukturellen Untereinheiten KLH1 (\circ - \circ) und KLH2 (\blacklozenge - \blacklozenge). $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Protein in einem Puffermedium aus 0.05 M Tris-HCl (pH 8) mit 10 mM CaCl_2 wurden 10 min bei der gewählten Temperatur equilibriert.

Fernerhin wurde die Denaturierung von KLH und seinen Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 durch Harnstoff untersucht. Von Proteinproben, die mit Konzentrationen von 1 M bis 8 M Harnstoff inkubiert worden waren, wurden CD-Spektren aufgenommen. In Abb. 15 ist das Spektrum des unbehandelten KLH dem des mit 8 M Harnstoff inkubierten Proteins gegenübergestellt. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, verschwinden die für α -Helices typischen Cottoneneffekte bei 210 nm und 220 nm und es tritt ein negativer Cottoneneffekt bei 215 nm auf, welcher für β -Faltblattstrukturen typisch ist. Dies bedeutet, daß in Gegenwart von Harnstoff vor allem α -helikale Strukturen zerstört werden, während die β -Faltblattstrukturen weitgehend erhalten bleiben. Für die Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 wurden ähnliche, wie die in Abb. 15 dargestellten Spektren erhalten.

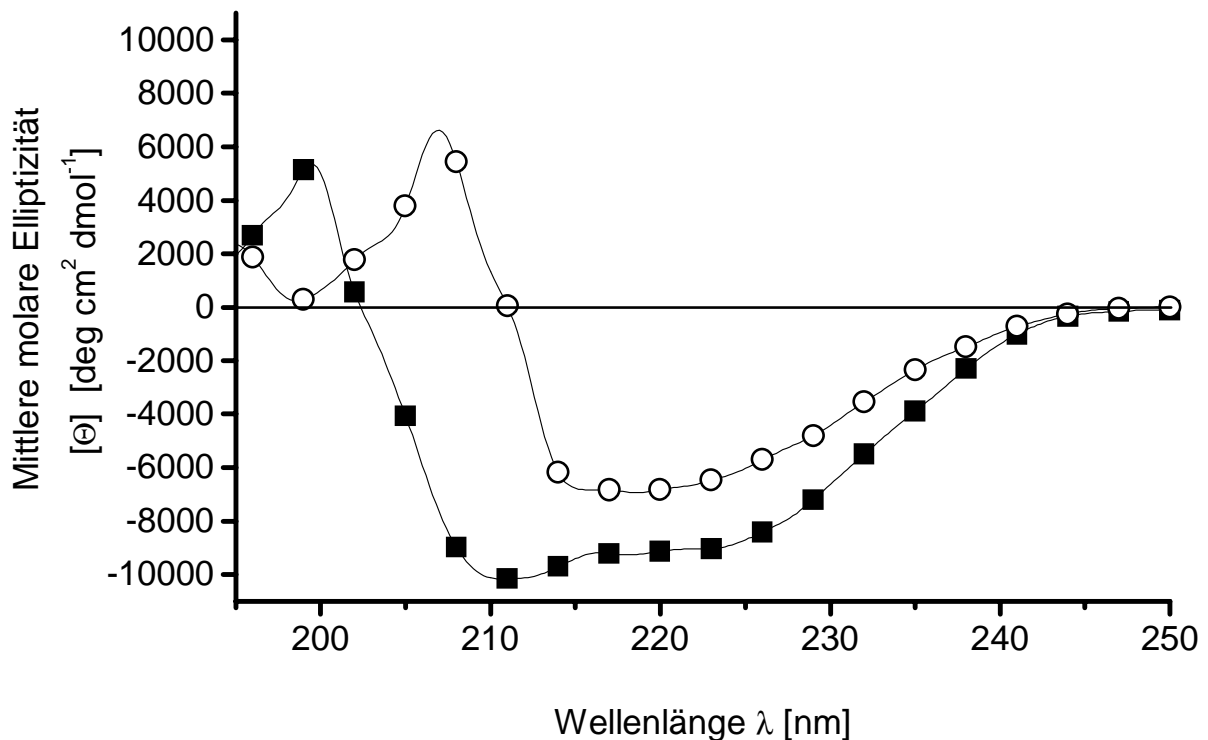


Abb. 15. Der Einfluß von Harnstoff auf die Sekundärstruktur von KLH. (■-■) Natives Hämocyanin KLH; (○-○) das Hämocyanin nach 24-stündiger Einwirkung von 8 M Harnstoff). Probenkonzentration: 0.2 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl (pH 8.0) mit 10 mM CaCl₂.

4.1.1.3 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$ von KLH, KLH1 und KLH2

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Stabilität von Hämocyaninen in wässrigen Lösungen ist die Freie Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$, die durch Gleichung (9) beschrieben wird. $\Delta G_D^{H_2O}$ kann aus CD-Experimenten durch die Messung der Intensität der Cottoneneffekte bei 222 nm (α -Helix-Bande) in Gegenwart steigender Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorid bestimmt werden.

Tabelle 3. Freie Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$, die Aktivierungsenergie E_a und die Denaturierungstemperaturen T_c aus den Fluoreszenzexperimenten und T_m aus den CD-Messungen.

Protein		$\Delta G_D^{H_2O}$ [kcal·mol ⁻¹]	E_a [kJ·mol ⁻¹]	Fluoreszenz T_c [°C]	CD T_m [°C]
KLH	oxy-	6.2	24.36	63	68
KLH	apo-				
KLH1	oxy-	4.2	16.80	57	63
KLH1	apo-				
KLH2	oxy-	5.4	18.90	52	54
KLH2	apo-				
Rapana	oxy-	5.4	21.4	70	68
Rapana	apo-				
RHSS1	oxy-	3.9	14.8	46	53
RHSS1	apo-				
RHSS2	oxy-	4.4	15.3	57	59
RHSS2	apo-				

In Tabelle 3 sind die Werte der Freien Stabilisierungsenergie in Wasser für verschiedene Hämocyanine zusammengefaßt. Die gefundenen Werte bestätigen, daß das native KLH gegenüber einer Denaturierung durch Gdn·HCl etwa 1.5-mal stabiler als KLH1 und etwa 1.1-mal stabiler als KLH2 ist. Dieses Ergebnis steht auch mit den Resultaten der thermischen Denaturierung im Einklang, da es bei Proteinen, die gegen chemische Denaturierung stabiler sind, erst bei höheren

Temperaturen zu einem Verlust der Tertiärstruktur kommt. Vergleiche der Stabilität gegenüber Harnstoff zeigen, daß z.B. die Sekundärstruktur des Hämocyanins von *Octopus vulgaris* weit weniger verändert wird, als etwa die der Arthropoden *Carcinus maenas* oder *Lymnulus polyphemus* [123]. Diese höhere Stabilität der Molluskenhämocyanine kann unter Umständen auf die höhere Anzahl von Disulfidbrücken zurückgeführt werden, aber auch ein zusätzlicher Einfluß der Kohlenhydratseitenketten auf die Erhaltung der Konformation kann nicht ausgeschlossen werden [124].

4.1.1.4 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs⁺ und I⁻

Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 280 nm, bei der Phenol- und Indolgruppen absorbieren, bzw. mit Licht der Wellenlänge 295 nm, bei der etwa 93% des eingestrahnten Lichtes von Tryptophylgruppen absorbiert wird, wies das Spektrum des oxy-Hämocyanins ein Maximum (λ_{\max}) bei 330.5 ± 1 nm für das Gemisch aus KLH1 und KLH2 auf. Für die Untereinheiten ergaben sich Maxima bei 336 ± 1 nm KLH1 und bei 335 ± 1 für KLH2. Diese Werte erscheinen typisch für tief im Inneren des Proteins positionierte Tryptophylseitenketten in einer unpolaren Umgebung [125]. Verglichen mit den oxy-Hc verschob sich das Absorptionsmaximum der apo-Formen um etwa 1 bis 2 nm zu höheren Wellenlängen. Die Fluoreszenzquantenausbeute stieg für alle drei untersuchten Formen des KLH sehr stark an (Tabelle 10). Die Fluoreszenzlöschungsexperimente wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) mit 10 mM CaCl₂ und verschiedenen Konzentrationen von Acrylamid durchgeführt. Acrylamid ist ein effektiver neutraler Fluoreszenzlöschler für die Tryptophanfluoreszenz der in das Innere der Tertiärstruktur vordringen kann. Stern-Volmer-Plots ergeben eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration der Löschermoleküle und der Fluoreszenzbandenintensität, aus denen die Löscherkonstante K_{SV} bestimmt werden kann (Abb. 16). Die Werte der Löscherkonstante K_{SV} erlauben Rückschlüsse darauf, ob die gelöschte Fluoreszenz von Tryptophylresten auf der Oberfläche oder im Inneren des Proteins stammt. Im Gegensatz zu Acrylamid sind Cs⁺ und I⁻ geladene, hydratisierte Teilchen, die nur mit Tryptophylgruppen in Wechselwirkung treten können, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden. Die Fluoreszenzlöschungsexperimente mit diesen Ionen ergaben, verglichen mit freien Tryptophanen, sehr niedrige Löscherkonstanten (Tabelle 4), ein Hinweis darauf, daß auf der Oberfläche der KLH-Proteine keine oder nur sehr wenige Tryptophylreste exponiert sind. Die Emissionswerte zwischen 330 nm und 335 nm für das KLH und die Untereinheiten KLH1 und KLH2 stimmen in etwa mit denen von *Rapana thomasiana* überein, für die λ_{\max} in einem Bereich zwischen 329 und 331 nm

gemessen wurden [126]. Die Rotverschiebung der Maxima um 1-2 nm bei den apo-Formen liefert einen Hinweis darauf, daß durch die Entfernung der Kupferatome und des Peroxids eine geringe Veränderung der Umgebung der Tryptophylreste stattfindet.

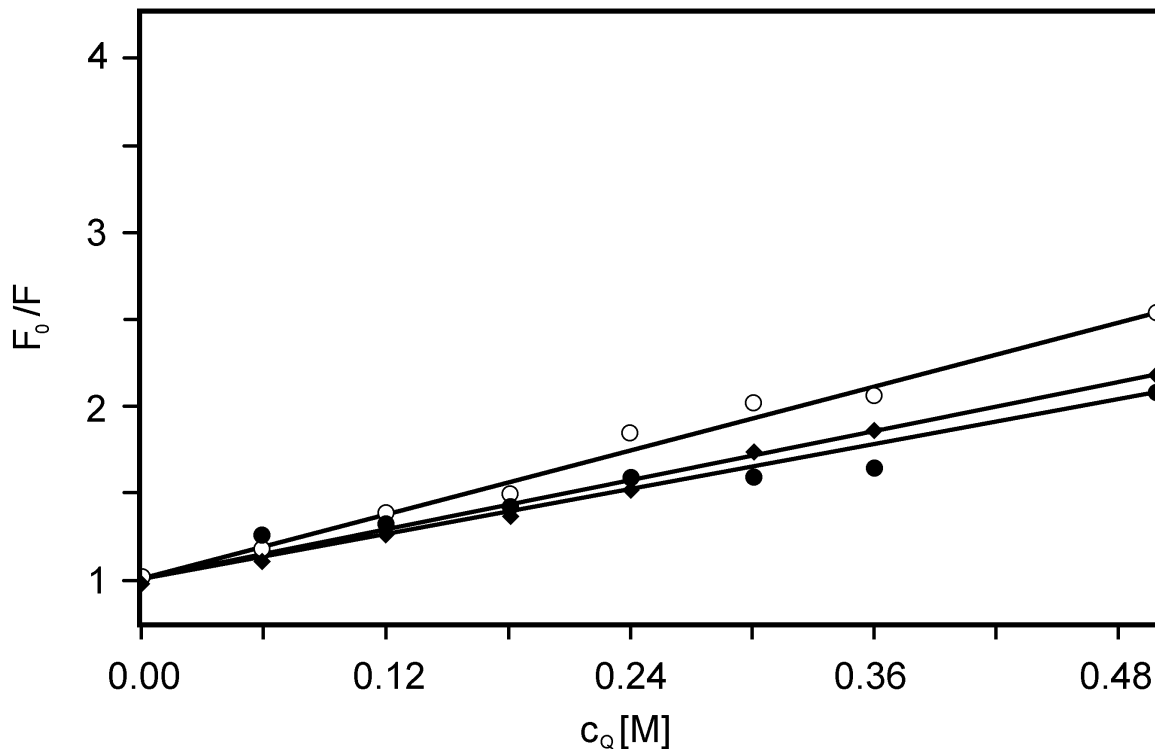


Abb. 16. Stern-Volmer-Plot der Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid. KLH (\bullet – \bullet), KLH1 (\circ – \circ), KLH2 (\blacklozenge – \blacklozenge). Proteinkonzentration: ca. $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris-HCl mit 10 mM CaCl_2 (pH 8.0).

Zusätzlich wurde ein sehr starker Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute festgestellt ($Q_{\text{oxy}} = 0.036 / Q_{\text{apo}} = 0.068$ für KLH, $Q_{\text{oxy}} = 0.043 / Q_{\text{apo}} = 0.070$ für KLH1 und $Q_{\text{oxy}} = 0.060 / Q_{\text{apo}} = 0.074$ für KLH2). Derselbe Effekt wurde auch beim Hämocyanin von *Rapana thomasi* beobachtet [125]. Die Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß durch die Dissoziation der Hämocyaninaggregate einige Indolringe von einem hydrophoben in ein mehr polares Umfeld übergehen. Dieser Effekt ist deutlicher sichtbar im Falle der oxy-Formen des Hämocyanins, weil möglicherweise der Kupfer-Peroxid-Komplex die Fluoreszenz der im Inneren des Proteins positionierten Tryptophylreste selektiv löscht. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Fluoreszenz sowohl bei den oxy- als auch bei den apo-Formen von Tryptophylresten dominiert werden, die in inneren Bereichen der Domänen plziert sind. Die Werte der Löschungskonstanten,

die für KLH ($K_{SV} = 2.28 \text{ M}^{-1}$) und die strukturellen Untereinheiten KLH1 ($K_{SV} = 3.39 \text{ M}^{-1}$) und KLH2 ($K_{SV} = 3.01 \text{ M}^{-1}$) bei den Löschexperimenten mit Acrylamid gefunden wurden, sind, verglichen mit der Fluoreszenzlöschung von freien, in wässriger Lösung vorliegenden, Tryptophanresten ($K_{SV} = 16.33 \text{ M}^{-1}$), sehr niedrig. Auch dies ist ein sehr starker Hinweis darauf, daß die im Hämocyanin vorhandenen Tryptophane sich tief im Innern des Proteins in einer hydrophoben Umgebung befinden. Wie bei dem Gastropoden *Rapana thomasiana* [125] unterscheiden sich die Werte der Löschkonstanten von Gesamthämocyanin und den SU nicht sehr. Im Gegensatz hierzu steigen die Werte der Löscherkonstanten der Strukturellen Untereinheiten von Arthropoden nach der Dissoziation drastisch an (6- bis 7-facher Anstieg), wie das Beispiel von *Callinectes sapidus* zeigt [127]. Einen ähnlichen Anstieg findet man aber auch bei dem Mollusken *Octopus vulgaris* [128]. Zur Erklärung dieser Unterschiede im Fluoreszenzverhalten können zwei Arten von Fluorophoren herangezogen werden: Zum einen Tryptophylreste, die sich in der Umgebung der Aktivzentren befinden, zum anderen Tryptophane die auf den Oberflächen der Proteine positioniert sind.

Tabelle 4. Fluoreszenzparameter von KLH und seinen Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2. Die Anregung der Proben erfolgte mit Licht von 295 nm. Proteinkonzentration: ca. $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris-HCl mit 10 mM CaCl_2 (pH 8.0).

Protein	Emission λ [nm] Anregung bei 295 nm	Fluoreszenz- quantenaus- beute [Q]	Tyr-Trp- Energie- transfer [%]	Acrylamid- löschung $K_{SV} [\text{M}^{-1}]$	KI- Löschung $K_{SV}^- [\text{M}^{-1}]$	CsCl- Löschung $K_{SV}^+ [\text{M}^{-1}]$	E $\frac{K_{SV}^-}{K_{SV}^+}$
KLH oxy- apo-	330±1 332±1	0.036 0.068	0.65	2.28	1.30	0.88	1.47
KLH1 oxy- apo-	336±1 338±1	0.042 0.070	0.25	3.39	1.25	0.71	1.76
KLH2 oxy- apo-	335±1 336±1	0.060 0.074	0.40	3.01	1.10	0.50	2.20
Ac-Trp-NH ₂	350±1	0.130	1.25	16.33	8.80	2.00	4.40

Die letzteren befinden sich bei den Arthropodenhämocyaninen in den Kontaktbereichen der Funktionellen Untereinheiten und werden nach der Dissoziation exponiert, was zu den zuvor erwähnten großen Unterschieden der Löscherkonstanten des Hämocyanins in undissoziierter und dissoziierter Form führt. Die Werte von *O. dofleini* lassen den Schluß zu, daß auch in diesem Hämocyanin mehrere Tryptophane so gelagert sind, daß sie in undissoziierter Form in Kontaktbereichen zwischen den Domänen ihren Platz finden und nach der Dissoziation Löscher-molekülen frei zugänglich sind. Die Resultate der Untersuchungen mit KLH und *Rapana*-Hämocyanin zeigen, daß bei beiden Spezies der größte Teil der vorhandenen Tryptophanreste in inneren Bereichen der Proteine positioniert ist. Diese Ergebnisse werden durch die Experimente mit ionischen Löscher-molekülen, die wegen ihrer Hydrathülle nicht in das Innere von globulären Proteinen vordringen können, gestützt. Durch diese Moleküle kann also nur die Fluoreszenz von an der Oberfläche von Proteinen befindlichen Tryptophylresten beeinflußt werden. Die für das Gesamthämocyanin gefundenen Löscherkonstanten für Cs^+ und I^- sind im Vergleich zu den Modellwerten (2.0 M^{-1} bzw. 8.8 M^{-1}) extrem niedrig (0.88 M^{-1} für Cs^+ und 1.3 M^{-1} für I^- (Tabelle 4)) und weisen darauf hin, daß sich nahezu keine Tryptophylreste auf den Oberflächen des Proteins befinden. Für die Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 wurden geringfügig höhere Werte für die Löscherkonstanten K_{SV} gefunden, die jedoch wesentlich niedriger sind als die vergleichbaren Werte von Arthropodenhämocyaninen, was die zuvor gezogenen Schlüsse in Bezug auf die Positionierung der Tryptophylreste im Innern der Proteinmatrix bei KLH und *Rapana*, bzw. in den Kontaktregionen der Arthropoden-SU unterstützt. Der aus dem Verhältnis $K_{\text{SV}}^- \cdot (K_{\text{SV}}^+)^{-1}$ definierte Elektrostatische Parameter E [118] ist mit 1.47 für KLH etwas geringer als für die beiden Strukturellen Untereinheiten ($E_{\text{KLH1}} = 1.76$, $E_{\text{KLH2}} = 2.20$) und läßt ein eher negativ geladenes Mikroumfeld der Tryptophylreste vermuten.

4.1.1.5 Die Temperaturabhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz

Die Temperaturstabilität wurde ebenfalls fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die in einem Puffer aus 50 mM Tris·HCl (pH 8.0) und 10 mM CaCl_2 gelösten Proben ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurden schrittweise von 20°C bis 95°C erhitzt. Für die Messungen wurden die apo-Formen der Proteine verwendet, da die Sauerstoffsättigung temperaturabhängig ist und somit die Messungen beeinflußt hätte. Aus der Arrhenius-Gleichung $\ln(Q^{-1}-1) = -E_a / (RT + \ln k)^{-1}$ wurden E_a -Werte von $24.36 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für KLH bzw. $16.80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für KLH1 und $18.90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für KLH2 berechnet

(Tabelle 3). Die Aktivierungsenergie E_a der temperaturabhängigen Deaktivierung von angeregten Fluorophoren der Proteine ist also für das native KLH um etwa 1.5 bis 2 mal höher als für die dissoziierten Strukturellen Untereinheiten. Aus der Änderung der Steigung der Arrhenius-Plots kann die kritische Übergangstemperatur bestimmt werden. Diese betrug für das KLH 63°C, wohingegen KLH1 bis 53°C stabil blieb und bei KLH2 schon bei 51°C eine Änderung der Konformation eintrat.

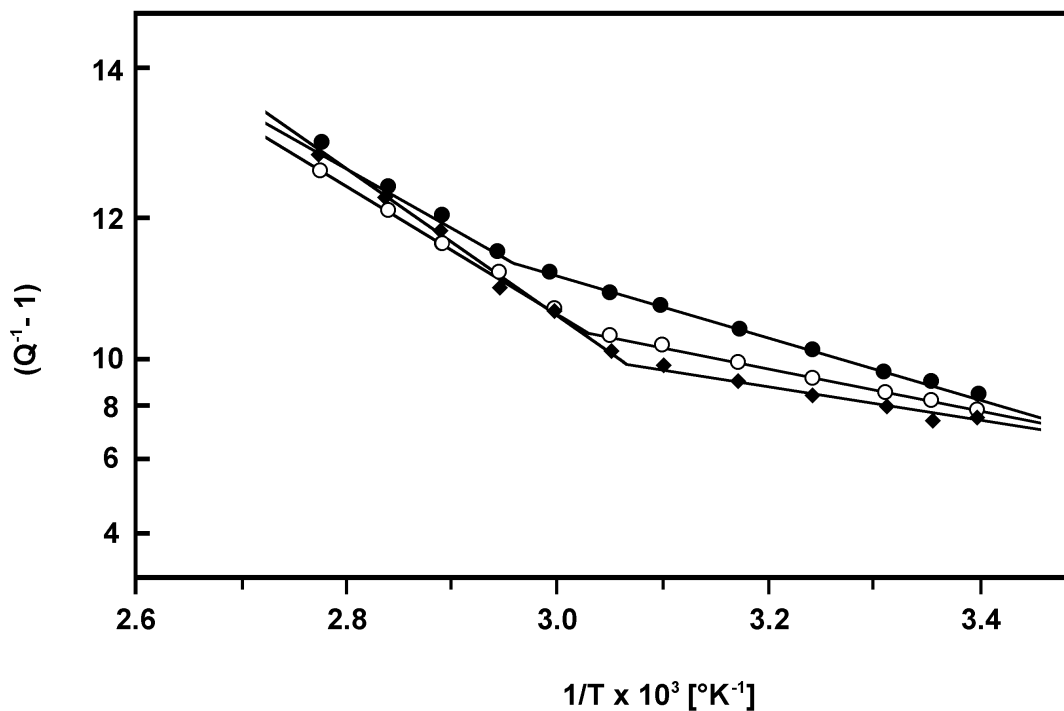


Abb. 17. Arrhenius-Plot der Temperaturabhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz von KLH (●-●), KLH1 (○-○) und KLH2 (◆-◆). Proteinkonzentration: 0.5 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8. Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurde N-Ac-Trp-NH₂ als Standard verwendet.

4.1.1.6 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung

Die Abwesenheit einer Tyrosylfluoreszenz, deren Bande bei 303 nm erwartet werden kann [129], kann durch Energie-Übergangsprozesse zwischen Phenol- (Energiedonoren) und Indolgruppen (Energieakzeptoren) erklärt werden [130]. Die Röntgenstrukturmodelle von Funktionellen Einheiten von *Octopus dofleini* [21] und *Panulirus interruptus* [28] verweisen auf viele Möglichkeiten für einen Tyrosin-Tryptophan-Energieübergang. Dies wurde darauf zurückgeführt,

daß das von Tyrosinseitenketten absorbierte Licht strahlungslos auf benachbarte Tryptophanseitenketten übertragen wurde. Die effektive Energieübertragung für KLH, KLH1 und KLH2 wurde mit Gleichung 11 (Kap. 5.2.13) berechnet und ist in Abb. 18. graphisch dargestellt. Die beste Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den theoretischen Kurven wurde für KLH mit $e = 0.65$, für KLH1 mit $e = 0.25$ und für KLH2 mit $e = 0.40$ erreicht. Dies bedeutet, daß im nativen KLH 65% und bei den Strukturellen Untereinheiten zwischen 25% und 40% des von den Tyrosylresten absorbierten Lichtes auf Indolringe übertragen und als Tryptophanfluoreszenz emittiert wurde. Die Werte für die Strukturellen Untereinheiten sind verglichen mit dem nativen Hämocyanin um etwa 30% bis 40% niedriger, was den Schluß zuläßt, daß sich durch die Dissoziation die relative Orientierung mancher Tyrosyl- oder Tryptophylreste ändert.

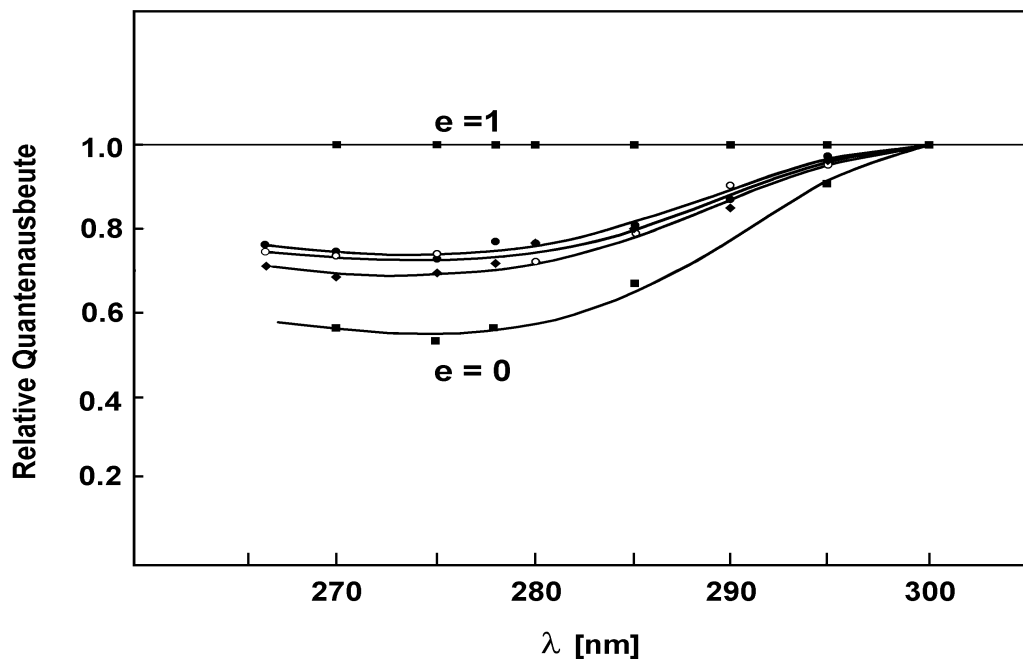


Abb. 18. Effektive Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung der apo-Formen von KLH (●—●), KLH1 (○—○) und KLH2 (◆—◆). Die Kurven (■—■) repräsentieren die Werte für $e = 0$ bzw. $e = 1$.

4.1.1.7 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Abnahme der Fluoreszenz des bei 295 nm angeregten KLH, KLH1, KLH2 und N-Acetyltryptophanamids kann durch zwei Exponenten $e^{-(t-\tau_1^{-1})}$ und $e^{-(t-\tau_2^{-1})}$ ausgedrückt werden. Die Funktion (12) wurde zur Bestimmung herangezogen. Die Analyse der Daten in Bezug auf ein

monoexponentielles Modell ergab eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen und theoretischen Kurven. Die charakteristischen Parameter sind in Tabelle 5 zusammengefasst, Abb. 19 zeigt die Zerfallskurve von KLH.

Tabelle 5. Relative Amplituden und Fluoreszenzlebensdauer τ von KLH, KLH1 und KLH2.

Protein	A_1 [%]	τ_1 [ns]	A_2 [%]	τ_2 [ns]
KLH oxy-	0.50	0.17	0.05	2.56
KLH apo-	3.70	0.24	0.10	2.90
KLH1 oxy-	2.90	0.30	0.10	2.59
KLH2 oxy-	2.70	0.43	0.12	2.88

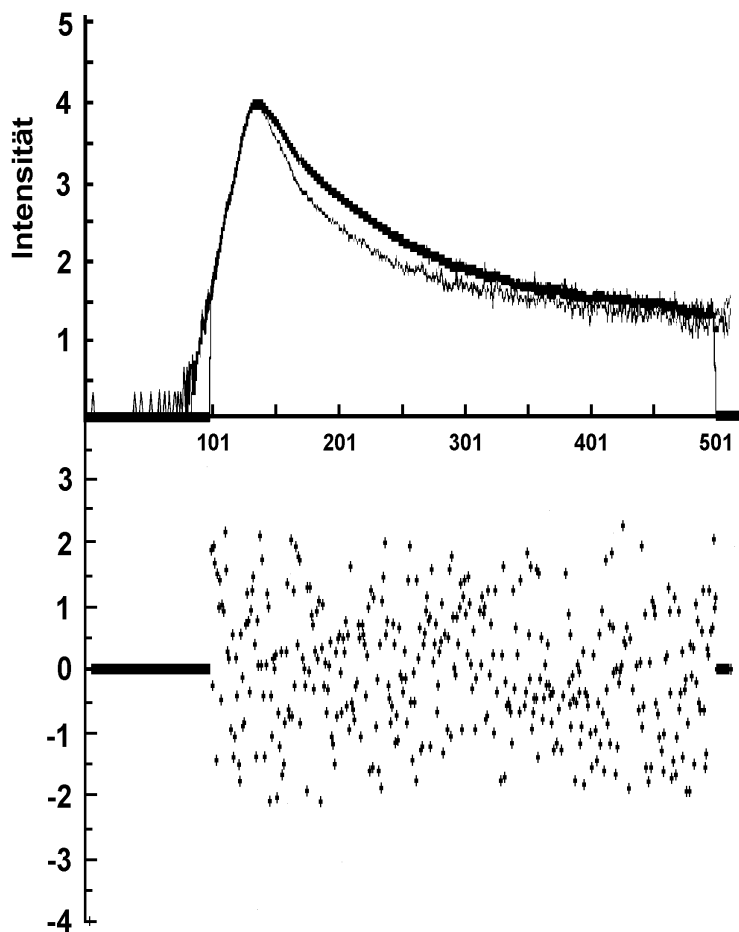


Abb. 19. Die Zerfallskurve von KLH bei pH 6.0. Bedingungen: Anregungswellenlänge: 297 nm; Aufnahmewellenlänge: 340 nm; Zeitauflösung: 0.1 ns/Kanal; Temperatur: 20°C; Proteinkonzentration: $OD_{297} = 0.3$.

Die Fluoreszenzlebensdauer für die Proteine wurde für eine durchschnittliche Anzahl von 7 Tryptophylresten pro Protein bestimmt. Die erhaltenen Werte zeigen, daß die Umgebung der Chromophore deren Fluoreszenzemission signifikant löscht. Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, ist die Lebensdauer sowohl für das native Hämocyanin als auch für die Strukturellen Untereinheiten sehr kurz. Die Entfernung der die Tryptophanemission löschenden Kupferionen aus dem Aktivzentrum des Gesamthämocyanins führt zu einem 1.5-fachen Anstieg von τ_1 . Dies unterstützt die Annahme, daß die Kupferionen von vornherein an der Fluoreszenzlöschung von Tryptophylresten beteiligt sind, und daß sich diese Aminosäuren in einer hydrophoben Umgebung im Inneren des Proteins befinden. Für das Gesamtmolekül und die Strukturellen Untereinheiten wurden sehr differenzierte Unterschiede festgestellt, was damit erklärt werden kann, daß die entsprechenden Tryptophylreste durch die lokale Tertiärstruktur unterschiedlich beeinflusst werden. Durch das spezifische Umfeld der Indolgruppen im KLH wird die Lebensdauer des angeregten Zustandes im Vergleich zu dem der SU um den Faktor 0.5 verkürzt, was zu einer etwa zwei- bis dreimal kürzeren Lebensdauer τ_1 führt.

4.1.2 Die Aufklärung der Primärstruktur der Funktionellen Einheit KLH2-c des Hämocyanins von *Megathura crenulata*.

4.1.2.1 N-Terminale Sequenzierung

Nach Aufreinigung der Proben (Abb. 20) wurde die KLH2-c enthaltende Probe N-terminal über 68 Aminosäurereste ansequenziert. Wie bei der veröffentlichten Sequenz [131], konnte Aminosäure 19 nicht eindeutig identifiziert werden. Im Laufe der weiteren Sequenzierungen wurde diese Sequenz im großen und ganzen bestätigt und es mußten nur noch einige wenige Zuordnungen korrigiert werden.

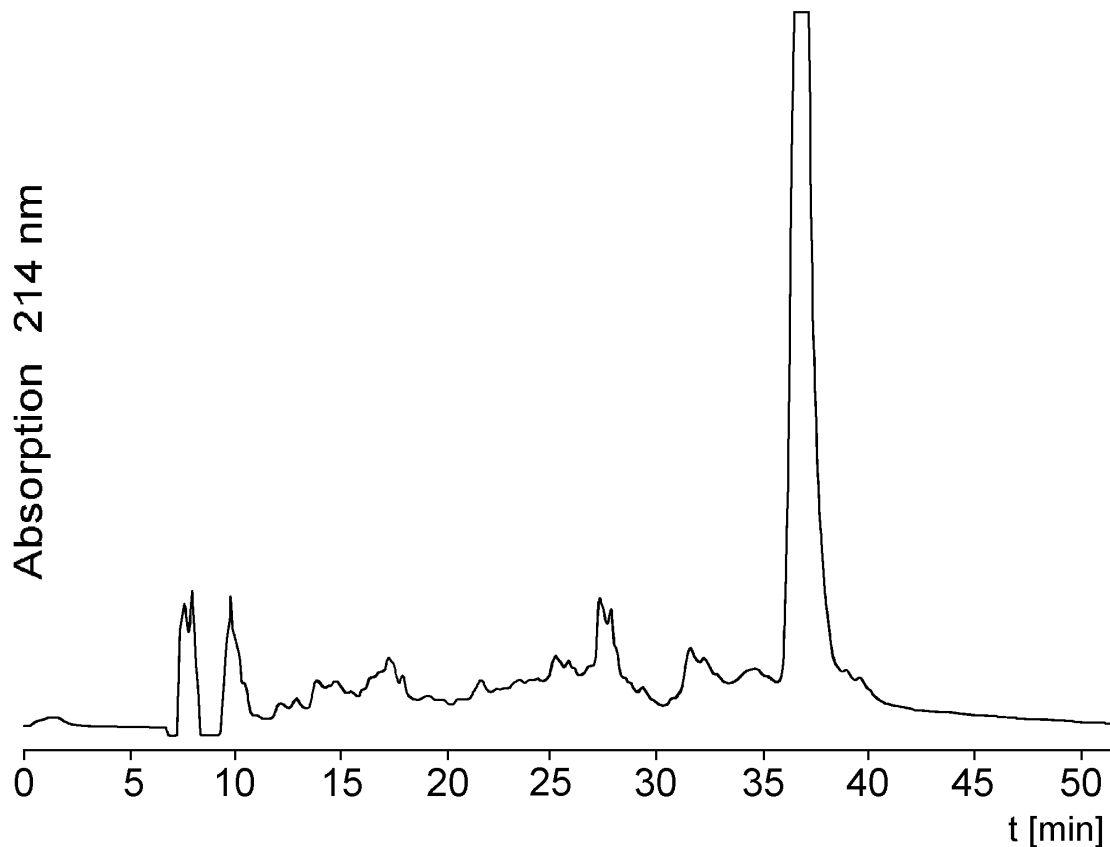


Abb. 20. Aufreinigung der nach [131] erhaltenen Fraktion von KLH2-*c*. Bedingungen: Säule: Nucleosil 7 C₁₈; Elutionsmittel: Puffer A: 0.16% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 80% CH₃CN in Wasser; Gradient: 2 min 20% Puffer B, 20% - 80% Puffer B in 48 min; Fließgeschwindigkeit: 1.2 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 0.45 mg·mL⁻¹. Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Tabelle 6. N-Terminale Sequenz von KLH2-*c*

Position	Sequenz	10	20	30
1 - 30	D F G H S K K I R K N V H S L T A E X Q N S L R R A M A D L			
Position	Sequenz	40	50	60
31 - 60	Q D D K T R G G F Q X I A A F H G E P K W C P R P G A E K K			
Position	Sequenz	70		
61 -68	F A C C V H G M			

4.1.2.2 Verdau mit Endoproteinase Lys-C

Das Verdaugemisch wurde in zwei gleiche Volumenteile geteilt. Die Aufreinigung der ersten Hälfte ergab 20 Peaks, die gesammelt und mittels MALDI-MS vermessen wurden.

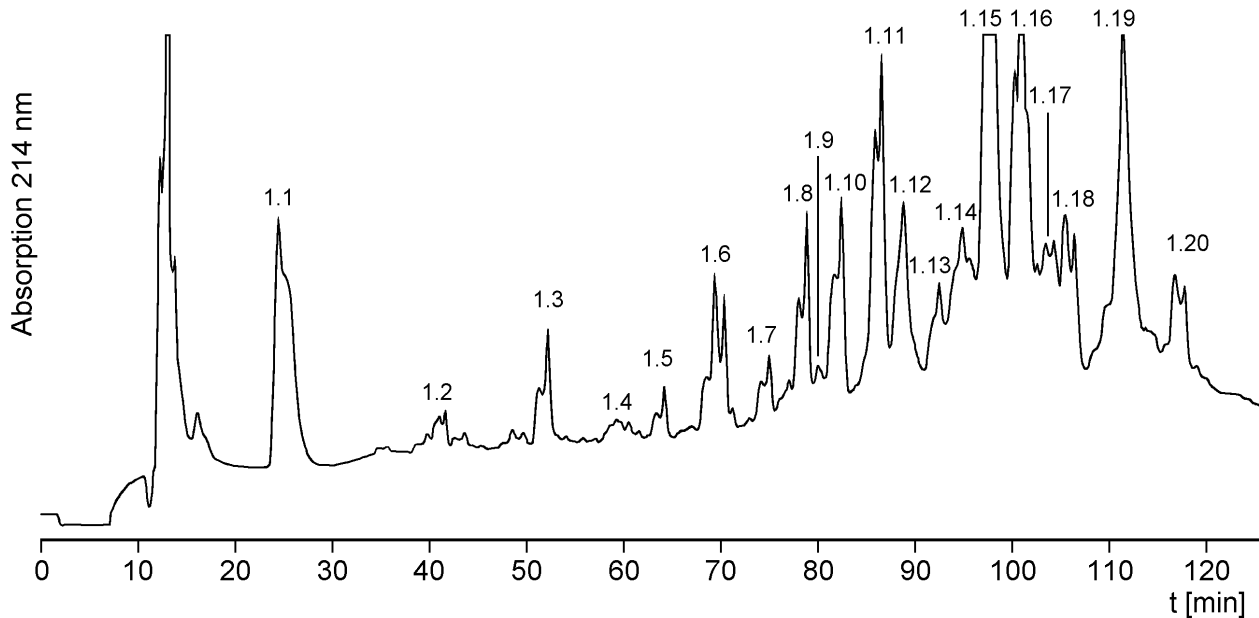


Abb. 21. HPLC-Trennung der 1. Hälfte des Lys-C-Verdaus. Bedingungen: Säule: Nucleosil 7 C₁₈; Elutionsmittel: Puffer A: 0.16% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 80% CH₃CN in Wasser; Gradient: 5 min 0% Puffer B, 0% - 100% Puffer B in 110 min; Fließgeschwindigkeit: 1.2 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 1.5 mg·mL⁻¹; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Zur Sequenzierung wurden die Fraktionen ausgewählt, aus deren Massenspektren auf lange Bruchstücke und eindeutige Sequenzen geschlossen werden konnte, die auch aus den meisten Fragmenten erhalten wurden. In der Fraktion bei T_R 85.46 (LC 1.11) wurde ein Gemisch aus drei Sequenzen gefunden, aus dem die Cysteinbrücke zwischen Cys⁵² und Cys⁶³ identifiziert werden konnte. Das Massenspektrum (Abb. 22) zeigte sowohl die Massen der einzelnen Fragmente (1115.8 Da und 1897.2 Da) als auch die Masse des Gesamtfragmentes (3013.4 Da). Lys⁶⁰ wurde durch die Endoproteinase aus der Sequenz herausgeschnitten und ging dadurch verloren. Das Auftreten aller drei Fragmentbruchstücke beweist, daß bei der nicht reduzierten Probe Teilfragmente durch den Bruch der Disulfidbrücke während des Laserbeschusses entstanden sein müssen. In Fraktion LC 1.16 konnten vier Sequenzen (Index a, b, c, d) nachgewiesen werden, darunter der C-Terminus (LC 1.16d), der jedoch bei AS 417 abbrach und dem der Massenpeak

3824.0 Da zugeordnet wurde. Die Fragmente LC 1.16b (C-terminal an Arginin) und LC 1.16c (C-terminal an Phenylalanin) wiesen jeweils eine unspezifische Schnittstelle auf, konnten aber im Massenspektrum eindeutig nachgewiesen werden. Fragment LC 1.16c wurde durch die Sequenz des in Fraktion LC 1.19 enthaltenen Fragmentes bestätigt, welches eine um 4 weitere Aminosäuren verlängerte Sequenz lieferte. In Fraktion LC 1.15 wurde ebenfalls ein Fragment mit einer für Lys-C unspezifische Schnittstelle gefunden; dieses Fragment endet mit einem Prolinrest, der durch die Sequenz bei LC 1.12 jedoch bestätigt wurde.

Tabelle 7. Peptidfragmente aus der 1. Trennung des Lys-C-Verdaus von KLH2-c (M in Da).

Fraktion	T _R [min]	Position	Sequenz	[MH ⁺] _{exp}	M _{ber}
LC 1.3	51.60	1 - 6	D F G H S K	n.d	698.7
LC 1.6a	68.74	11-24	N V H S L T A E E Q N S L R	1757.8	1757.8
LC 1.5	63.66	26 - 34	A M D D L Q D D K	1058.5	1051.1
LC 1.8	78.45	35 - 49	T R G G F Q Q I A A F H G E P K	1744.6	1743.9
LC 1.11a	85.46	51 - 59	W C P R P E A E K	1115.8	1115.3
LC 1.11b	85.46	61 - 76	F A C C V H G M A V F P H W H R	1897.2	1898.2
LC 1.11c	85.46	51 - 76	W C P R P E A E K F A C C V H G M A V F P H W H R	3013.4	3013.5
LC 1.7	74.60	77 - 88	L L T V Q G E N A L R K	1342.4	1341.6
LC 1.16a	100.19	89 - 104	H G F T G G L P Y W D W T R P M	1922.5	1921.2
LC 1.15	97.43	89 - 115	H G F T G G L P Y W D W T R P M S A L P	2853.8	2841.2
LC 1.12	88.42	105 - 130	S A L P H F V A D P T Y D D S V S S L E E D N P Y S H	2993.2	2993.2
LC 1.9	81.98	144 - 163	A V R D D L Y Q S P G F G H Y T D I	2256.5	2253.5
LC 1.16b	100.19	253 - 276	P L Q P F G L D S V I N P D D E T R E H S V P R	2712.3	2718.9
LC 1.6b	68.74	277 - 282	D V F N Y K	785.2	784.9
LC 1.16c	100.19	311 - 331	S H D R V F A G L L H E I G Q S A L V K F	2327.0	2325.1
LC 1.19	111.21	311 - 336	S H D R V F A G L L H E I G Q S A L V K F Y V C K	2714.3	2705.5
LC 1.16d	100.19	389 - 417	Y E A F N L G G S L G G V D L S Q P S V I F E P A A G ...	3824.0	3205.4

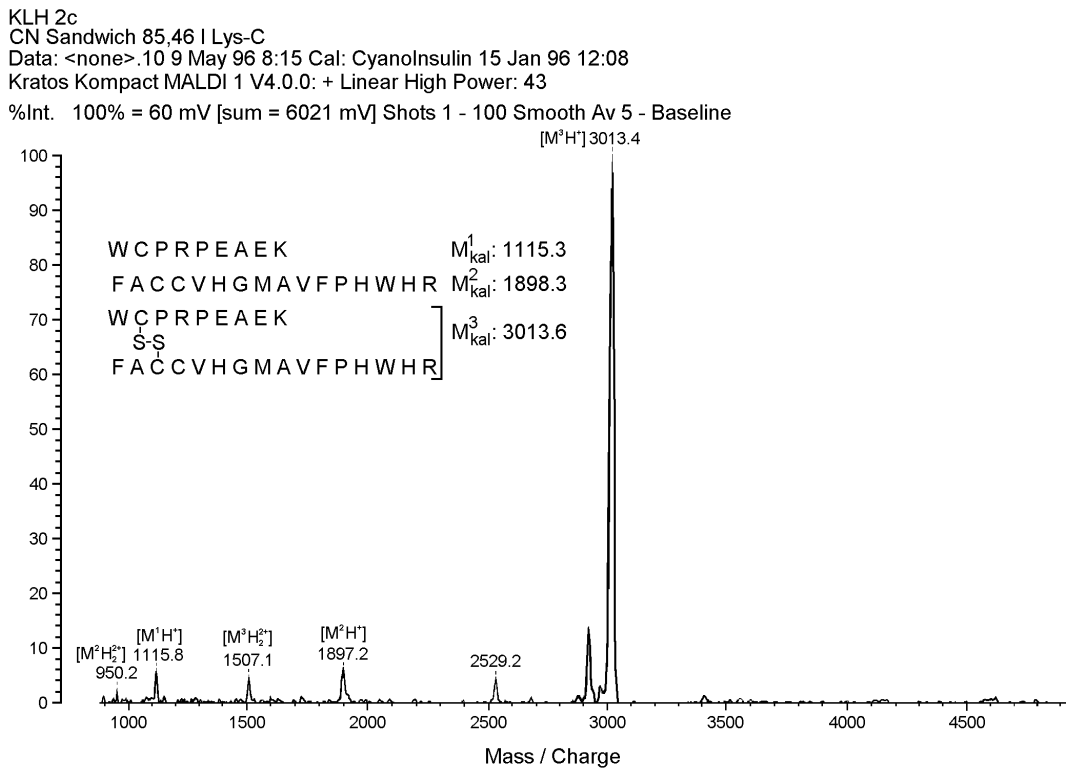


Abb. 22. LD-MS der HPLC-Fraktion LC 1.11 des Lys-C-Verdau von KLH2-c. Aufnahmebedingungen: Anzahl der Pulse: 100; Laserenergie: 43; Matrix: α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure.

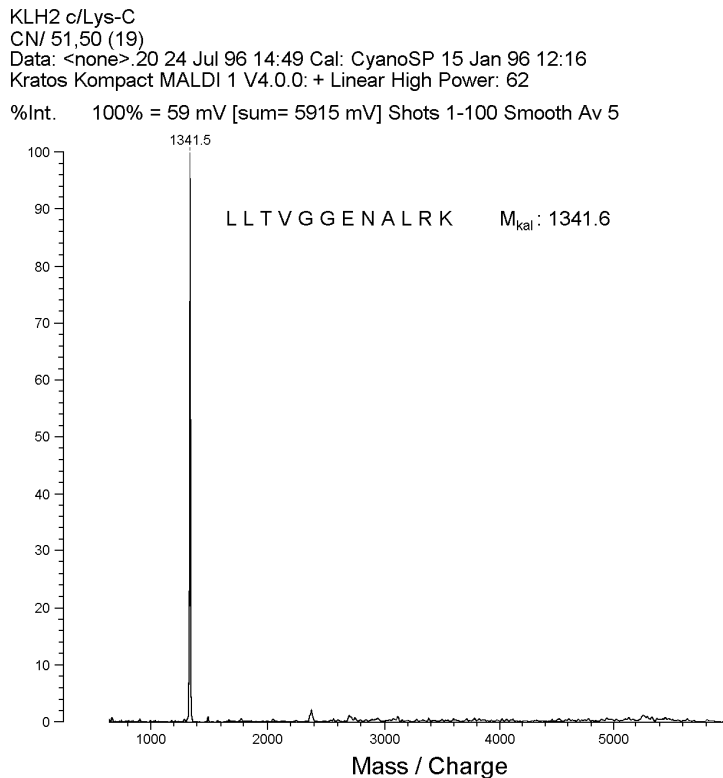


Abb. 23. LD-MS der HPLC-Fraktion LC 1.7 des Lys-C-Verdau von KLH2-c. Aufnahmebedingungen: Anzahl der Pulse: 100; Laserenergie: 62. Matrix: α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure.

Die 2. Hälfte des Lys-C-Verdaus wurde unter leicht veränderten Bedingungen getrennt (Abb. 24 und Kap. 5.2.6.4). Es wurden 37 Peaks gesammelt. Oberhalb der Retentionszeit von 50 min waren die Fragmente aufgrund der engen Peakfolge mehr oder weniger stark mit anderen Fragmentbruchstücken kontaminiert. Dies machte sich sowohl in den Massenspektren als auch während der Sequenzierung durch Parallelsequenzen bemerkbar. Es ist außerdem auffällig, daß sehr viele Sequenzen durch unspezifische Schnitte gebildet wurden. So folgte AS 77 auf einen Argininrest, AS 105 auf einen Methioninrest. AS 136 folgte auf einen Asparagin- und AS 181 auf einen Glutaminrest. Neben dem schon als weitere mögliche unspezifische Schnittstelle identifizierten Arginin (AS 25, 76, 276, 308) wurde als C-terminale AS für die Sequenz des Fragmentes LC 2.29 ein Methionin (AS 104), für das Fragment LC 2.34 ein Tyrosin (AS 198) gefunden. Bis auf die mit n.d. bezeichneten Fragmente waren die Sequenzen aufgrund der Massenpeaks eindeutig zu identifizieren. Die Fragmente LC 2.22a und LC 2.32 konnten nicht bis zum Ende sequenziert werden, da die Proben ausgewaschen worden waren.

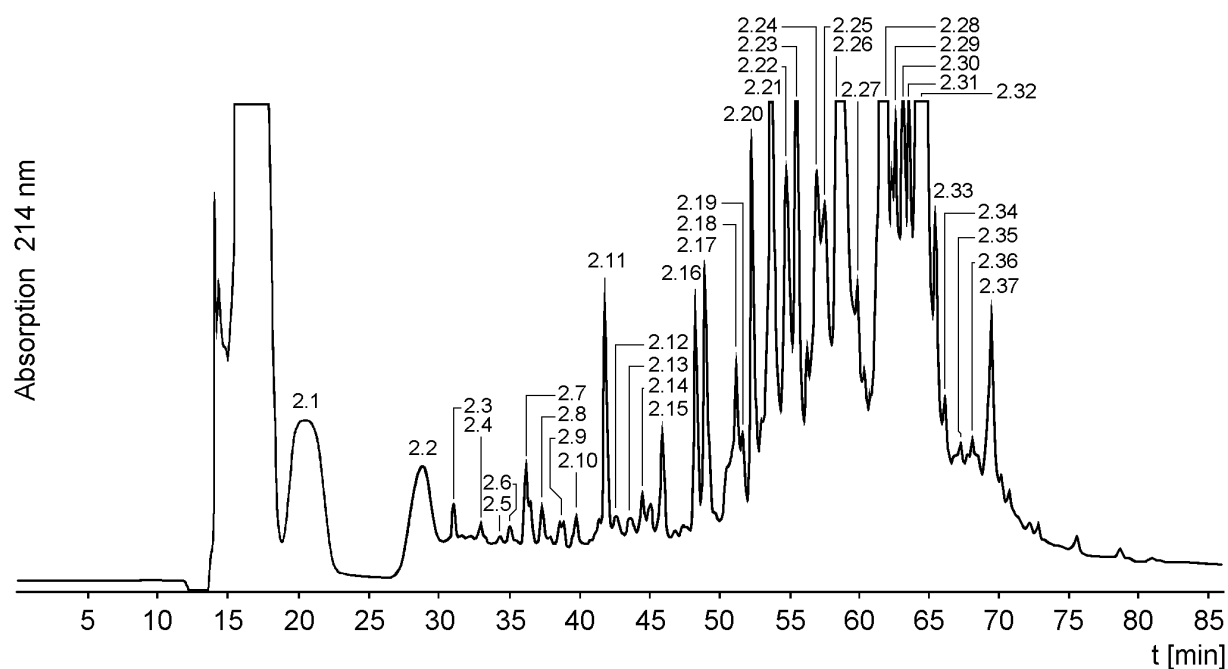


Abb. 24. HPLC-Trennung der 2. Hälfte des Lys-C-Verdaus. Bedingungen: Säule: Nucleosil 7 C₁₈; Elutionsmittel: Puffer A: 0.16% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 60% CH₃CN in Wasser; Gradient: 5 min 0% Puffer B, 0% - 100% Puffer B in 65 min; Fließgeschwindigkeit: 1.2 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 1.5 mg·mL⁻¹; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Tabelle 8. Fragmente aus der 2. HPLC-Trennung des Lys-C-Verdau von KLH2-c (M in Da).

Fragment	T _R [min]		Sequenz	[MH ⁺] _{exp}	M _{ber}
LC 2.16	48.60	11 - 25	NVHSLTAEEQNSLRR	1751.4	1753.8
LC 2.19	51.50	77 - 88	LLTVQGENALRK	1341.5	1341.6
LC 2.29	58.97	89 - 104	HGFTGGLPYWDWTRPM	1922.5	1921.2
LC 2.22a	54.67	105 - 133	SALPHFVADPTYDDSVSSL EEDNPYSHGH.....	n.d.	3187.5
LC 2.22b	54.67	136 - 163	SVGHD TTRAVRDDL YQSP GFGHYTDIAK	n.d.	3107.4
LC 2.34	65.34	181 - 198	FEIAHNSIHALVGGNEPY	1908.7	1907.1
LC 2.31	63.85	282 - 308	DDFNYEYSLNFNGLSIAQL DRELQR	3109.4	3150.4
LC 2.32	64.72	311 - 353	SHDRVFAGLLHEIGQSALV KFYVCKHHVSDCDHYAGE FYILG....	n.d.	6626.5

Aus den Lys-C-Fragmenten LC 1.6a und LC 2.16 sowie LC 1.16a und LC 2.29 wurden dieselben Sequenzen erhalten. LC 1.9 und LC 2.22b, LC 1.12 und LC 2.22a sowie LC 1.19 und LC 2.32 lieferten Sequenzen im selben Bereich, allerdings zum Teil mit unterschiedlichen N-Termini und auch unterschiedlichen Längen. In dieser Gruppe befinden sich die Fragmente die nicht bis zum Ende sequenziert werden konnten.

4.1.2.3 Chymotryptischer Verdau

Die für den chymotryptischen Verdau vorgesehene Probe wurde zuerst mit β -Mercaptoethanol reduziert und mit 4-Vinylpyridin umgesetzt. Aus der Trennung der Probe nach dem Verdau mit Chymotrypsin wurden 47 Fragmente gesammelt (Abb. 25). In den Sequenzen wurden nicht nur Spaltungen C-terminal an Tyrosin und Phenylalanin, sondern auch C-terminal an anderen hydrophoben Aminosäuren gefunden, etwa an Tryptophan (AS 74, 223, 226) oder an Leucin (AS 23). Ebenso wie Endoproteinase Lys-C, hydrolysierte auch Chymotrypsin die Methionin-Serin-Bindung zwischen AS 104 und 105. Durch Schnitte an unterschiedlichen Stellen wurden aus diesem Verdau zahlreiche Überlappungssequenzen gewonnen. In Tabelle 9 sind nur die zur Verifizierung der Primärstruktur notwendigen Sequenzen aus dem CT-Verdau angegeben. Nach Auswertung aller erhaltenen CT-Sequenzen waren etwa 90% der Primärstruktur aufgeklärt.

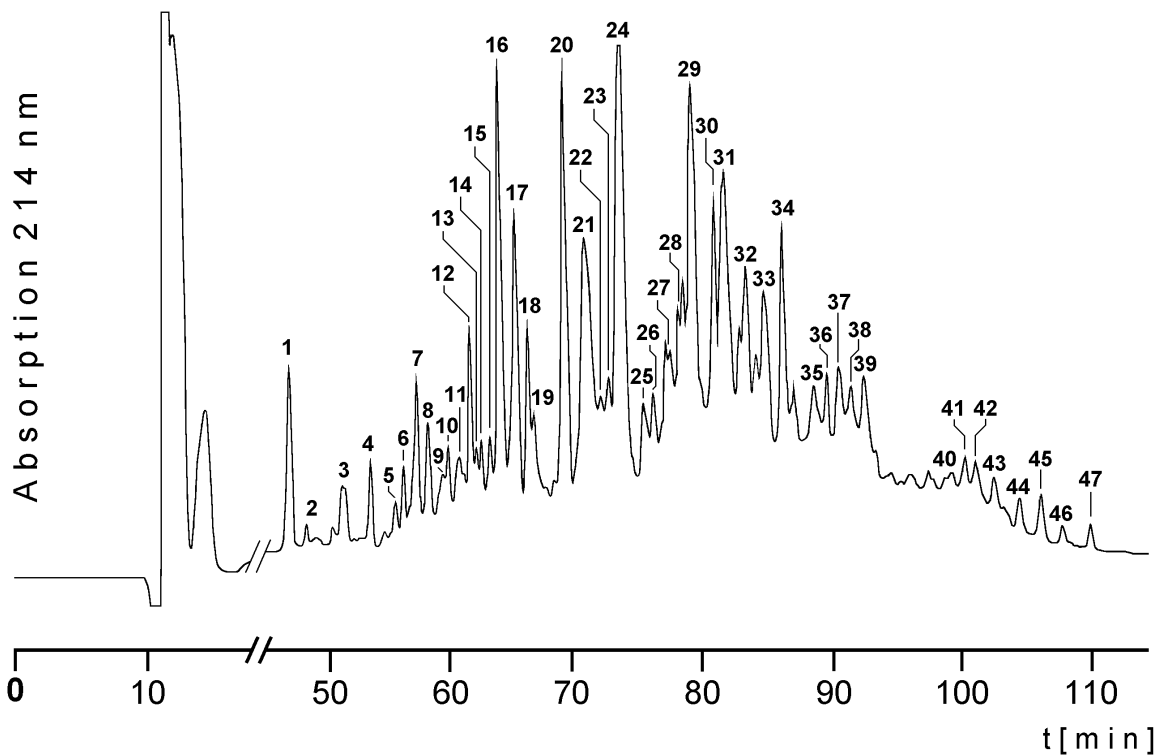


Abb. 25. Chromatogramm des chymotryptischen Verdaus von KLH2-*c*. Säule: Nucleosil 7 C₁₈ (250×10 mm); Elutionsmittel: Puffer A: 0.1% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 80% CH₃CN in Wasser; Gradient: 5 min 0% Puffer B, 0% - 100% Puffer B in 110 min; Fließgeschwindigkeit: 1.2 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 1 mg·mL⁻¹; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Tabelle 9. Peptidfragmente aus der HPLC-Trennung des chymotryptischen Verdaus von KLH2-*c* nach der Umsetzung mit 4-Vinylpyridin (M in Da).

Fragment	T _R [min]	Position	Sequenz	[MH ⁺] _{exp}	M _{ber}
CT 29	79.30	1 - 31	DFGHSKKIRKNVHSLTAAE QNSLRRAMDDLQDDKTRG GF	4392.7	4389.4
CT 24	73.85	24 - 45	RRAMDDLQDDKTRGGFQQ IAAF	2541.0	2539.8
CT 12	62.50	46 - 61	HGEPKWCP RPEAEKKF	2046.5	2044.2
CT 34	86.16	62 - 74	ACCVHGM AVFP HW	1565.5	1562.8
CT 15	64.05	79 - 91	GENALRK HGF	n.d.	1128.5
CT 31	81.83	79 - 97	TVQGENALRK HGF TGG LP	2048.2	2045.3

Tabelle 9. Fortsetzung

Fragment	T _R [min]	Position	Sequenz	[MH ⁺] _{exp}	M _{ber}
CT 22	72.24	105 - 129	SALPHFVADPTYKDGVLSSL EEDNPY	2053.5	2056.3
CT 44	104.33	130 - 198	SHGHIDSVGHDTTRAVRD DLYQSPGFGHYTDIAKQVL LALQDDFCDFEVQFEIAH	7982.4	7698.4
CT 13	62.96	151 - 158	QSPGFGHY	897.9	892.3
CT 22	72.23	159 - 174	TDIAKQVLLALEQDDF	n.d.	1819.2
CT 18	66.59	188 - 205	IHALVGGNEPYGMSTLEY	1952.5	1951.2
CT 39	92.51	199 - 226	GMSTLEYFLYDPIFFLHHS NTDRLWAIW	3476.9	3474.0
CT 20	69.42	214 - 223	LHHSNTDRLW	1278.5	1278.4
CT 33	84.95	214 - 226	LHHSNTDRLWAIW	1650.2	1648.9
CT 27	77.26	224 - 232	AIWQALQKY	1201.5	1120.3
CT 6	56.52	227 - 237	QALQKYRGKPY	1354.5	1351.6
CT 1	48.00	233 - 237	RGKPY	622.5	619.7
CT 3	54.22	238 - 250	NTANCAIVRHDTY	1586.7	1582.6
CT 19	67.23	251 - 257	RKPLQPF	887.6	885.1
CT 24	73.85	258 - 279	GLDSVINPDDETREHSVPR	2503.8	2497.7
CT 23	72.87	280 - 294	NYKDDFNYESLNF	2503.8	1961.0
CT 36	89.45	295 - 332	NGLSIAQLDRELQRIKSHD RVFAGFLLEIGQSALVKF	4322.8	4312.8
CT 37	90.61	295 - 319	NGLSIAQLDRELQRIKSHD RVFAGF	4519.2	2871.8
CT 26	75.53	321 - 333	LHEIGQSALVKFY	1505.2	1504.8
CT 35	88.46	346 - 360	AGEFYILGDEAEMPF	1687.2	1688.9
CT 7	57.86	361 - 366	AYDRVY	785.7	784.6
CT 27	77.26	367 - 385	KYEISQALHDLDLHVGND F	2295.6	2214.4
CT 30	79.95	390 - 408	EAFNLNGGSLGGVDLSQPS	3648.7	3042.3
CT 17	65.65	405 - 420	SQPSVIFEPAAAGSHTA	1599.5	1598.9

Die Fragmente CT 23, CT 30, CT 37 und CT 44 wiesen sehr große Unterschiede zwischen den gemessenen und den experimentell bestimmten Massen auf. Alle Fragmente enthielten einen oder

mehrere Serin- oder Threoninreste, also potentielle Bindungsstellen für *O*-glykosidische Kohlenhydratseitenketten und es ist anzunehmen, daß diese Fragmente glykosiliert waren. Eine genauere Verifikation war jedoch aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich.

4.1.2.4 Spaltung mit Bromcyan

Die Trennung der Bromcyanreaktion ergab 25 Fraktionen, die zum Teil sehr eng hintereinander eluiert wurden und dementsprechende Verunreinigungen durch verschleppte Peptide aufwiesen. Aus der Umsetzung mit Bromcyan wurden nicht nur Schnittstellen C-terminal an Methioninresten erhalten. Es wurden auch Fragmente mit einem C-terminalen Arginin (CB 6, CB 16) gefunden, Fragment CB 6 folgte auf einen Tyrosinrest, CB 11 folgte auf ein Histidin (His¹¹⁰) und endete mit einem Serin, CB 16 folgte auf ein Phenylalanin (Phe²⁵⁷) und CB 21 folgte auf ein Asparagin (Asp¹³⁵). Ebenso wie Lys-C schnitt Bromcyan die Asp¹³⁵-Ser¹³⁶-Bindung.

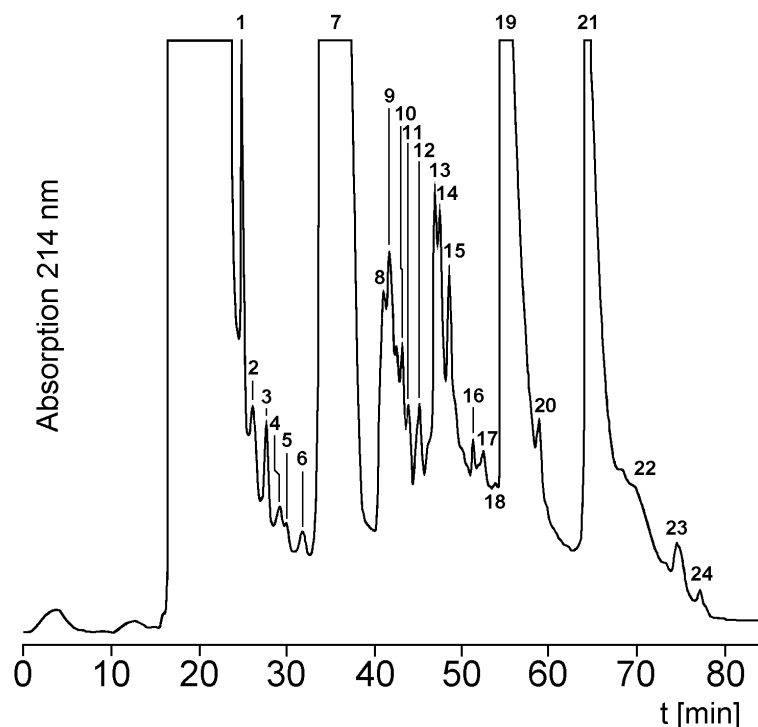


Abb. 26. HPLC-Trennung des nach der Bromcyanspaltung von KLH2-c erhaltenen Peptidgemisches. Säule: Nucleosil 7 C₁₈ (250×10 mm); Elutionsmittel: Puffer A: 0.1% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 80% CH₃CN in Wasser; Gradient: 10 min 10% Puffer B, 10% - 100% Puffer B in 100 min; Fließgeschwindigkeit: 1.0 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 1.5 mg·mL⁻¹; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Tabelle 10. Aus der HPLC-Trennung der Umsetzung von KLH2-*c* mit Bromcyan identifizierte Peptidfragmente (M in Da).

Fragment	T _R [min]	Position	Sequenz	[MH ⁺] _{exp}	M _{ber}
CB 3	41.97	1 - 27	DFGHSKKIRKNVHSLTAE E QNSLRRAM	n.d.	2964.3
CB 13	47.33	28 - 68	DDLQDDKTRGGFQQIAAF HGEPKWCPRPEAEKKFAC	4649.8	4648.3
CB 11	44.07	111 - 120	FVADPTYDDSVS	1317.0	1315.5
CB 6		130 - 143	SHGHIDSVGHDTTR	n.d.	1518.8
CB 21a	64.84	136 - 200	SVGHDTTRAVRDDL YQSP GFGHYTDIAKQVLLALE Q DDFCDFEVQFEIAHNSIHA	7403.7	7345.0
CB 21b	64.84	201 - 275	STLEYFLYDPIFFLHHSNT DRLWAIWQALQKYRGKPY NTANCAIVRHDTYRKPLQP FGLDSVINPDDETREHSVP	n.d.	18774.0
CB 16	52.57	258 - 275	GLDSVINPDDETRKHSVPR	2137.0	2135.4
CB 19	55.79	359 - 420	PFAYDRVYKYEISQALHDL DLHVGDNFHLKYEAFNLN GGSLGGVDLSQPSVIFEP A AGSHTA	n.d.	8612.9

4.1.2.5 Die Primärstruktur von KLH2-*c*

Abb. 27 zeigt die gesamte Primärsequenz mit den aus den drei Spaltungsreaktionen erhaltenen Überlappungsfragmenten und Abb. 28 eine vergleichende Übersicht der Funktionellen Einheit KLH2-*c* mit allen bisher veröffentlichten Sequenzen von FE der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (HpHβ-*d* [13], HpHβ-*g* [14]), der Meeresschnecke *Rapana thomasi* (RtH2-*a* [19]), sowie den Kopffüßern *Octopus dofleini* (OdH-*a* bis OdH-*g* [20]) und *Sepia officinalis* (SoH-*h* [16], SoH-*f* und SoH-*g* [15, 16], die beiden letzteren nicht komplett). Konservierte und isofunktionelle Aminosäuren sind grau unterlegt.

1	5	10	15	20	
D F G H S K K I R K N V H S L T A E E Q N S L R R					25
← - - - - - - - - - - - - - N- T e r m - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CT 29 - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CT 11 - - - - - - - - - → ← CT 24					
← - LC 1.3 - - - - - - - - - - - - - LC 1.6a - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CB 3 - - - - - - - - -					
	30	35	40	45	
A M D D L Q D D K T R G G F Q Q I A A F H G E P K					50
- - - - - - - - - - - - - N- T e r m. - - - - - - - - -					
- CT 29 - - - - - - - - - - - - - →					
- - - - - - - - - - - - - CT 24 - - - - - - - - - → ← - CT 12 -					
← - - - - LC 1.5 - - - - - - - - - - - - - LC 1.8 - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CB 13 - - - - - - - - -					
	55	60	65	70	
W C P R P E A E K K F A C C V H G M A V F P H W H					75
- - - - - - - - - - - - - N- T e r m. - - - - - - - - - †					
- - CT 12 - - - - - - - - - - - - - → ← - - - - - - - - -					
← - - - - LC 1.11a - - - - - - - - - - - - - LC 1.11b - - - - - - - - -					
- - - - - - - - - - - - - CB 13 - - - - - - - - - →					
	80	85	90	95	
R L L T V Q G E N A L R K H G F T G G L P Y W D W					100
← - - - - - - - - - - - - - CT 31 - - - - - - - - - →					
LC 1.11b ← - - - - - - - - - - - - - → ← - - - - - - - - - LC 1.15 - - - -					
	105	110	115	120	
T R P M S A L P H F V A D P T Y D D S V S S L E E					125
- - - LC 1.15 - - - - - - - - - - - - - CT 21 - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - LC 1.12 - - - - - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CB 11 - - - - - - - - - - - - -					
	130	135	140	145	
D N P Y S H G H I D S V G H D T T R A V R D D L Y					150
- CT 21 → - - - - - - - - - - - - - CT 16 - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CT 44 - - - - - - - - - - - - -					
- - LC 1.12 - - - - - - - - - - - - - † ← - - - - - - - - - LC 2.22 b - - - - - - - - -					
← - - - - - - - - - - - - - CB 21 - - - - - - - - - - - - -					

Abb. 27. Aminosäuresequenz von KLH2-c mit Sequenzierungsstrategie. Abgebildet sind nur die zur zweifelsfreien Identifikation der Aminosäuren notwendigen, aus den Verdaus mit Endoproteinase Lys-C (LC) und Chymotrypsin (CT), sowie aus der Spaltung mit Bromcyan (CB) erhaltenen Peptidfragmente. Nicht bis zum Ende durchsequenzierte Fraktionen sind mit † gekennzeichnet.

		155		160		165		170		175																	
	Q	S	P	G	F	G	H	Y	T	D	I	A	K	Q	V	L	L	A	L	E	Q	D	D	F	C		
	←	-	-	CT	12	-	-	→	←	-	-	-	-	-	-	CT	22	-	-	-	-	-	-	-	→		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CT	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	LC	2.22	b	-	-	-	-	-	-	→														
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	D	F	E	V	Q	F	E	I	A	H	N	S	I	H	A	L	V	G	G	N	E	P	Y	G	M	200	
	-	-	-	-	-	←	-	CT	11	-	-	→	←	-	-	-	-	-	-	-	CT	18	-	-			
	-	-	-	-	-	CT	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→	←	CT	39	
	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→	
	S	T	L	E	Y	F	L	Y	D	P	I	F	F	L	H	H	S	N	T	D	R	L	W	A	I	225	
	-	CT	18	-	-	-	-	→						←	-	-	-	-	-	CT	33	-	-	-			
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CT	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→	←	CT	27	
	←	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CT	33	→																									
		-	CT	27	-	-	-	→	←	CT	1	-	→	←	-	-	-	-	-	CT	3	-	-	-	→		
CT	39	→	←	-	-	-	-	-	CT	6	-	-	→														
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	R	K	P	L	Q	P	F	G	L	D	S	V	I	N	P	D	D	E	T	R	E	H	S	V	P	275	
	←	-	CT	19	-	-	→	←	-	-	-	-	-	-	CT	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
						←	-	-	-	-	-	-	-	LC	1.6	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	★	
	R	D	V	F	N	Y	K	D	D	F	N	Y	E	Y	E	S	L	N	F	N	G	L	S	I	A	300	
	-	CT	24	→	←	-	-	-	-	-	CT	23	-	-	-	-	-	→	←	-	-	CT	37	-			
LC	1.16b	←	-	LC	1.6b	→	←	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	2.31	-	-	-	-			
	Q	L	D	R	E	L	Q	R	I	K	S	H	D	R	V	F	A	G	F	L	L	H	E	I	G	325	
	-	-	-	-	-	CT	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→			
																								←	CT	26	-
	LC	2.31	-	-	-	-	→			←	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	2.32	-	-		

Abb. 27. Fortsetzung

330	335	340	345	
Q S A L V K F Y V	C K H H V	S D C D H	Y A G E F Y	350
CT 26 - - - - - - →	- - - - - - -	- - - - - - -	← - CT 36 -	
- - - - - - -	- - - - - - -	- LC 2.32 - - - -	- - - - - - -	
355	360	365	370	
I L G D E A E M P	F A Y D R	V Y K Y E	I S Q A L H	375
- - CT 36 - - - - - →	← - CT 7 - - - - -	← - - - - - -	CT 27 - - -	
LC 2.32 ✦	← - - - - - -	- CB 19 - - - - -	- - - - - - -	
380	385	390	395	
D L D L H V G N D	F H L K Y	E A F N L	N G G S L G	400
- - - - CT 27 - - - - - →	- - - - - - -	← - - - - - -	- - - CT 30 - -	
- - - - - - -	- - - - - - -	← - - - - - -	LC 1.16d - -	
- - - - - - -	- - CB 19 - - - - -	- - - - - - -	- - - - - - -	
405	410	415	420	
G V N L S Q P S	V I F E P A	A A G S H T	A	
- CT 30 - - - - - ✦	- - - - - - -	- - - - - - -	- - - - - - -	
← - - - - - -	- - - - - - -	CT 17 - - - - -	- - - - - - -	
- - - - - - -	LC 1.16d - - - - -	- - - - - - -	✦	
- - - - - - -	- - - - - - -	CB 19 - - - - -	- - - - - - -	
- - - - - - -	- - - - - - -	- - - - - - -	- - - - - - -	

Abb. 27. Fortsetzung

Wie der Vergleich zeigt, befinden sich die Regionen mit der höchsten Anzahl an Austauschungen im N- und im C-Terminus, während im zentralen Bereich eine sehr hochkonservierte Struktur sichtbar wird. Am interessantesten war hierbei der Vergleich mit der entsprechenden funktionellen Einheit des *Octopus*-Hämocyanins, die, obwohl *Megathura* und *Octopus* zu verschiedenen Familien der Mollusken gehören, eine hohe Übereinstimmung an konservierten Aminosäuren zeigt. Vor allem die sechs Histidinreste, die mit den beiden Kupferatomen koordiniert sind, und die Positionen 41, 61 und 70 für das "A"-Zentrum sowie 182, 186 und 213 für das "B"-Zentrum, aber auch die das Aktivzentrum umgebenden Bereiche zeigen einen hohen Grad an Übereinstimmung. Das Motif FxxxH, dessen Histidin der dritte Ligand im Triplet der kupferbindenden Liganden ist, und das sowohl bei Arthropoden als auch bei Mollusken und Tyrosinasen im "A"- und im "B"-Kupferzentrum konserviert ist, erscheint auch in der Sequenz des KLH2-c. Wie aus dem Vergleich mit den anderen Primärsequenzen hervorgeht, kann in dieses Motif das Glutamat in Position 13 des Cu_A-Zentrums (FxxxHxxxxxxxxE) und ein Asparaginsäure- bzw. Glutamatrest in Position 9 des Cu_B-Zentrums (FxxxHxxxD/E) mit einbezogen werden, die sowohl in allen Hämocyaninen und Tyrosinasen als auch in KLH2-c konserviert sind [21, 47, 132, 133]. Ebenso findet man in KLH2-c

die Reste Phe⁶⁶, Phe²⁰⁹ und Leu³⁵², die, wie man der Kristallstruktur von OdH-g [21] entnehmen kann, innerhalb von 5 Å um den Mittelpunkt des Cu-Cu-Abstandes lokalisiert sind, und von denen man annimmt, daß sie mit zur Stabilisierung des Aktivzentrums beitragen. Die Kristallstruktur macht auch deutlich, daß der größte Teil der streng konservierten Aminosäuren entweder in α -Helices oder β -Faltblattstrukturen plaziert sind.

Alignment Position	10	20	30
KLH2-c:	D F G H S K K I R R K N V H S L T A E E Q N N S L R R A M D D L Q D D K T R G G		
OdH-c:	Y R S R R R D V S S L T D A E D M N A L L R K A L M Q A Y E D D K D A S G G		
RtH2-a:	S L L R R K N V D S L T E E E I L T L Q S V M R E L Q N D S S E H G G		
OdH-a:	N L I R R K D V D A L S E E E V L N L Q V A L R A M Q D D E T P T G G		
OdH-b:	L N V R R K D L Q S L T T E E E Y E L R V A M E R F M D D K S I D G G		
OdH-d:	N R I R R K N L N A L T D G D M E S L R K A F K D M T T D - - G R		
OdH-e:	Y L V R R K N V E R L S L S E M N S L I H A F R R M Q R D D K S S D G G		
OdH-f:	N H I R R N V E S L D E R D I Q N L M A A L T R V K E D E S D H G G		
OdH-g:	A I R R K N V N S L T P S D I K E L R D A M A K V Q A D T S D N G G		
HpH β -g:	D I H T T A V A F V F V R K D V T R L T V S E T E N L R E A L R R I K A D N G S D G G		
HpH β -d:	D A V T V A S H V R K D L D T L T D G - M E S L R K A F K D M T T D - - G R		
SoH-h:	D H D T E T L I S L N V N S L S P S E I K N L R D A L V A V Q A D K S G N G G		
SoH-f:	S V R G N L V R K N V D R L S L Q E V N S L V H A L V A V Q A D K S S D G G		

40 *	50	60 *	70*
KLH2-c:	F Q Q I A A F H G E P K W C P R P E A E E K K F A C C V H G M A V F P H W H R L L		
OdH-c:	Y Q Q V A A F H G S T P K W C P S P P D A E E V K K Y A C C H H G M A V F P H W H R L L		
RtH2-a:	F Q S I A S F H G S P P L C P R P E A N K K V A C C V H G M A S F P Q W H R I F		
OdH-a:	Y Q A I A A Y H G S E P A D C C K R A P D G S T - V V C C L H G M P T F P L W H R L Y		
OdH-b:	Y Q A L A E F H G L P A K C C P E P D A I N R V A C C V H G M S T F P H W H R L V		
OdH-d:	Y E E I A S F H G L P A Q C C P N K D G S K V Y T C C I H G M P T F P H W H R L Y		
OdH-e:	F E A I A S F H A L P P L C C P S P T A K H R H A C C L H G M A T F P H W H R L Y		
OdH-f:	F Q T I A S Y H G S T - L C P S P - E E P K Y A C C L H G M P V F P H W H R V Y		
OdH-g:	Y Q K I A S Y H G I P L S C H Y E - N G T A Y A C C Q H G M V T F P N W H R L L		
HpH β -g:	F Q S I A S F H G S P P G C E N - E N H S V A C C I H G M A N F P Q W H R L Y		
HpH β -d:	Y E E I A S F H G L P G L C Q H - - E G H K V A C C V H G M P T F P S W H R L Y		
SoH-h:	Y Q K I A S Y H G M P L S C H Y P - N G T A F A C C Q H G M V T F P H W H R L Y		
SoH-f:	F E S I A S F H A L P P L C P I N P T A K H R Y A C C L H G M A T F P Q W H R L Y		

80	90	100	110
KLH2-c:	T V Q G E N A L R K H G F T G G L P Y W D W T R P M S A L P H F V A D P T Y D D		
OdH-c:	T V N F E N A L R H N G Y Q N G I P Y W D W T R P L S E L P T L V K D E T Y A D D		
RtH2-a:	T K Q M E A A L M G H G A K V G M P Y W D W T T S F T K L P R F I P Y D D E Q L		
OdH-a:	T V Q F E Q T M V A H G S K L G V P Y W D W T Q P L N H L P E L V S H P L F M D		
OdH-b:	V M Q F E D A L L A R G S P I G V P Y W D W T T P S S S L P H L V A V E T Y E D		
OdH-d:	V A L V E N E L L A R G S G V A V P Y W D W V Q P F D H L P A L V N R A T Y Y N		
OdH-e:	V V Q F E Q A L H R H G A T V G V P Y W D W T R P I S K I P D F I A S K R Y S D		
OdH-f:	L L H F E D S M R R H G S S V A T P Y W D W T Q P G T K L P R L L A D S D Y Y D		
OdH-g:	T K Q M E D A L V A K G S H V G I P Y W D W T T T F A N L P V L V T E E K - - -		
HpH β -g:	V K Q W E D A L T A Q G A K I G I P Y W D W T T A F T E L P V L V T E E V - - -		
HpH β -d:	V E Q V E A L L D H G S S V A V P Y F D W I S P I Q K L P D L I S K A T Y Y N		
SoH-h:	M K Q M E D A M K A K G A K I G I P Y W D W T T T F S H L P F L V T E P K - - -		
SoH-f:	V V Q F E Q S L N R H G A T V G V P Y T D W T Y P M K E V P H L L T S E K		

Abb. 28. Vergleich der Primärsequenz von KLH2-c mit Sequenzen von FE der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (HpH β -d [13], HpH β -g [14]), der Meeresschnecke *Rapana thomasiana* (RtH2-a [19]), sowie den Kopffüßern *Octopus dofleini* (OdH-a bis OdH-g [20]) und *Sepia officinalis* (SoH-h [16], SoH-f und SoH-g [15, 16], die beiden letzteren nicht komplett).

120 130 140 150

KLH2-c: S V S S L E E D N P Y S H G H I D S V G H E D - - T T T R R A V R D D L Y Q S P G F G
 OdH-c: - E N G E T H P N N P F F V S G V - I D D E I D L E E H D - - T T T R R S P Q N P P E L F L K D P P E G G
 Rth2-a: - - - - - - - N N P F V R - - - I - T G L - - F T T H H F T T T A R R A V D D T R L F Q A S P K G G
 OdH-a: P T A H K A K K N N V F Y S G D I A F E L - - K K T T T A R R A V D D T R L F Q A S P K G G
 OdH-b: P Y T K E V K P N N P F F Y H A G K I S F L L H - N D V E F T A R R N D V Q S E E L F F E K P T K G
 OdH-d: S R T L L E D P N N P F F K G G K I S F F L - - - S E T N R R N D P V S E E L F F - - - P V L G G
 OdH-e: P F T K L E D Y N N P F F L R Q G Y I K T E S - E D T T E T T K R R E V S E E Y L F F E H - P V L G G
 OdH-f: A W T D N V T E N N P F F L R G G Y I K T E S - - D T Y T T V R R D V V K P E Y L F F E I - - V L G G
 OdH-g: - - - - - - - D N S F H H A H I D V A - - - N T T D T T T R S P R R A Q L F F D D P D K G G
 HpHβ-g: - - - - - - - P N P F F H H G T I Y - - - N G E I T T T R A P R D K L F F N D P P E F - - -
 HpHβ-d: S R E - - - - D N P F F F S G K V I A - - - G E D A V T T T R R A P R Q P E L F F - - - -
 SoH-h: - - T L L V - - N N P F F H H G Y I D - - - V A D T K T T R R N P R P Q L F F D D P E Q G

160 170 180 * * 190

KLH2-c: H Y T D I A K Q V L L A L E Q Q D D F C D F E V V Q F F E I A H N N S I H A L V G G N E
 OdH-c: H F T P L G D R E V M Y A L E Q Q E D D F C D F F E V V Q F F E I A H N N S I H A L V G G G N E
 Rth2-a: D E S F F F R Q V L L A L E Q Q E D D Y C D F F E V V Q F F E I A H N N S I H A Y L V G G H Q
 OdH-a: K N - F L L E G V L L S A L E Q Q E D D Y C D H F E V V Q F F E V A H N N P I H Y L V G G G R N E
 OdH-b: H H G Y L H D G M L L A F E Q Q E D D F C D F E V V Q F F E V T H N N A I H A W L V G G G N E
 OdH-d: N K - Y L Y E H T L L F V L E Q T D D F C D F E V V H F E V L H N N T I H S W L V G G G R E
 OdH-e: K Q T W L F D N I A L L A L E Q Q T D Y C D F E I Q L E I V H N N A I H S W L V G G G K E
 OdH-f: E G S T L Y Q N V L L M L E Q T E D Y C D F E V V Q F F E I V H N N S I H Y L V G G G H Q
 OdH-g: D K S F F Y R Q V L L A L E Q Q T D D F C D F E V V Q F F E I G H N N A I H S W L V G G G S S
 HpHβ-g: K E S F F Y R Q V L L A L E Q Q T D Y C D F E V V Q Y E I S H N N A I H S W L V G G G S S
 HpHβ-d: N N N Y F E Y Q A L L Y A L E Q Q D N F C D F E I Q F E V L H N N A L H S W L V G G H A
 SoH-h: D Q S F F Y R Q I A F A L E Q R D F C D F E I Q F E M G H N A I H S W L V G G S S

200 210 * 220 230

KLH2-c: P Y G M S T L E Y F L Y D P I F F L H H S N T D R L W A I W Q A L Q K Y R G K P
 OdH-c: P Y S M S S L E Y T T A Y D P L F F I L H H S N V D R L W A I W Q Q A L Q K Y R G H R
 Rth2-a: K Y G M S S L E Y T T A Y D P L F F L H H S N V D R L W A I W Q Q A L Q K Y R G L P
 OdH-a: T H S M S S L E Y T T S Y D P L F F L H H S N V E R L F T I W Q Q A L Q K H R G L D
 OdH-b: P Y S M S S L H Y T T S F D P L F W L H H S S Q V D R L W A V W Q Q A L Q I Y R G K P
 OdH-d: P H S M S S L D F A A A Y D P I F F L H H S N V D R L W A I W Q Q A L Q R Y R G L P
 OdH-e: E H S L N H L L Y A A Y D P I F F L H H S N V D R L W A I W Q Q E L Q K L N K L N
 OdH-f: K Y A M S S L V Y T S S F D P I F Y V H H S M V D R L W A I W Q Q A L Q E H R H L P
 OdH-g: P Y G M S T L H Y T T S Y D P L F F Y L H H S N T D R L W A V W Q Q A L Q K Y R G L P
 HpHβ-g: P Y G M S T L E Y T T A Y D P L F L L H H S N T D R L W A I W Q Q E L Q R Y R G L P
 HpHβ-d: K Y S F S S L D Y T A F D P V F F L H H A N V D R L Q F A I W Q A L Q K F R G L P
 SoH-h: P Y G M S S L H Y T T S Y D P L F Y L H H S N T D R L W A I W Q Q A L Q K Y R G L P

240 250 260 270

KLH2-c: Y N T A N C A I V R H D T Y R K P L Q P G L D S V I N P D D E T R E H S V P R
 OdH-c: Y N S A N C A I E T - - - L R K P M Q P F F S L T S D I N N I D P M T R E H S V P F
 Rth2-a: Y D E S A N C G V E L - - - M R E P L M Q P F F A Q T S A T N N P N N V T R A H S T K V
 OdH-a: G N - A N C G L N E M - - - F H K P L M E P F F A G R D T - - - N N P I S L T T K E H A K A V
 OdH-b: Y K - P Y C G A L S E - - - V H R P L K P F F A F E P P L - - - N N N D R M T T H A H S V P T
 OdH-d: Y N E A N C A L P L - - - L N V P M R P F F S N T T A - - - N H D R M T T T H S A P N
 OdH-e: A Y E S H C A L E L - - - M K V P L K P P F S F G A P Y - - - N L N D L T T K L S K P E Q
 OdH-f: F D K A Y C A L E Q - - - L S F P P M K P F F N W E S - - - N P N A L H T R A A S T P Q A
 OdH-g: Y N T A N C E I N K - - - L V K P L K P P F V N L D T - - - N P N A V T K A H S T G A
 HpHβ-g: Y N S A N C A I Q L - - - L H Q P M R P P F S D A D - - - N V N P V T R T N S R A R A
 HpHβ-d: Y N E A D C A I N L - - - M R K P L L Q P F F Q D K K L - - - N P R N E V T T N I Y S R P A
 SoH-h: Y N S A N C E I N K - - - L K K P M P P F S S D D - - - N P N E V T T K A H S T G T
 SoH-g: Y N S A N C E I N K - - - L K K P M P P F S S D R E S N P N P A T T R A V S T P N

280 290 300 310

KLH2-c: D V F N Y K D D N D Y E Y E S L E N F N G L S I A Q L D R E L Q R I - K S H D R V
 OdH-c: D V F N Y K K N F H Y E Y D T L L E N N G L S I P Q L L H R E S L R R R Q - K A K S R I
 Rth2-a: S L F N Y R Q L A G Y Y D T L T L N G M T I S Q L L E R S L R R R Q K E E D R V
 OdH-a: D V F N Y - N E L G Y Y D Y D D L H L N G G M D I P E L L D Q T M L K E E R Q - Q H P R S
 OdH-b: H V Y D Y Q S D L H Y T Y D T L F F G M S V R E L Q R H I E E D K - A K D R V
 OdH-d: D V F D Y Q N V L H Y K Y D T L S F Y D L T I T Q L D H L I E E R K - S H D R I
 OdH-e: D M F R Y K D N F H Y E Y D L D I N S M S I N Q I E S S Y I R H Q Q R D H D R V
 OdH-f: H L F D D - N K L G Y K Y D N L E F H G M N I D Q L E S N A I H K Q Q - N K D R V
 OdH-g: T S F D Y - H K L G Y Q Y D N L N F H G M T I P E L E E H L K E I Q - H E D R V
 HpHβ-g: D V F N Y - D R L N Y Q Y D D L E N F H G L S I S E L N D V L - - - - A R I
 HpHβ-d: D T F N D Y R N H F H Y E Y D T L E L N H Q Y V P Q L E N L L K R R Q - E Y G R V
 SoH-h: K
 SoH-g: K L F D F - K S L G Q N Y D N L D F H G M D T A H L E A A I K K Q K Q - K D R V

320 330 340 350

KLH2-c: F A G F L L H E I G Q S A L V K F Y V C K H H V S D - - - C D H Y A G E F Y
 OdH-c: F A T F M L E G I K Q S A L V E Y Y I - R A H G S T D - - - - - Q D L K A G E F Y
 Rth2-a: F A G F L L R G I G S S A D V T F D L C D K D E H - - - - - C D N F - A G S F A
 OdH-a: F A N F R L L G G I K T S A N V R V A V C I P S E D E K R H S D N N C H V F F
 OdH-b: F V G F L L M G I K T S A N V V I N V - E S A G N - - - - - T Y M A G T I T S
 OdH-d: F A G F L L H S G V Q A S A D I H V F F I C V P T S K H E - - - E N C A H D V G V F S
 OdH-e: F A G F L L S G F G S S A Y A T F E I C I E G - - - - - G C C H E - G S H F S
 OdH-f: F A S F L L F G I K T S A D V H L K L C K D - - - - - E T C C E D - A G V V F
 OdH-g: F A G F L L R T I G Q S A D V N F D V C C T K D - - - - - G E C C T F - A G T F A
 HpHβ-g: F A E F L L H G I G Q S A D V T F D L C D A H - - - - - D H C C E F - A G T F A
 HpHβ-d: F A G F L L H N N G Q S A D V T V Y V C V P S G P K G K - N D C C N H K A G V F S
 SoH-h: C A G F L L R A I G Q S A D V N F D I C R K D - - - - - G E C C K F - A G T F S
 SoH-g: F A G F L L H G I K T S A D V H L K V C N A - - - - - A D C C H E - A G V V F

Abb. 28. Fortsetzung

					360					370					380					390																									
KLH2-c:	I	L	G	D	E	A	E	M	P	F	A	Y	D	R	V	Y	K	Y	E	I	S	Q	A	L	H	D	L	D	L	H	-	-	-	-	-	-	V	G	D	N					
OdH-c:	I	L	G	S	A	N	E	M	P	W	K	F	D	R	V	Y	K	A	D	I	T	Q	Q	M	K	E	A	N	L	R	L	H	-	-	-	-	-	-	F	N	D	Q			
RtH2-a:	V	L	G	G	P	L	E	M	P	W	S	F	D	R	L	F	K	M	D	V	T	K	V	F	K	Q	M	R	L	R	R	P	-	-	-	-	-	-	D	D	S	E			
OdH-a:	I	L	G	G	V	H	E	M	T	W	D	F	G	Y	P	F	L	F	E	I	T	D	V	V	K	S	L	G	I	P	-	-	-	-	-	-	-	-	L	D	G	N			
OdH-b:	I	L	G	G	S	K	E	M	E	W	R	F	D	R	L	Y	K	Y	E	I	T	D	A	L	A	E	L	G	V	D	-	-	-	-	-	-	-	-	M	H	A	E			
OdH-d:	V	L	G	G	K	S	E	M	P	W	Q	F	A	S	V	F	Q	Y	E	I	T	D	Q	L	K	L	L	G	L	N	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	N	S	H			
OdH-e:	V	L	G	G	S	T	E	M	P	W	A	F	D	R	L	Y	K	I	E	I	T	D	V	L	S	D	M	N	L	A	-	-	-	-	-	-	-	-	F	D	S	A			
OdH-f:	I	L	G	G	D	N	E	M	P	W	H	F	D	R	T	Y	K	K	D	I	T	H	V	L	H	Q	M	H	I	P	L	E	D	L	Y	V	H	G	S	T					
OdH-g:	I	L	G	G	E	H	E	M	F	W	A	F	D	R	P	F	K	Y	D	I	T	T	S	L	K	H	L	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	D	A			
HpH β -g:	I	L	G	G	P	L	E	H	P	W	A	F	D	R	L	F	K	Y	D	V	T	D	V	F	S	K	L	H	L	R	P	D	-	-	-	-	-	-	-	S	E	Y	H		
HpH β -d:	V	L	G	G	E	L	E	M	P	F	T	F	D	R	L	Y	K	L	Q	I	T	D	T	I	K	Q	L	G	L	K	V	N	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A	A	S	
SoH-h:	V	L	G	G	Q	H	E	M	A	W	A	F	D	R	L	F	L	Y	D	I	S	R	T	L	L	Q	L	R	L	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	H	D	D	
SoH-g:	V	L	G	A	R	T	E	M	P	W	H	F	D	R	N	Y	K	M	D	I	T	D	V	L	H	E	M	H	I	P	M	E	A	F	E	-	-	-	-	-	-	H	D	S	K
																					400					410					420									430					
KLH2-c:	F	H	L	K	Y	E	A	F	N	L	N	G	G	S	L	G	G	V	N	L	S	Q	P	S	V	I	F	E	P	A	A	G	S	H	T	A									
OdH-c:	Y	H	I	E	Y	H	L	K	D	L	S	G	N	E	I	A	G	V	H	L	E	T	A	-	I	I	F	E	P	G	L	G	N	F	G	E	A	G	I	W					
RtH2-a:	Y	H	F	E	L	E	V	T	A	R	A	G	T	D	L	S	P	E	L	L	K	P	G	S	V	S	F	L	P	G	R	K	I	Q	N	T	P	D	V	R					
OdH-a:	Y	Y	V	H	A	D	V	T	E	I	N	G	T	L	L	P	D	G	T	I	P	R	P	T	V	S	Y	I	P	H	N	F	K	D	A	D	M	V	V	V					
OdH-b:	Y	S	I	N	L	Q	I	N	D	I	N	G	T	A	L	P	P	T	S	I	P	D	P	I	V	I	F	S	P	G	K	K	E	S	G	V	V	F	D	E					
OdH-d:	F	R	V	V	T	E	V	T	A	V	N	G	S	S	I	N	S	D	I	F	P	H	P	T	I	I	Y	V	P	K	Q	D	H	S	A	D	I	K	S	E					
OdH-e:	F	T	I	K	T	K	L	V	A	Q	N	G	T	E	L	P	A	S	I	L	P	E	A	T	V	I	R	I	P	P	S	N	E	D	A	D	I	D	T	P					
OdH-f:	I	L	L	E	V	E	I	E	T	V	D	G	K	V	L	D	S	S	S	L	P	A	P	S	M	I	Y	V	P	A	K	D	F	K	R	E	V	H	K	K					
OdH-g:	H	D	D	F	D	I	K	V	T	I	K	G	I	D	G	H	V	L	S	N	K	Y	L	S	P	P	T	V	F	L	A	P	A	K	T	T	H								
HpH β -g:	Y	H	F	N	I	H	I	V	S	V	N	G	T	E	L	D	S	H	I	I	R	S	P	T	V	Q	F	V	P	G	V	K	D	Y	Y	E	K								
HpH β -d:	Y	Q	L	K	V	E	I	K	D	L	N	G	T	L	L	D	P	H	I	L	P	D	P	S	I	I	F	E	P	G	T	K	E	R											
SoH-h:	F	D	V	K	V	T	I	M	G	I	D	G	K	S	L	P	T	T	L	L	P	P	P	T	I	L	F	K	P	G	T	G	Q	L	T	R									
SoH-g:	I	H	L	E	V	E	I	Q	S	V	D	G	A	I	L	D	S	H	S	L	P	T	P	S	L	I	Y	A	P	A	K	G	L	V	S	Q	V	H	I	E					
KLH2-c:	V	E	P	V	T	S	A																																						
OdH-c:	D	K	T	G																																									
RtH2-a:	L																																												
OdH-a:	E	G	N	E																																									
OdH-b:	L																																												
OdH-d:	T	V	G	D																																									
OdH-e:																																													
OdH-f:																																													
OdH-g:																																													
HpH β -g:																																													
HpH β -d:																																													
SoH-h:																																													
SoH-g:																																													

Abb. 28. Fortsetzung

Es existieren auch drei Regionen, die streng konserviert sind, jedoch in Übereinstimmung mit Cuff *et al.* [21] jeglicher regulären Sekundärstruktur entbehren. Es sind die Bereiche zwischen den Positionen 58 bis 63 (CCxHGM), 91 bis 95 (PYWDW) und 357 bis 364 (EMxW/FxRxR). Die beiden erstgenannten Bereiche, von denen angenommen wird, daß sie an der Aufrechterhaltung einer für die reversible Sauerstoffbindung notwendigen Konformation der Kupferatome beteiligt sind, sind in KLH2-c vollständig konserviert. In dem Bereich zwischen AS 357 und 364 wird dem Trp³⁶⁰-Rest eine wichtige Rolle in der Strukturstabilisierung zugeschrieben, die auf Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräften zu anderen konservierten Aminosäuren (Gly³⁵⁴, Glu³⁵⁷) zurückzuführen ist. Es ist auffällig, daß Gly³⁵⁴ sowohl bei KLH2-c (Gly→Asp) als auch bei OdH-c (Gly→Ser) substituiert sind, Trp³⁶⁰ jedoch nur bei KLH2-c gegen Phe ausgetauscht ist, welches damit an dieser Stelle den gleichen Aminosäurerest wie HpH β -d aufweist. Möglicherweise stehen jedoch auch die Seitenketten von Asp³⁵⁴, Ser³⁵⁴ und Phe³⁶⁰ in ähnlichen Wechselwirkungen wie die der durch sie ersetzten Aminosäuren. Die Sequenz von

KLH2-*c* enthält 7 Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken zwischen Resten Cys⁴⁷ und Cys⁵⁷, Cys¹⁷² und Cys²³⁹ sowie Cys³³⁰ und Cys³⁴² bilden sollten, wie sie auch bei OdH-*g* (Cephalopode) [20, 21] und HpHβ-*d* und -*g* [134] gefunden werden. Wie aus der Röntgenstruktur von OdH-*g* zu entnehmen ist, stabilisieren die beiden erstgenannten Disulfidbrücken die Zentralregion der FE, während die dritte in einer β-Faltblatt-Region lokalisiert ist. Es fällt auf, daß diese Disulfidbrücke in allen in Abb. 18 dargestellten Sequenzen vorhanden ist, außer bei OdH-*c* und OdH-*b*, bei denen die betreffenden Cysteinreste nicht vorhanden sind. Da bis jetzt allerdings nur die Struktur der FE "c" eines Cephalopoden (*Octopus*) und eines Gastropoden (*Megathura*) bekannt sind, läßt sich abschließend keine Aussage darüber treffen, ob diese Disulfidbrücke bei anderen Spezies ebenfalls fehlt oder nicht. Möglicherweise ist ihr Vorhandensein jedoch nur von untergeordneter Bedeutung für die Gesamtstabilität der jeweiligen Funktionellen Einheit. Der siebte Cysteinrest Cys⁵⁹ ist in allen Molluskenhämocyaninen streng konserviert. Die bei Gielens *et al.* [134] beschriebene Thioetherbrücke zu His⁶¹ wurde während der Sequenzierung festgestellt und ist durch die Röntgenstruktur von OdH-*g* bestätigt worden [21]. Die Disulfidbrücke zwischen Cys⁴⁷ und Cys⁵⁷ konnte aus dem ersten, unreduzierten Lys-C-Verdau nachgewiesen werden (Fragment LC 1.11), für die beiden anderen konnten keine adäquaten Fragmente gefunden werden.

Zwischen der für KLH2-*c* aus CD-Spektren ermittelten Sekundärstruktur (29% α-Helix und 31% β-Faltblatt) und der Kristallstruktur von OdH-*g* (34% α-Helix und 18% β-Faltblatt) besteht eine gute Übereinstimmung. Sekundärstrukturvorhersagen nach Chou und Fasman [135] sowie nach Garnier *et al.* [136] zeigen in beiden Funktionellen Einheiten eine vergleichbare Anzahl von übereinstimmenden sekundären Strukturelementen für die gleichen Positionen mit einem hochkonservierten Aminosäuremuster (Kap. 4.1.2.9, Abb. 31).

4.1.2.6 Homologie der Sequenz von KLH2-*c* zu anderen Funktionellen Einheiten von Molluskenhämocyaninen

Um die phylogenetische Verwandtschaft der Mollusken untereinander zu untermauern, wurde die Übereinstimmung der Sequenzen aller bis jetzt bekannten Funktionellen Einheiten berechnet und miteinander verglichen (Tabelle 11). Es wurden dabei nur streng homologe Aminosäuren berücksichtigt. Zwischen nicht äquivalenten FE bestehen im allgemeinen Übereinstimmungen zwischen 41% und 49%. KLH2-*c* fügt sich in diesen Bereich sehr gut ein. Mit der Sequenz der äquivalenten Funktionellen Einheit OdH-*c* besteht eine Übereinstimmung von 55%, die eine engere Verwandtschaft dieser FE bestätigt, obwohl beide Hämocyanine von Tieren aus unterschiedlichen

Familien stammen. Eine ähnlich hohe Übereinstimmung der Sequenzen von Gastropoden und Cephalopoden findet man beim Vergleich von HpH β -*d* und OdH-*d* (53%), von HpH β -*g* und OdH-*g* (53%) oder von HpH β -*g* und SoH-*h* (55%). Weiterhin stimmen SoH-*h* und OdH-*g* zu 70% überein. Die zuletzt angesprochene hohe Übereinstimmung nichtäquivalenter FE wird verständlich, wenn man beachtet, daß es sich bei diesen FE um die Kragendomänen der jeweiligen Hämocyaninproteine handelt und SoH-*h* dieselbe Position in der Polypeptidkette einnimmt wie die Funktionelle Einheit "g" in anderen Molluskenhämocyaninen [54]. Zum anderen kann die hohe Übereinstimmung von 70% damit erklärt werden, daß sowohl *Octopus* als auch *Sepia* derselben Familie (Cephalopoden) angehören. Zusammenfassend gesagt, zeigen bisher drei Gruppen von FE starke Übereinstimmung (FE-*c*, FE-*d*, FE-*g*) und es kann daraus geschlossen werden, daß FE, die korrespondierende Positionen innerhalb der Untereinheit einnehmen, vergleichbare Eigenschaften beim Aufbau der Quartärstruktur zugesprochen werden können.

Tabelle 11. Identität zwischen den Sequenzen von KLH2-*c* und den FE von anderen Molluskenhämocyaninen. RtH, *Rapana thomasiana* Hämocyanin; HpH, *Helix pomatia* Hämocyanin; OdH, *Octopus dofleini* Hämocyanin; SoH, *Sepia officinalis* Hämocyanin. *: Werte aus [20].

	OdH- <i>c</i>	RtH- <i>a</i>	OdH- <i>a</i>	OdH- <i>b</i>	OdH- <i>d</i>	OdH- <i>e</i>	OdH- <i>f</i>	OdH- <i>g</i>	SoH- <i>h</i>	HpH- <i>g</i>	HpH- <i>d</i>
KLH2- <i>c</i>	55	49	42	46	43	41	42	49	48	49	45
OdH- <i>c</i>	42	41*	44*	44*	42*	41*	42*	41*	42*	45*	44*
RtH- <i>a</i>	43	41	41	41	46	47	50	51	55	49	
OdH- <i>a</i>	43*	43*	41*	42*	42*	42*	43*	44*	42*		
OdH- <i>b</i>	43*	44*	43*	45*	45*	46*	44*				
OdH- <i>d</i>	44*	42*	43*	44*	47*	53*					
OdH- <i>e</i>	41*	40*	44*	45*	45*						
OdH- <i>f</i>	43*	45*	44*	43*							
OdH- <i>g</i>	70*	53*	42*								
SoH- <i>h</i>	55*	44*									
HpH- <i>g</i>	45*										

Als Konsequenz daraus ergibt sich, daß das Arrangement der 10 Untereinheiten innerhalb des Dekamers in Gastropoden und Cephalopoden möglicherweise eine größere Ähnlichkeit aufweist,

als man bei der Betrachtung der angesprochenen Unterschiede der Gesamtquartärstruktur auf den ersten Blick für möglich halten würde (siehe Kap. 2.1.2.2). In diesem Zusammenhang ist die Feststellung interessant und überraschend, daß die erste N-terminale FE eines Gastropoden, *Rapana thomasiana* [19, 137], mit der FE OdH-a nur zu 43% übereinstimmt, während sie mit den Kragendomänen SoH-h, OdH-g und HpH β -g Übereinstimmungen zwischen 50% und 55% aufweist. Die Antwort darauf, ob dies bedeutet, daß im Hämocyanin von *Rapana* eine Kopie der FE "g" den Platz der FE "a" eingenommen hat, muß zukünftigen Untersuchungen überlassen bleiben. Es gibt außerdem Hinweise, daß bei dem Cephalopoden *Sepia*, der im Gegensatz zu *Octopus* eine FE mehr besitzt, ebendiese FE den N-Terminus der Untereinheit des Atmungsproteins verlängert (Abb. 28).

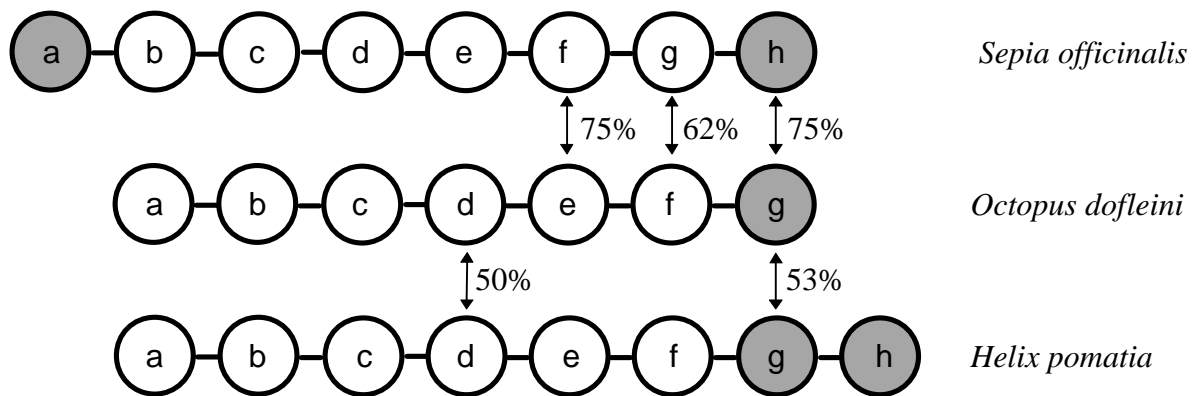


Abb. 29. Vergleich der Anordnung der Funktionellen Einheiten verschiedener Molluskenhämocyanine. Die grau unterlegten FE bilden den Kragen, homologe Funktionelle Einheiten sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet (in Anlehnung an [54]).

Dennoch wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, daß die Insertion einer FE zwischen den Funktionellen Einheiten "d" und "e" stattgefunden haben muß [54, 138, 139]. Dies wird auch durch die Tatsache bestärkt, daß eine weitgehende Übereinstimmung der bis jetzt bekannten Teile der Sequenzen von SoH-f mit OdH-e und SoH-g mit Odh-f besteht (die Werte wurden aufgrund der unvollständigen Sequenzen nicht in Tabelle 8 aufgenommen). Am Beispiel des Seeohrs *Haliotis tuberculata* wurde erneut ein Gastropodenhämocyanin mit einer weiteren FE gefunden, welche den C-Terminus verlängert (FE "h") aber keinerlei erkennbare Homologie zu bisher bekannten Domänen besitzt [75]. Dennoch wird durch den Vergleich der Sequenzen der verschiedenen FE die Hypothese unterstützt, daß es zur Divergenz der Molluskenhämocyanine nach der Entstehung der

Multidomänen gekommen sein muß, und es kann als gesichert gelten, daß nach der Trennung in jeder Molluskenklasse spezifische Ereignisse vonstatten gingen, bei denen Funktionelle Einheiten entweder hinzugefügt oder entfernt wurden. Im Hinblick auf eine derartige Variabilität ist die Tatsache, daß sich KLH2-*c* ganz klar als strukturelles Äquivalent zu OdH-*c* erwiesen hat von nicht zu unterschätzender Bedeutung für das höchste Ziel der Erforschung der Quartärstruktur von Molluskenhämocyaninen: die Art der Anlagerung der Untereinheiten innerhalb der Zylinderwand und des Kragens der Dekameren aufzuzeigen.

4.1.2.7 Bestimmung der Molekülmasse

Für die vollständige Aminosäuresequenz von KLH2-*c* wurde eine Masse von 48226 Da bestimmt, wobei angenommen wurde, daß von 6 Cysteinresten 3 Disulfidbrücken gebildet werden. Die Masse des nativen Proteins wurde mittels MALDI-MS bestimmt. Das Spektrum zeigt einfach (MH^+ 56126 Da) und doppelt (MH^{2+} 28177 Da) geladene Molekülionen, die einer Molekülmasse von 56126 ± 150 Da entsprechen (Abb. 29).

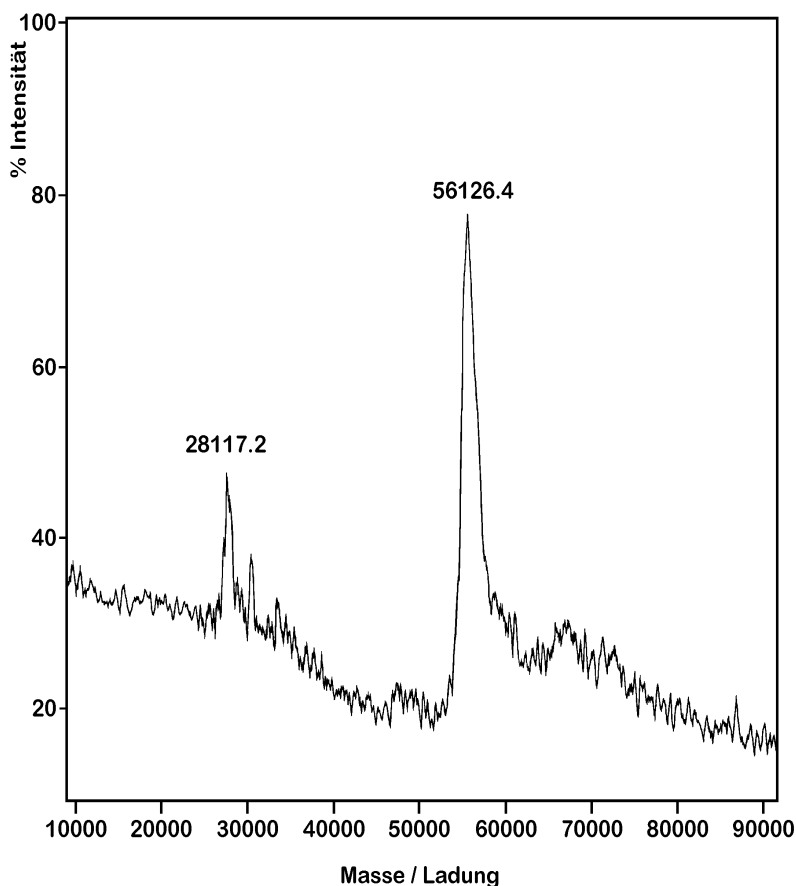


Abb. 30. MALDI-MS-Analyse von KLH2-*c*. Das Spektrum zeigt einfach (MH^+ : 56126 Da) und doppelt (MH^{2+} : 28117 Da) protonierte Molekülionen die mit einer Masse von 56126 ± 150 Da korrespondieren. 50 pmol Protein wurden in 0.1% (v/v) TFA gelöst und gegen Wasser dialysiert; Laserenergie: 3130; Anzahl der Scans: 250; Matrix: α -Cyano-4-hydroxymizsäure; externe Standards: Hühnereialbumin ($M_r = 44400$ Da), Rinderserumalbumin ($M_r = 66430$ Da).

Diese Molekülmasse steht in einer exzellenten Übereinstimmung mit dem bisher veröffentlichten Wert von 55 kDa, der aus einem SDS-PAGE-Experiment ermittelt wurde [122]. Die Differenz von 7900 Da (14.1%) zwischen dem direkt gemessenen Wert und der aus der Sequenz ermittelten Masse könnte der Masse der Kohlenhydratseitenketten von KLH2-*c* entsprechen. Da in der Aminosäuresequenz keine Asparagin-Bindungsstelle für eine *N*-glycosylierung (N_xS/T) gefunden wurde, muß für die Funktionelle Einheit KLH2-*c* eine *O*-Glykosylierung angenommen werden.

4.1.2.8 Kohlenhydratbestimmung

Gaschromatographisch konnten sowohl bei KLH2 als auch bei der anderen Untereinheit des KLH, KLH1, Mannose, Galaktose, *N*-Acetylgalaktosamin, *N*-Acetylglukosamin nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in KLH2 noch Fukose gefunden. Zur genauen Bestimmung der Kohlenhydratseitenketten wurden drei verschiedene Lektine eingesetzt: ConA, das spezifisch an α -Mannose, den Hauptbestandteil von *N*-gebundenen Kohlenhydraten, bindet; PNA, das an das Disaccharid Gal(β 1-3)-GalNAc, den Kernkomplex in *O*-gebundenen Kohlenhydraten, bindet, und ACA, das speziell das α -Anomer von Gal(β 1-3)-GalNAc bindet. Die Experimente wurden mit allen elektrophoretisch getrennten (SDS-PAGE) und anschließend geblotteten Funktionellen Einheiten von KLH2 durchgeführt. Durch ConA-Bindung wurden bei allen FE des KLH2, außer bei KLH2-*c*, *N*-glykosidische Kohlenhydrate nachgewiesen. KLH2-*c* reagierte als einziges Fragment mit PAN, nicht jedoch mit ACA, was darauf hindeutet, daß es sich bei dem Kernkomplex der *O*-gebundenen Kohlenhydratseitenkette um das β -Anomer von Gal(β 1-3)-GalNAc handelt. Auch KLH1 bzw. die Fragmente aus dem tryptischen Verdau reagierten mit ConA. KLH1-*c* reagierte aber weder mit PNA noch mit ACA, was darauf schließen läßt daß diese FE weder *N*- noch *O*-glykosyliert ist. Diese Feststellung stimmt auch mit der Tatsache überein, daß für KLH1-*c* über SDS-PAGE eine erheblich kleinere Molekularmasse (45 kDa) als für KLH2-*c* (55 kDa) gefunden wird [122, 140].

Wie schon in Kap. 4.1.2.7 erwähnt, wurde in der Primärstruktur der Funktionellen Einheit KLH2-*c* keine potentielle Verknüpfungsstelle (Asn-X-Ser/Thr) für *N*-Glykane gefunden. Dies ist insofern bemerkenswert, weil alle bisher aufgeklärten Primärstrukturen von Mollusken, mit Ausnahme von OdH-*c* und SoH-*g*, die jedoch unvollständig ist, solche Verknüpfungsstellen aufweisen: Bei den Positionen 27 (RtH2-*a*), 29 (HpH β -*g*), 52 (OdH-*g*, SoH-*h*), 53 (HpH β -*g*), 118 (OdH-*f*), 253 (OdH-*d*), 261 (RtH2-*a*, HpH β -*d*), 401 (OdH-*a*, OdH-*b*, OdH-*d*, OdH-*e*, HpH β -*d*, HpH β -*g*) (Abb. 27). Die meisten, wenn nicht alle dieser Verknüpfungsstellen sollten Kohlenhydratseitenketten

tragen, wie dies aus Untersuchungen verschiedenster Autoren [19, 78-81, 137, 141-145] zu schließen ist. Interessanterweise berichten Wood *et al.* [146], daß die FE "c" von *Helix pomatia* β_c überhaupt keine Kohlenhydratketten besitzt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente mit Lectinen lassen, mit Ausnahme von KLH1-*c* und KLH2-*c*, auf die Präsenz von *N*-gebundenen Zuckern bei allen FE von KLH1 und KLH2 schließen. Für KLH1-*c* konnte überhaupt kein Kohlenhydratgehalt festgestellt werden (wie dies auch bei HpH β -*c* beschrieben wurde) während KLH2-*c* *O*-glykosyliert ist, und zwar mit dem β -Anomeren des Gal(β 1-3)-GalNAc-Komplexes. Wirguin *et al.* [147] zeigten, daß die Immunisierung von Ratten mit einem kommerziell erhältlichen Präparat des nativen KLH die Produktion von Antikörpern induziert, die sowohl auf das α - als auch das β -Anomere des Gal(β 1-3)-GalNAc-Komplexes reagierten. Beide Anomere dieses Disaccharids sind als T-Antigene (Thomsen-Friedenreich-Antigene) bekannt, die auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen, einschließlich der Karzinomzellen der Harnblase, auftreten. Wirguin *et al.* schlossen hieraus, daß dies der Grund für die effiziente Immuntherapie von oberflächlichem Harnblasenkrebs mit KLH sein könnte (siehe auch [119]). Außerdem zeigten Wirguin *et al.*, daß die Immunisierung mit T β Antikörper produziert, die ebensogut die α - als auch die β -Konfiguration von Gal(β 1-3)-GalNAc binden, und sie fanden immunologische Hinweise darauf, daß KLH das β -Anomer und nicht das α -Anomer enthält. All dies steht in perfekter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen, nur war es sehr überraschend, daß dieses T-Antigen auf lediglich eine einzige von 16 funktionellen Einheiten des KLH beschränkt ist. Dies führt zu der Überzeugung, daß das T-Antigen nur eine von vielen Facetten der immunstimulierenden Wirkung des hochkomplexen Proteins KLH darstellt.

Über die biologische Rolle des *O*-gebundenen Glykosids in KLH2-*c* und der totalen Absenz von Kohlenhydraten in KLH1-*c* kann nur spekuliert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Tatsache beachtet werden, daß sich während einer länger andauernden Aquariumhaltung der Tiere die Konzentration von KLH1 in der Hämolymphe mit der Zeit verringert, während die von KLH2 unverändert bleibt [74, 131]. Es wurde angenommen, daß KLH1 in dieser Situation eine Nachschubquelle für Aminosäuren darstellt, während KLH2 weiterhin dem Sauerstofftransport dient, und daß mit dieser Rollenverteilung die Notwendigkeit von zwei unterschiedlichen Hämocyaninen im selben Tier erklärt werden kann. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das *O*-gebundene Glykosid in KLH2-*c* ein Merkmal sein könnte, das spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen der Mitteldarmdrüse in die Lage versetzt, zwischen den beiden

Isoformen des Hämocyanins zu unterscheiden. Anhand der Differenz von 7900 Da zwischen der gemessenen und der aus der Sequenz der Primärstruktur berechneten Molekularmasse kann für die Kohlenhydratseitenketten ein Anteil von 14.1% der Gesamtmasse des Polypeptids errechnet werden. Verglichen mit anderen FE von Mollusken paßt KLH2-*c* mit diesem Kohlenhydratanteil sehr gut in das bisher untersuchte Spektrum von Zuckergehalten, bewegt sich jedoch schon in Richtung des oberen Grenzbereiches. Wood *et al.* [146] fanden für die FE "g" von *Helix pomatia* β_c einen Kohlenhydratgehalt von über 17%, der dem höchsten Zuckergehalt von allen bisher untersuchten FE der Mollusken entspricht.

4.1.2.9 Bestimmung der Sekundärstruktur KLH2-*c*

Das CD-Spektrum von KLH2-*c* zeigt die für α -Helices typischen negativen Cottoneneffekte bei 208 nm und 222 nm [116]. Der im Vergleich zur Elliptizität bei 208 nm etwas positivere $[\Theta]$ -Wert der Elliptizität bei 222 nm verweist auf einen mindestens 40%igen Anteil an ungeordneter Struktur und wenigstens 18% β -Faltblattstruktur. Tatsächlich ergaben die nach der Methode von Yang *et al.* [148] durchgeführten Berechnungen für die native Funktionelle Einheit "c" von KLH2 einen Anteil an β -Faltblattstruktur von 31% und einen α -Helix-Anteil von 29% (Abb. 31, N). Nach der Behandlung mit β -Mercaptoethanol, d. h. der Reduktion der Disulfidbrücken wurde ein CD-Spektrum erhalten, welches auf eine starke Entfaltung der ursprünglichen Struktur hinweist. Wie der CD-Spektrenvergleich mit anderen Proteinen zeigt [116], werden insbesondere die β -Faltblattstruktursegmente zum größten Teil, wenn nicht sogar ganz entfaltet, während geringe Anteile der α -Helices erhalten bleiben. Diese Veränderung der Sekundärstruktur verweist darauf, daß Disulfidbrücken ganz offensichtlich einen großen Einfluß auf die Konformationsstabilität der Funktionellen Einheit KLH2-*c* haben (Abb. 31, R).

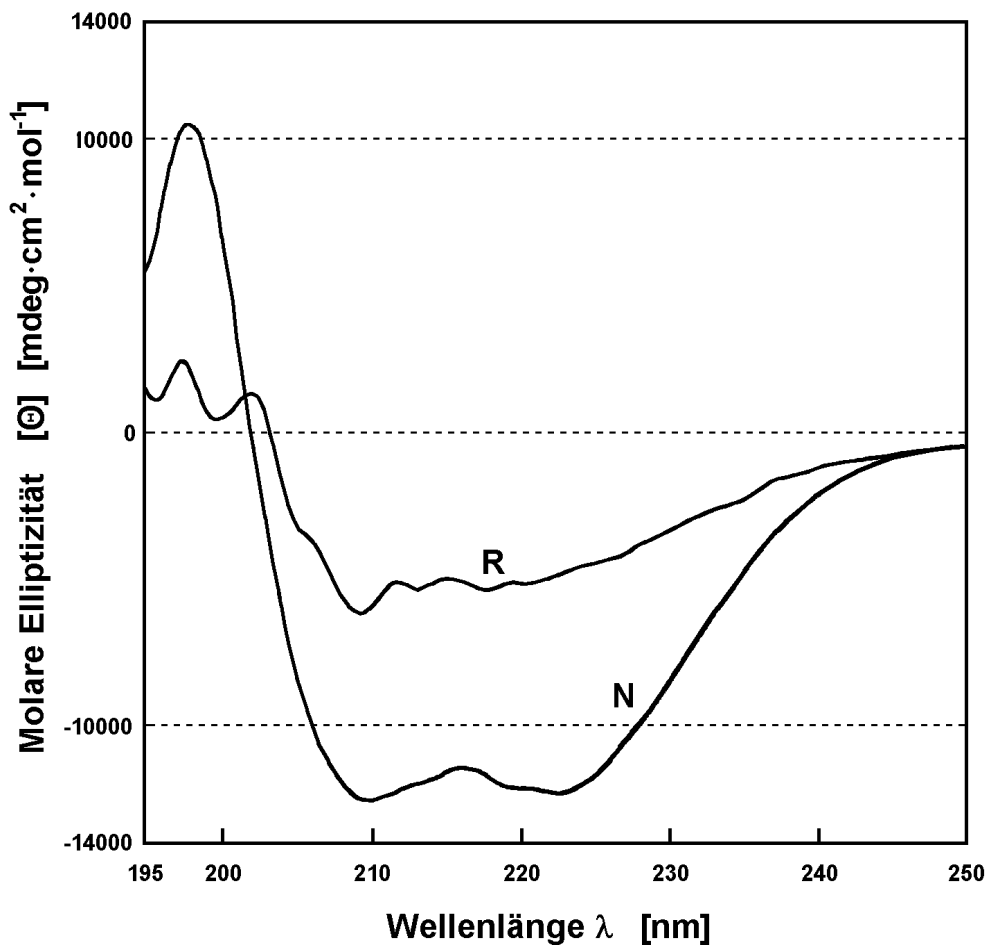


Abb. 31. Zirkulardichroismusspektren von KLH2-*c* in 10 mM Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 7.0) in einer Konzentration von ca. $0.22 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. N: natives, R: reduziertes KLH2-*c*. Das Verhältnis der unterschiedlichen Sekundärstrukturen wurde nach der Methode von Yang *et al.* [148] berechnet.

Die Strukturvorhersagen nach der Methode von Chou und Fasman zeigen eine höhere Übereinstimmung mit den Verhältnissen der Kristallstruktur von *Octopus* als die nach GOR gefundenen, doch gibt es auch bei CF einige grundlegende Abweichungen. Vor allem tritt des öfteren der Fall ein, daß die Röntgenstruktur eine α -Helixregion zeigt, die Strukturvorhersagen jedoch eine β -Faltblattstruktur errechnen. Dennoch ist die grundsätzliche Übereinstimmung der Sekundärstrukturen von OdH-*g* und KLH2-*c* ein weiterer Hinweis auf den sehr ähnlichen

strukturellen Aufbau der Molluskenhämocyanine, so daß die Kristallstruktur von OdH-g durchaus zum Vergleich mit KLH2-c herangezogen werden kann.

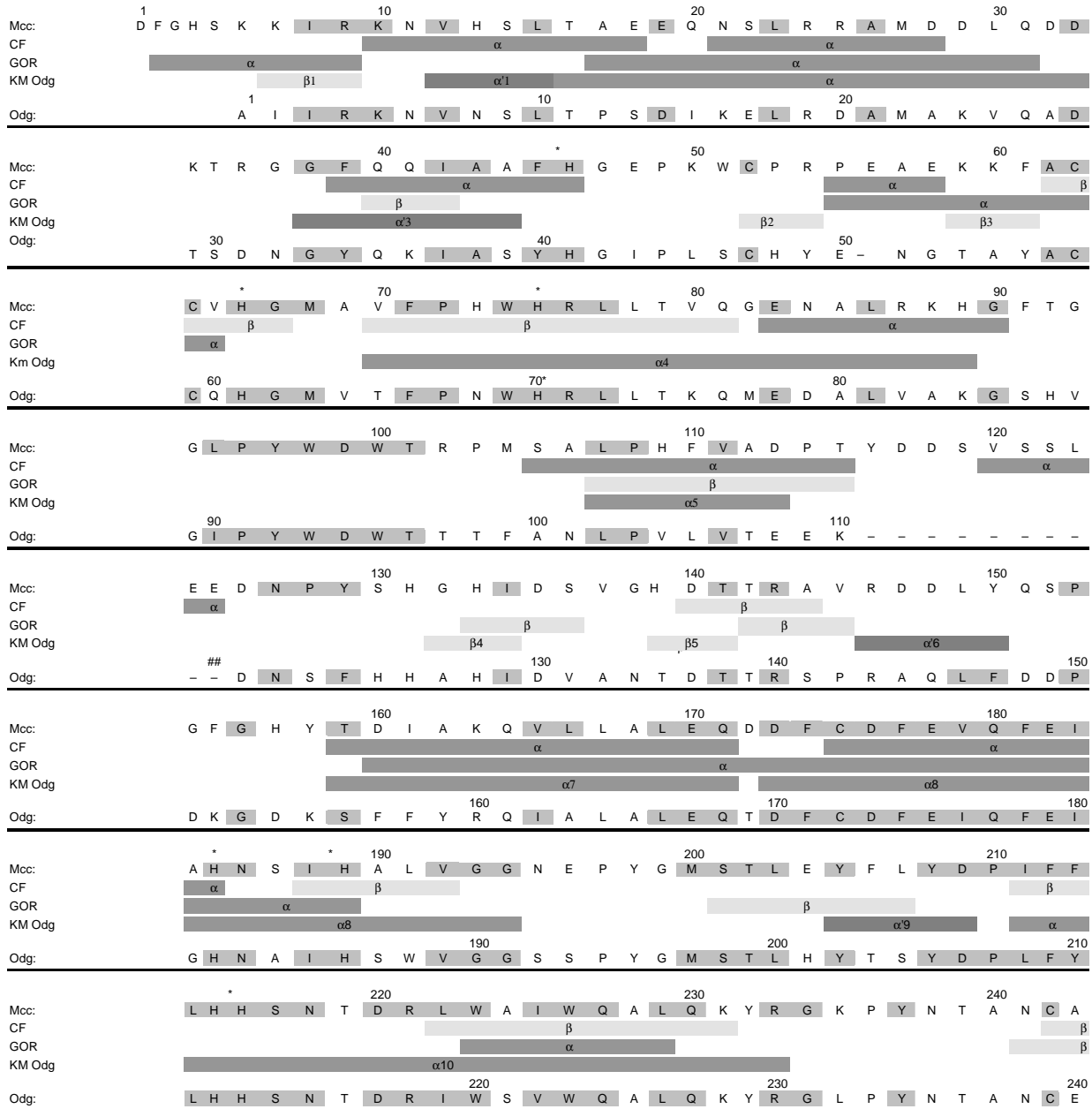


Abb. 32. Vergleichende Übersicht über Sekundärstrukturvorhersagen für KLH2-c (McH-c) nach Chou-Fasman (CF) und Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR) und für die Sekundärstruktur von OdH-g nach Karen Miller (KM Odg) [21]

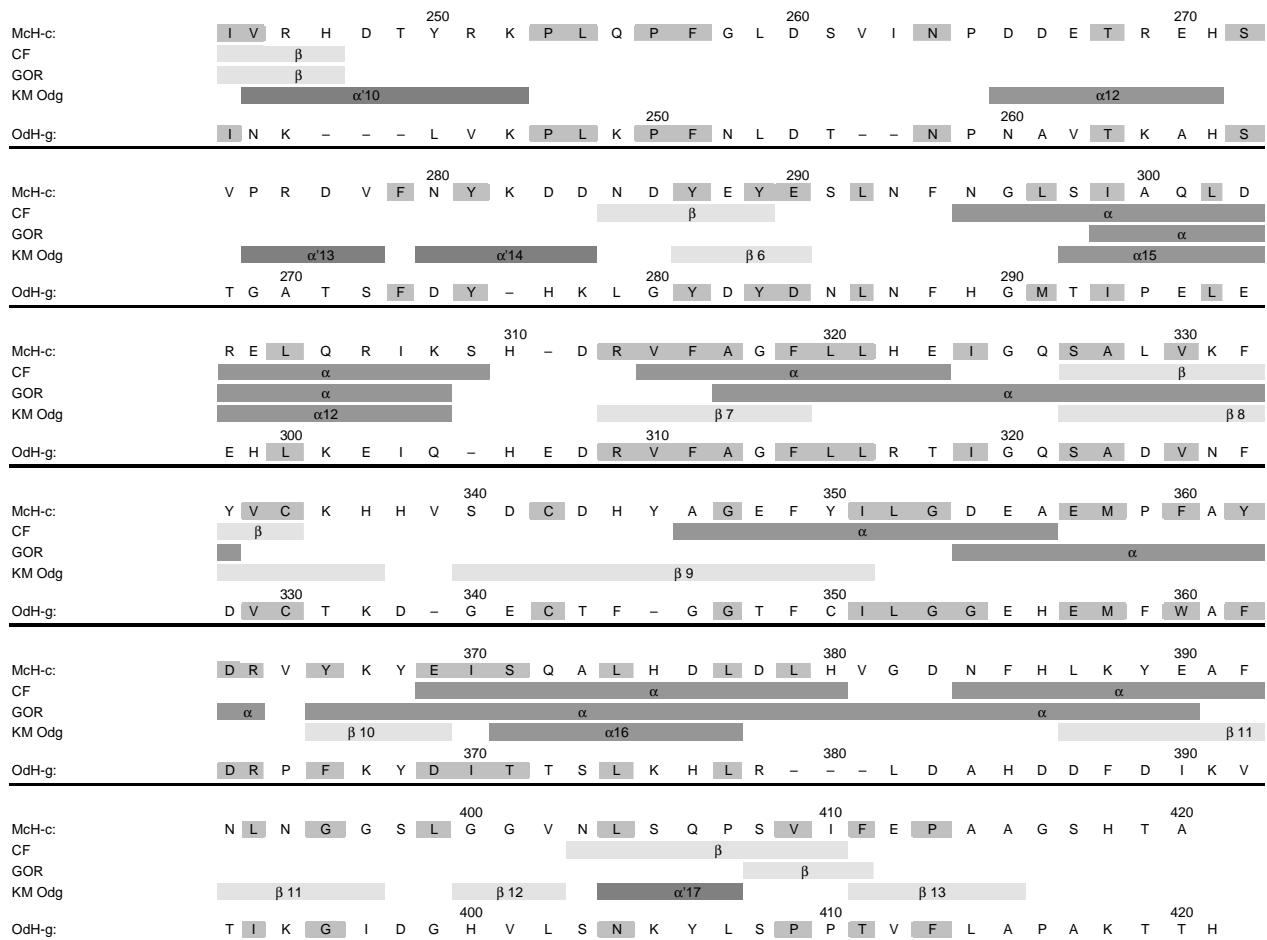


Abb. 32. Fortsetzung

4.1.2.10 Bestimmung der Konformationsstabilität von KLH2-c unter dem Einfluß der Temperatur

Die Stabilität der Tertiärstruktur der funktionellen Einheit KLH2-c wurde ebenfalls anhand von Untersuchungen des Zirkulardichroismus bestimmt. KLH2-c in einer Konzentration von $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ wurde schrittweise von 20°C auf 95°C erhitzt. Die CD-Spektren wurden im Bereich von 195 bis 260 nm aufgezeichnet, in welchem die für Proteine typischen Cotton-Effekte auftreten. Die Werte der Elliptizität bei 222 nm wurden gegen die Temperatur aufgetragen und ergaben die in Abb. 33 abgebildete sigmoidale Kurve. Aus dem Wendepunkt wurde die Entfaltungstemperatur von KLH2-c mit 52°C bestimmt (Tabelle 12). Diese Temperatur ist damit der Entfaltungstemperatur der Strukturellen Untereinheit KLH2 (54°C) sehr ähnlich.

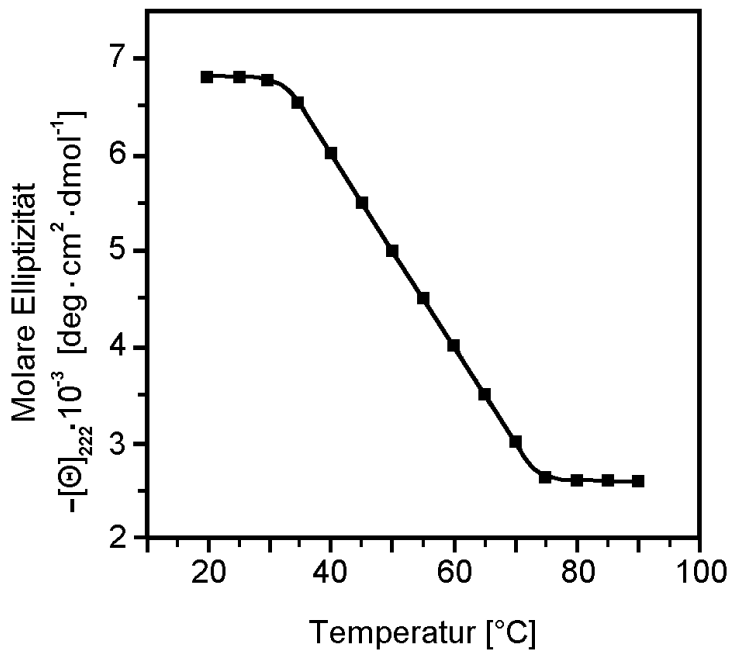


Abb. 33. Die Temperaturabhängigkeit der Elliptizität bei 222 nm der Funktionellen Untereinheit KLH2-c. Probenkonzentration: 0.15 mg·mL⁻¹; Puffer: 0.05 M Tris·HCl, 10 mM CaCl₂ (pH 8.2); vor der Messung wurde die Probe jeweils 10 min bei der eingestellten Temperatur equilibriert.

4.1.2.11 Fluoreszenzlöschung mit Cäsiumchlorid

Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 295 nm wurde im Spektrum der oxy-Form von KLH2-c ein Maximum bei 329±1 nm festgestellt, das sich bei der apo-Form leicht nach 331±1 nm verschob. Eine Emission in diesem Bereich ist typisch für Tryptophylseitenketten im inneren Bereich eines Proteins [125]. Um Aufschluß über die Position der Tyrosyl- und Tryptophanseitenketten zu erhalten, wurde die Fluoreszenzlöschung mit Cäsiumchlorid untersucht. Mit CsCl können im an der Oberfläche von Proteinen positionierte Tryptophanreste detektiert werden. Die Fluoreszenzlöschung wurden in 50 mM Tris·HCl-Puffer (pH 8) mit 10 mM CaCl₂ und verschiedenen Konzentrationen an Cäsiumchlorid durchgeführt. Der aus den Ergebnissen der Experimente erstellte Stern-Volmer-Plot (Abb. 34) ergab eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der CsCl-Konzentration. Die Stern-Vollmer-Konstante wurde mit einem Wert von $K_{SV}^+ = 0.65$ für KLH2-c berechnet. Dieser Wert ist somit etwas höher als der für die SU KLH2 gefundene ($K_{SV}^+ = 0.50$), jedoch niedriger als die Werte für die SU KLH1 ($K_{SV}^+ = 0.71$) und das Gesamthämocyanin ($K_{SV}^+ = 0.88$). Da diese Werte, verglichen mit dem Wert des freien N-Acetyltryptophanamids, sehr niedrig sind, bedeutet dies, daß auch in der FE die Tryptophanreste weniger an der Oberfläche sondern in inneren Bereichen des Proteins in einer hydrophoben Umgebung positioniert sind. Die

Quantenausbeute Q der oxy-Form hatte einen Wert von 0.026, die Quantenausbeute der apo-Form betrug 0.045. Beide Werte waren damit etwa halb so groß wie die entsprechenden Werte der SU KLH2 ($Q_{\text{oxy}} = 0.060$, $Q_{\text{apo}} = 0.074$). Dies läßt den Schluß zu, daß die Effekte im Gesamtprotein kumulieren.

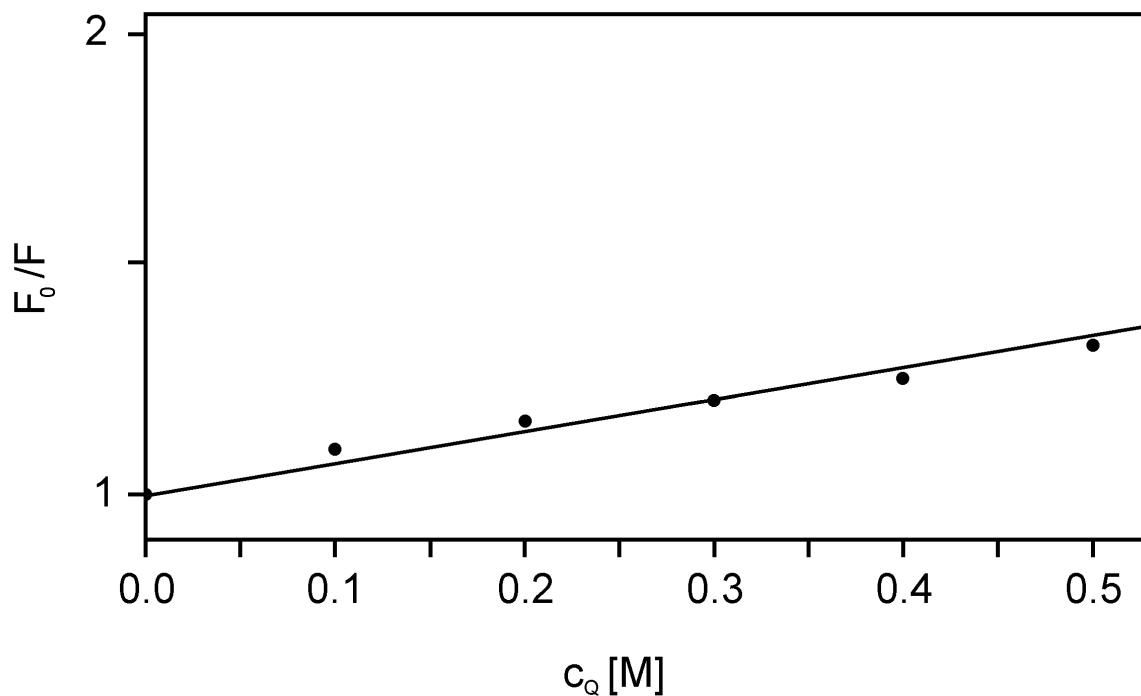


Abb. 34. Stern-Vollmer-Plot der Fluoreszenzlöschung mit Cäsiumchlorid von KLH2-c. Proteinkonzentration: $0.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris-HCL (pH 8), 10 mM CaCl_2 . Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurde N-Ac-Trp-NH₂ als Standard verwendet.

4.1.2.12 Bestimmung der Tryptophylfluoreszenz in Abhängigkeit der Temperatur

Durch Messungen der Fluoreszenz unter dem Einfluß verschiedener Temperaturen wurden für KLH2-c die Aktivierungsenergie E_a der temperaturabhängigen Deaktivierung von angeregten Fluorophoren, sowie die Temperaturabhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz untersucht. Aus dem Arrhenis-Plot (Abb. 35) wurde für KLH2-c eine Aktivierungsenergie von $6.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabelle 12). Die kritische Übergangstemperatur T_c wurde aus der Änderung der Steigung des Arrhenius-Plots mit 61°C bestimmt (Tabelle 12).

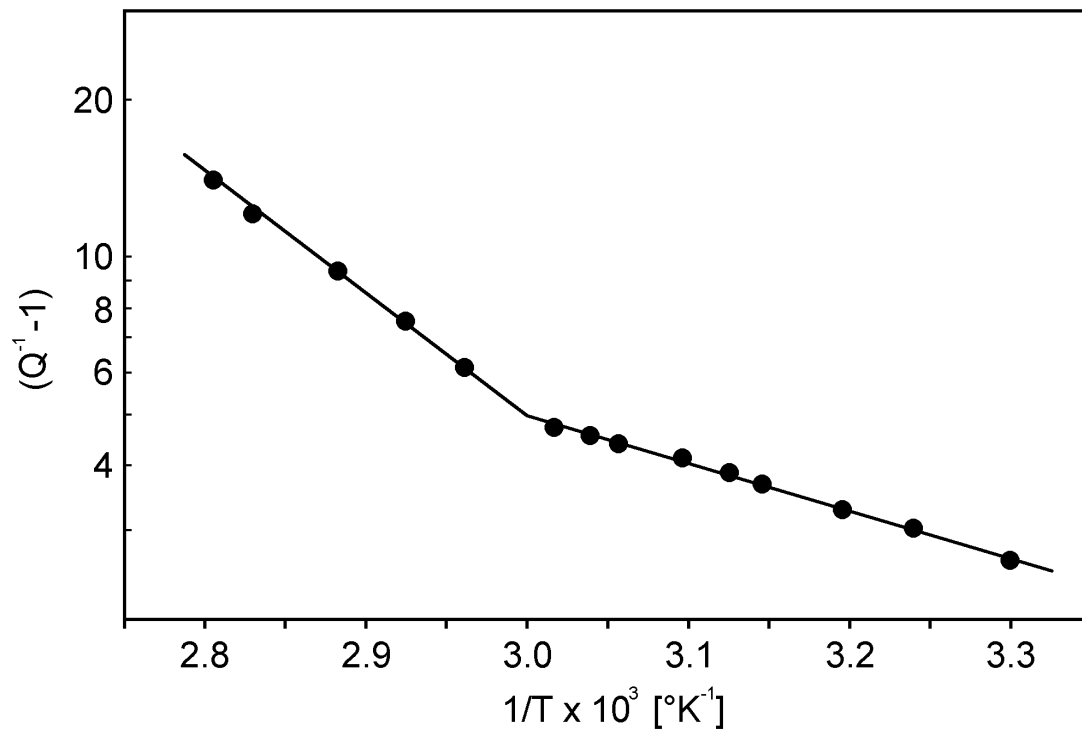


Abb. 35. Arrhenius-Plot der Temperaturabhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz von KLH2-c. Proteinkonzentration: 0.15 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl (pH 8), 10 mM CaCl₂; Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute wurde N-Ac-Trp-NH₂ als Standard verwendet.

Tabelle 12. Physikalisch-chemische Daten der Funktionellen Einheit KLH2-c.

Parameter	KLH2-c oxy-	KLH2-c apo-
E_a [kJ·mol ⁻¹]		6.5
Emission λ [nm]; Anregung bei 295 nm	328	329
Fluoreszenzquantenausbeute	0.026	0.045
Tyr-Trp-Energietransfer e [%]		43
Fluoreszenz T_c [°C]		65
Zirkulardichroismus T_m [°C]		57
CsCl-Löschung K_{SV}^+ [M ⁻¹]		0.65

4.1.2.13 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung

Wie schon zuvor beim nativen Hämocyanin und bei den Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 konnte auch bei der Funktionellen Einheit KLH2-c keine Tyrosylfluoreszenz beobachtet werden. Als Erklärung kann wiederum der strahlungslose Energieübergang zwischen benachbarten Tyrosin- und Tryptophanseitenketten herangezogen werden. Die effektive Energieübertragung wurde mit Gleichung 11 (Kap. 5.2.13) berechnet und ist in Abb. 36 graphisch dargestellt. Die beste Übereinstimmung zwischen den experimentell gefundenen Daten und den theoretischen Kurven wurde mit $e = 0.43$ gefunden, was bedeutet, daß 43% des von Tyrosinseitengruppen absorbierten Lichtes auf Indolgruppen übertragen und als Tryptophylfluoreszenz emittiert werden.

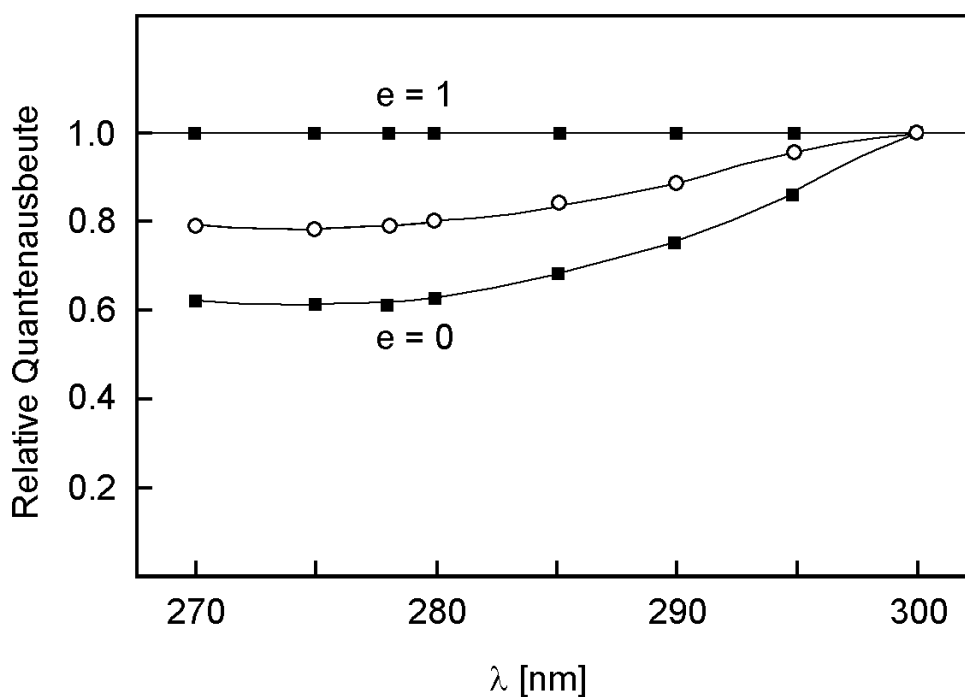


Abb. 36. Effektive Tyrosyl-Tryptophyl-Energieübertragung der apo-Form von KLH2-c (◆-◆). Die Kurven (■-■) repräsentieren die Werte für $e = 0$ und $e = 1$.

4.2 Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Struktur des Hämocyanins von *Homarus americanus*

4.2.1 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten von *Homarus americanus*

In der Hämolymphe von *Homarus americanus* liegen gewöhnlich 24S-Dimere (2×6 -mere) vor die zu 37S-Tetrameren (4×6 -mere) aggregieren können (Abb. 37). Diese 4×6 -mere wurden unter milden Bedingungen in Dimere zerlegt. SDS-PAGE (10%) mit nativer Hämolymphe ergab 6 Haupt- und zwei Nebenbanden mit einer durchschnittlichen Masse von 65 kDa bis 75 kDa, was in Übereinstimmung mit früher veröffentlichten Ergebnissen steht [149, 150]. Um eine Reassoziaton zu unterbinden, wurde die Dissoziation unter Zugabe von 2 M Harnstoff durchgeführt, wobei nur 10% der Dodekamere undissoziiert blieben. Das dissoziierte Hämocyanin wurde via FPLC über eine MonoQ HR 10/10-Säule getrennt, wobei 6 Hauptfraktionen in ausreichenden Mengen erhalten wurden (Abb. 38), die mit HaH-1 bis HaH-6 bezeichnet wurden. In der Startfraktion wurden die undissoziierten Bestandteile der Lösung eluiert.

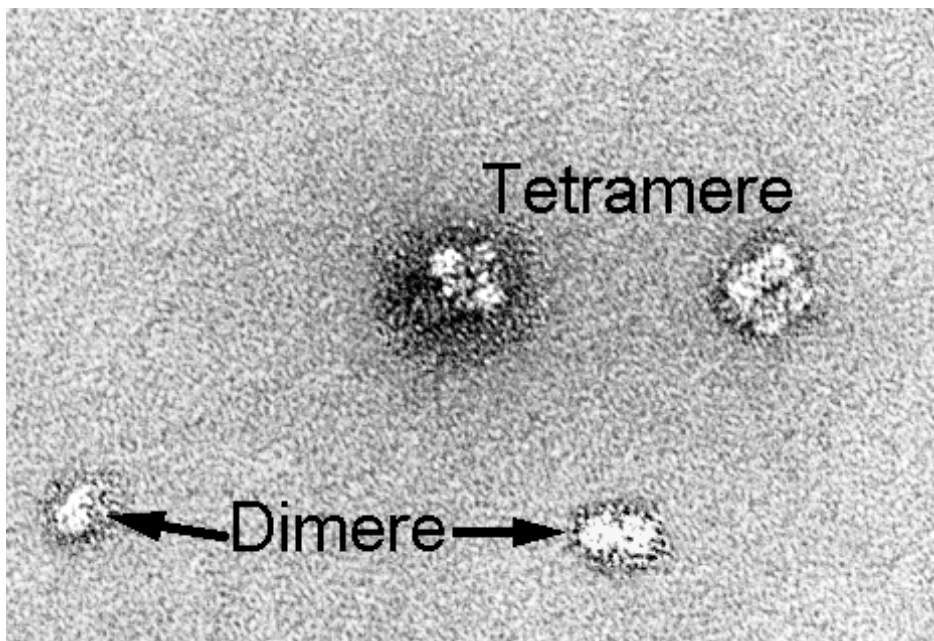


Abb. 37. Elektronenmikroskopaufnahme des Hämocyanins von *Homarus americanus* aus der Dissoziationsphase. Zu sehen sind 4×6 -mere und 2×6 -mere Formen des Hämocyanins. Konzentration des Proteins: $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) mit 10 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 ; Kontrastmittel: 1% Uranylacetatlösung. Vergrößerung: 260 000.

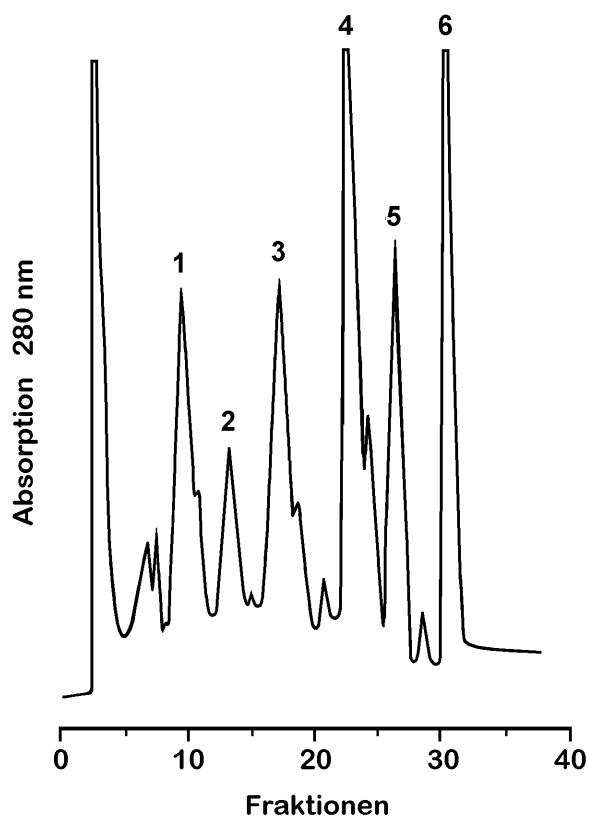


Abb. 38. FPL-Chromatogramm der dissoziierten Untereinheiten. Bedingungen: Säule: MonoQ HR 10/10; Elutionsmittel: Puffer: 0.1 M NaHCO_3 mit 20 mM EDTA und 2 M Harnstoff, pH 10.0; Gradient: linear 0 - 1 M NaCl; Fließgeschwindigkeit: $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Injizierte Menge: $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Detektion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$; Die Indizes 1 bis 6 bezeichnen die den 6 Funktionellen Untereinheiten HaH-1 bis HaH-6 des Hämocyanins von *H. americanus* zugeordneten Fraktionen.

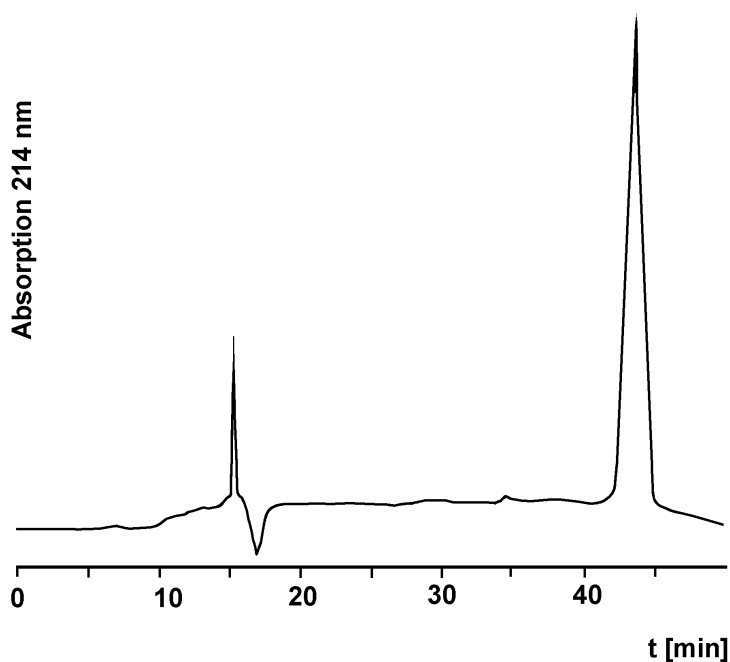


Abb. 39. HPL-Chromatogramm der FPL-Fraktion HaH-1. Bedingungen: Säule: Nucleosil 7 C_{18} ; Elutionsmittel: Puffer A: 0.16% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA, 80% CH_3CN in Wasser; Gradient: 10 min 10% Puffer B, 10% - 100% Puffer B in 70 min; Fließgeschwindigkeit: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Injizierte Menge: $0.45 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Detektion bei $\lambda = 214 \text{ nm}$.

4.2.2 N-terminale Sequenzen der Untereinheiten

Die einzelnen Fraktionen wurden durch HPLC weiter aufgereinigt (Abb. 39) und dann N-terminal ansequenziert. In Abb. 40 sind die N-Termini der Untereinheiten von *Homarus americanus* denen von *Astacus leptodactylus* (AIH-b [151]), *Cherax destructor* (CdH-M1, CdH-M3' [152]), *Panulirus interruptus* (PiH-a, PiH-b, PiH-c [11, 152, 153]), *Panulirus japonicus* (PjH-Ia, PjH-Ib, PjH-II, PjH-III [154]) und *Cancer magister* (CmagH-6 [155]) vergleichend gegenübergestellt. Um die Homologien etwas deutlicher werden zu lassen, wurden vor allem in den ersten 12 Positionen einige Deletionen eingefügt. Die Untereinheiten von *Homarus americanus* zeigen sowohl untereinander als auch mit den Hämocyaninen der anderen Spezies eine große Homologie.

		1		5		10		15		20		25		30																												
HaH-1				G	T	T	V	V	A	H	K	-	Q	Q	S	V	N	R	L	L	Y	K	V	T	S	H	I	P	D	T	F	F	S	L	K							
HaH-2				G	-	A	D	V	A	H	K	-	Q	Q	S	V	N	H	L	L	Y	L	V	T	S	H	Y	P	S	L	D	Y	S	L	L							
HaH-3	G	V	P	S	V	S	T	V	N	V	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	F	L	L	F	K	V	Y	I															
HaH-4				G	A	Y	G	-	Q	G	Q	N	I	G	-	Q	L	F	V	N	I	L	I	F	L	F	Y															
HaH-5				G	A	-	E	A	L	N	A	-	K	R	Q	Q	D	V	N	H	L	L	D	L	I	Y	D	H	L	H	Y											
HaH-6					S	P	A	F	Q	A	Q	K	-	Q	A	K	V	N	D	V	L	D	K	L	Y																	
AIH-b				D	A	S	G	-	A	T	L	A	-	K	R	Q	Q	V	N	H	L	L	E	H	I	Y	D	H	T	H	F	T	D	-	-	L	K	N	I	A		
CpH-4									A	D	L	A	H	-	R	Q	Q	S	V	N	R	L	L	Y	K	I	Y	S	P	I	S	S	A	Y	A	E	L	K	Q	S		
CmagH-6				T	A	-	G	G	A	F	D	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	S	A	L	W	K	V	Y	E	D	I	Q	D	P	H	L	I	Q	L	S	Q		
CdH-M1				D	G	S	G	G	A	V	S	D	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	Y	L	L	F	K	V	Y	E	D	V	N	D	E	N	S	P					
CdH-M3'				G	V	G	D	V	H	D	E	Q	K	Q	Q	H	D	I	N	F	L	L	F	K	V	Y	E	V	L	X	D	I	X	-	-	L	K	X	V	A		
PiH-a				D	A	L	G	T	-	G	N	A	Q	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K	I	Y	E	P	T	K	Y	P	D	-	-	L	K	E	I	A	
PiH-b				D	A	L	G	T	-	G	N	A	N	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K	I	Y	E	P	T	K	Y	P	D	-	-	L	K	E	I	A	
PiH-c	A	D	C	Q	A	G																																				
PjH-Ia	A	D	X	Q	P	G																																				
PjH-Ib				D	S	V	G	S	-	T	T	A	Q	K	-	Q	N	N	I	N	H	L	L	D	K																	
PjH-II				D	V	V	A	S	-	S	T	A	H	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K																	
PjH-III				D	A	H	G	S	-	G	N	A	H	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D																		

Abb. 40. Vergleich der N-terminalen Sequenzen von *Homarus americanus* (HaH-1 bis HaH-6) mit denen von *Astacus leptodactylus* (AIH-b [151]), *Cherax destructor* (CdH-M1, CdH-M3' [152]), *Cancer pagurus* (CpH-4 [152]), *Panulirus interruptus* (PiH-a, PiH-b, PiH-c [11, 152, 153]), *Panulirus japonicus* (PjH-Ia, PjH-Ib, PjH-II, PjH-III [154]) und *Cancer magister* (CmagH-6 [155]). Streng konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt und eingerahmt, isofunktionelle Aminosäuren sind grau unterlegt, Aminosäuren die nicht in allen Sequenzen vorhanden sind, aber signifikant auftreten, sind eingerahmt.

Streng konserviert sind die Aminosäuren in Position 11 (Lys, mit Ausnahme von HaH-4), 12 (Gln) und 16 (Asn). Die Positionen 4 (Gly), 9 (Ala), 15 (Val), 18 (Leu), 19 (Leu) und 23 (Tyr) sind

weitgehend konserviert, doch treten hier bei den Untereinheiten verschiedener Spezies Substitutionen mit strukturell ähnlichen Aminosäuren oder aber komplette Austausch auf. Mit Ausnahme von HaH-6 wurde in allen Untereinheiten von *Homarus* Gly als N-terminale Aminosäure gefunden. HaH-2 und HaH-5 zeigen beide ein N-terminales Motiv G_AxxA, das in HaH-5 als AxxAxxA verdoppelt auftritt. Ein ähnliches Motiv AxxAxxA findet sich bei AlH-*b*. Bei HaH-4 fand in Position 11 ein Austausch statt, und bei HaH-5 die Insertion eines Arg zwischen AS 11 und AS 12. Vergleichbare Insertionen finden sich auch in den Sequenzen AlH-*b* und CdH-*M3'*. Der N-terminale Aminosäurerest von HaH-6 ist ein Ser und ab Position 3 zeigt diese Strukturelle Untereinheit ebenfalls das Muster AxxA. Von allen Untereinheiten weist HaH-4 im N-Terminus die geringsten Homologien zu den anderen SU auf. Als ein Merkmal dieser geringen Übereinstimmung fällt besonders die Substitution des sonst in allen SU konservierten Lys-Restes in Position 11 durch ein Glycin auf.

Tabelle 13. Homologievergleich der N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten von *Homarus americanus* mit den Sequenzen von *Cherax destructor*, *Astacus leptodactylus* (Astacidea) *Palinurus interruptus*, *Palinurus japonicus* (Palinura), *Cancer pagurus* und *Carcinus maenas* (Brachyura); Angaben in Prozent. Homologien von über 50% sind fett gedruckt.

	HaH-1	HaH-2	HaH-3	HaH-4	HaH-5	HaH-6
CdH- <i>M1</i>	37	34	62	36	46	52
CdH- <i>M3'</i>	34	25	60	38	38	30
CmagH-6	35	33	52	28	44	50
CpH-4	57	50	44	29	47	44
AlH- <i>b</i>	48	48	38	30	65	42
PiH- <i>a</i>	42	65	47	28	64	47
PiH- <i>b</i>	40	50	43	33	64	42
PiH- <i>c</i>	42	37	50	25	36	42
PjH- <i>Ia</i>	36	25	42	15	38	45
PjH- <i>II</i>	52	50	45	15	55	41
PjH- <i>III</i>	52	62	36	33	70	37

Die in den ersten Positionen größte Homologie untereinander weisen mit über 66% HaH-1 und HaH-2 auf, woraus auf eine sehr enge Verwandtschaft dieser beiden Untereinheiten geschlossen werden könnte. Ein Vergleich von HaH-2 und HaH-5 legt gewisse Beziehung zwischen diesen beiden SU nahe, die mit einer Homologie von 54% jedoch nicht ganz so groß ist wie die zwischen HaH-1 und HaH-2. HaH-6 weist einige Übereinstimmungen mit HaH-5 auf (40%), kann aber zusammen mit HaH-3 einer Gruppe von Untereinheiten zugeordnet werden, die sich von den SU HaH-1, HaH-2 und HaH-5 unterscheiden. Um darüber endgültige und genauere Aussagen treffen zu können, müßten die vollständigen Sequenzen aller sechs SU vorliegen. Die größten Homologien weist HaH-1 zur Untereinheit CpH-4 von *Cancer pagurus* (57%), zur Untereinheit AIH-b von *Astacus leptodactylus* (48%) und zu den SU von *Palinurus japonicus* PjH-II und PjH-III (jeweils 52%) auf. HaH-5 ist mit AIH-b zu 65%, sowie mit PiH-a und PiH-b zu jeweils 64% homolog. Große Homologien weist HaH-5 auch mit den SU von *Panulirus japonicus* auf (PjH-I: 50%, PjH-II: 55%, PjH-III: 70%). HaH-6 und CdH-M1 weisen eine Übereinstimmung von 52% auf. Hierbei fällt auch auf, daß HaH-2 große Ähnlichkeiten mit den Untereinheiten der verschiedenen Spezies von *Panulirus* zeigt (PiH-a: 65%, PjH-Ib: 50%, PjH-II: 56%, PjH-III: 62%). Folgt man den Aussagen von Stoeva *et al.* [156], gehören die Untereinheiten HaH-1, HaH-2 und HaH-4 zum sogenannten β -Typ, die Untereinheiten HaH-5 und HaH-6 zum α -Typ und HaH-3 zum α/γ -Typ.

4.2.3 Untersuchungen mit Zirkulardichroismus

4.2.3.1 Bestimmung der Konformationsstabilität des *Homarus americanus*-Hämocyanins und der Strukturellen Untereinheiten unter dem Einfluß von pH-Wert, Temperatur und verschiedenen Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid

Die Abhängigkeit des Konformationsverlustes von der Temperatur wurde mittels Zirkulardichroismus untersucht. Im Bereich zwischen 200 nm und 250 nm kann an der Änderung der für die Sekundärstruktur eines Proteins typischen Cottoneffekt die Veränderung der Konformation des Polypeptids verfolgt werden. Die Messungen des nativen Hämocyanins und der Strukturellen Untereinheiten ergaben, daß alle untersuchten Proteine in einem breiten Bereich zwischen pH 5 und pH 9 stabil sind. Denaturierungen treten jedoch sowohl im Sauren (pH 2 bis pH 4.5) als auch im Alkalischen (pH > 9) auf. Als Beispiel zeigt Abb. 33 die pH-Abhängigkeit der Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm der Funktionellen Untereinheit HaH-4.

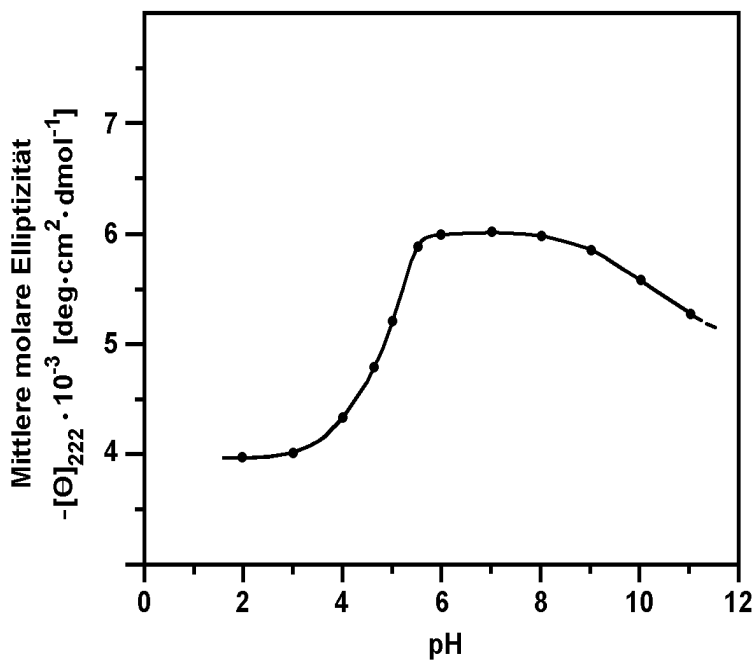


Abb. 41. pH-Abhängigkeit der Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm der apo-Form der Strukturellen Untereinheit HaH-4 von *Homarus americanus* (ca. 0.2 mg·mL⁻¹); Puffer: 50 mM Tris·HCl; pH-Werte: 2 - 11 (mit HCl und NaOH eingestellt); Inkubationszeit: 24 h; zur Kalibrierung der Ordinate wurden 75 kDa als durchschnittliche Molekülmasse für eine Strukturelle Untereinheit angenommen.

Die Untersuchungen zur Konformationsstabilität gegenüber der Temperatur ergaben sowohl für das native Hämocyanin als auch für die einzelnen Untereinheiten sehr hohe Werte. Das native Hc war bis 80°C stabil, während die Untereinheiten bei Temperaturen zwischen 53°C (HaH-4) und 73°C (HaH-5) denaturierten. Die hohe Stabilität des nativen Hämocyanins kann durch stabilisierende Effekte der Aggregation der Strukturellen Untereinheiten erklärt werden. Die Werte sind in Tabelle 14 zusammengefaßt und denen aus den Fluoreszenzmessungen gegenüber gestellt.

4.2.3.2 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$ des Hämocyanins von *Homarus americanus*- und seiner Strukturellen Untereinheiten

Die Entfaltung der Proteinaggregate unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid wurde ebenfalls anhand der Änderung des Wertes der Elliptizität bei 222 nm verfolgt. Dabei stellte sich heraus, daß die Stabilität des Hämocyanin und seiner Untereinheiten sich auf einen Konzentrationsbereich von 0.5 M bis höchstens 3 M Gdn-HCl erstreckt. Ab einer Konzentration von 3.0 M Gdn-HCl kommt es zu einer starken Abnahme der Elliptizität.

Tabelle 14. Die Freie Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$, die Aktivierungsenergie E_a , und die Denaturierungstemperaturen T_c und T_m des Hämocyanins von *Homarus americanus* und seiner Strukturellen Untereinheiten.

Protein	$\Delta G_D^{H_2O}$ [kcal·mol ⁻¹]	E_a [kJ·mol ⁻¹]	Fluoreszenz T_c [°C]	CD T_m [°C]
Natives Hc	13.5	50.50	87	80
HaH-1	8.4	8.20	65	61
HaH-2	5.5	8.35	62	64
HaH-3	6.0	8.15	67	69
HaH-4	3.3	7.20	49	53
HaH-5	10.8	10.15	71	73
HaH-6	8.4	9.60	53	56

Die Übergänge der Konformation aus der geordneten in die ungeordnete Form fanden für die oxy-Formen bei 2.0 - 2.5 M Gdn·HCl und für die apo-Formen bei 1.5 - 2.0 M statt. Obwohl der Konzentrationsunterschied der Übergänge nur 0.5 M Gdn·HCl ausmacht, scheint doch der Kupfer-Peroxid-Komplex im Aktiven Zentrum der Strukturellen Untereinheiten einen gewissen stabilisierenden Effekt auszuüben.

In Abb. 42a ist am Beispiel der apo-Form der SU HaH-5 die Änderung der Elliptizität bei 222 nm sowie die Änderung der freien Stabilisierungsenergie in Abhängigkeit von der Gdn·HCl-Konzentration dargestellt. Bei einer Konzentration von 5 M Gdn·HCl fand eine nahezu völlige Denaturierung der apo-Formen, bei 6 M Gdn·HCl die der oxy-Formen statt. Abb. 42b zeigt typische CD-Spektren für eine native und für eine 24 h lang mit 6 M Gdn·HCl behandelte Strukturelle Untereinheit (HaH-5) von *Homarus americanus*.

Ein weiterer Parameter, der aus den CD-Experimenten berechnet werden kann, ist die Freie Energie der Stabilisierung in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$. Mit ihr wird die Änderung der Freien Energie beschrieben, die durch die Überführung der nativen in die ungeordnete Struktur freigesetzt wird.

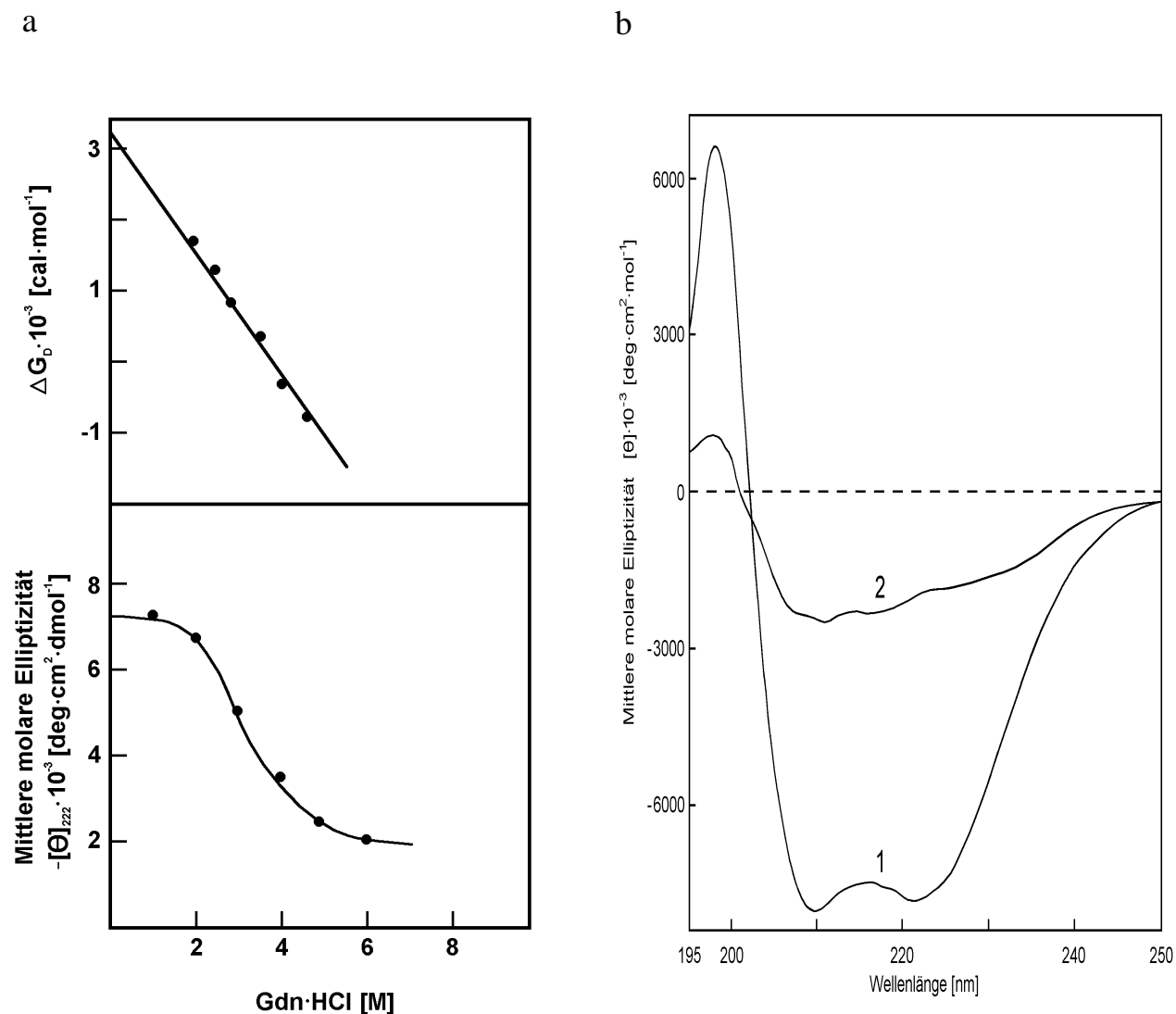


Abb. 42. a) Die Änderung der Freien Energie ΔG_D (oben) und der Elliptizität bei 222 nm (unten) als Funktion unterschiedlicher Gdn·HCl-Konzentrationen am Beispiel der SU HaH-5 von *H. americanus*. b) Die CD-Spektren der nativen Form von HaH-5 (1) und nach 24-stündiger Inkubation mit 6 M Gdn·HCl derselben SU (2) ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein in 50 mM Tris·HCl, pH 8.0). Zur Kalibrierung der Ordinate wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von 110 Da pro Aminosäurerest angenommen.

Die Energiewerte $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$ für die unterschiedlichen Bestandteile des Hämocyanins von *Homarus americanus* sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Wie man aus den Werten unschwer ersehen kann, ist das Dodekamer des Hämocyanins um fünf- bis sechsmal stabiler gegenüber der Denaturierung durch Guanidiniumhydrochlorid als seine Strukturellen Untereinheiten. Dies steht auch in guter

Übereinstimmung mit den Experimenten zur temperaturabhängigen Denaturierung, da Proteine, die eine hohe Stabilität gegen Gdn·HCl aufweisen, auch erst bei höheren Temperaturen denaturieren.

4.2.4 Fluoreszenzeigenschaften des *Homarus americanus*-Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten

4.2.4.1 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs⁺ und I⁻

Die isolierten Untereinheiten lagen, wie Absorptionsmessungen ergaben, zu mehr als 90% in der oxygenierten Form vor. Das Absorptionsverhältnis $A_{340} \cdot A_{278}^{-1}$ lag bei 0.19, ein Verhältnis von 0.21 wurde für zu 100% in oxygeniertes Hämocyanin zugrunde gelegt. Die Experimente wurden sowohl mit der oxy- als auch mit der apo-Form durchgeführt, um den Einfluß des Kupfer-Peroxid-Komplexes auf die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins untersuchen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Das Maximum der Fluoreszenzemission des nativen Hämocyanins verschob sich von 324 ± 1 nm bei der oxy-Form nach 332 ± 1 nm bei der apo-Form und macht einen nicht geringen Einfluß des Kupfer-Peroxid-Komplexes auf die Fluoreszenzeigenschaften deutlich. Gleichzeitig erhöhte sich die Fluoreszenzquantenausbeute von 0.022 auf 0.085 um nahezu das Vierfache, ein Effekt, der auch bei anderen Hämocyaninen beobachtet werden konnte (Kap. 4.1.4.1) und die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt [157]. Dieselbe Tendenz einer Rotverschiebung wurde auch bei den isolierten Strukturellen Untereinheiten beobachtet, wobei diese hier allerdings nicht so markant ausfiel wie beim nativen Hc. Insgesamt waren die Emissionsmaxima der oxy-Formen der Untereinheiten im Vergleich zur oxy-Form des nativen Hämocyanins jedoch um 10 bis 14 nm rotverschoben, während die apo-Formen sowohl des nativen Hc als auch seiner Untereinheiten in einem Bereich zwischen 332 nm und 338 nm lagen. Da die CD-Spektren im fernen UV für die Untereinheiten und das gesamte Aggregat keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, dürften diese Unterschiede nicht auf die Dissoziation zurückzuführen sein. Vielmehr kann angenommen werden, daß durch die Dissoziation einige Indolringe von einem hydrophoben in ein polares Umfeld überführt werden. Dieser Effekt kommt bei den oxy-Formen mehr zum Tragen, da der Kupfer-Peroxid-Komplex die Fluoreszenz der in der Nähe des Aktivzentrums und der tiefer im Inneren des Proteins liegenden Tryptophylreste selektiv löscht.

Tabelle 15. Fluoreszenzparameter des Hämocyanins von *Homarus americanus* und seinen Strukturellen Untereinheiten.

Protein	Emission λ [nm] Anregung bei 295 nm	Fluoreszenz- quantenaus- beute [Q]	Tyr-Trp- Energie- transfer %	Acrylamid- löschung K_{SV} [M^{-1}]	KI- Löschung K_{SV}^- [M^{-1}]	CsCl- Löschung K_{SV}^+ [M^{-1}]	E $\frac{K_{SV}^-}{K_{SV}^+}$
Natives oxy- Hc apo-	324 \pm 1 332 \pm 1	0.022 0.085	0.65	1.1	0.1	0.25	0.40
HaH-1 oxy- apo-	336 \pm 1 338 \pm 1	0.053 0.120	0.40	6.8	1.00	1.90	0.59
HaH-2 oxy- apo-	335 \pm 1 337 \pm 1	0.058 0.110	0.40	8.5	0.70	1.55	0.45
HaH-3 oxy- apo-	335 \pm 1 336 \pm 1	0.058 0.100	0.42	9.1	0.75	1.45	0.52
HaH-4 oxy- apo-	334 \pm 1 338 \pm 1	0.056 0.110	0.31	8.1	1.35	1.60	0.84
HaH-5 oxy- apo-	333 \pm 1 336 \pm 1	0.030 0.100	0.40	3.01	1.10	1.80	0.61
HaH-6 oxy- apo-	336 \pm 1 338 \pm 1	0.038 0.110	0.40	3.01	0.90	0.50	0.60
Ac-Trp-NH ₂	350 \pm 1	0.130	1.25	16.33	8.80	2.00	4.40

Ein Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen den apo-Formen des nativen Hämocyanins (0.085) der Untereinheiten (0.100 - 0.120) und dem freien N-Acetyltryptophanamid (0.130) lassen den Schluß zu, daß viele Tryptophylreste in den Kontaktregionen der Untereinheiten angeordnet sind, die nach der Dissoziation an der Oberfläche der Proteine exponiert werden. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Löschexperimente gestützt. Die Löschkonstante K_{SV} für das native oxy-Hc ist mit einem Wert von 1.1 äußerst niedrig im Vergleich zu 16.33, der Konstanten des freien N-Acetyltryptophanamids.

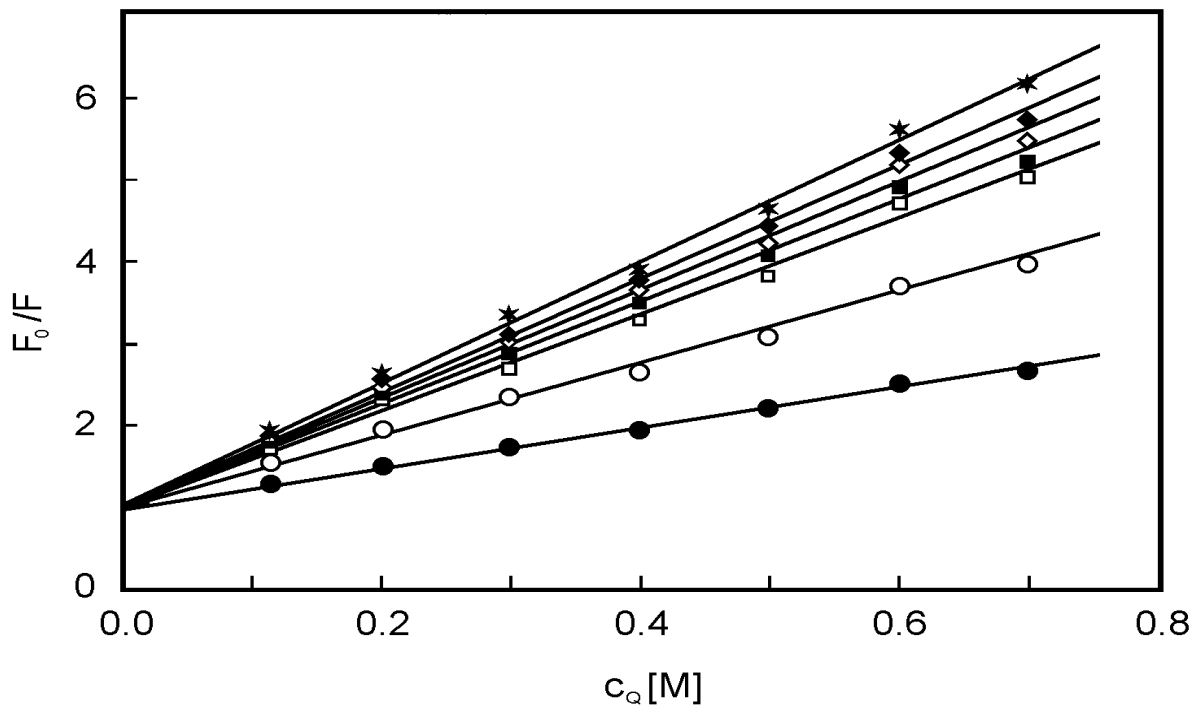


Abb. 43. Stern-Volmer-Plots der Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid der apo-Formen von: Hc (●-●), HaH-1 (□-□), HaH-2 (-), HaH-3 (★-★), HaH-4 (◆-◆), HaH-5 (■-■), HaH-6 (○-○). Proteinkonzentrationen: $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.

Für die freien SU wurden Löschungskonstanten in einem Bereich von 4.8 bis 9.1 gefunden. Diese Werte sind zwar nur in etwa halb so groß wie der des freien N-Acetyltryptophanamids, aber mit Faktoren von 4.5 bis 8.5 immerhin um soviel größer als der Wert für das Dodekamer, um deutlich werden zu lassen, daß nach der Dissoziation vermehrt Tryptophylreste exponiert werden. Zu demselben Schluß führen die Resultate der mit ionischen Löschermolekülen durchgeführten Experimente. Auch hier stiegen die Werte der Löschungskonstanten nach der Dissoziation signifikant an. Für den Elektrostatischen Parameter E wurden Werte zwischen 0.4 und 0.84 berechnet, die eindeutig ein, allerdings sehr heterogenes, negativ geladenes Umfeld für die Tryptophylreste ausweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Hämocyanine der Arthropoden *Callinectes sapidus* [127] und *Carcinus maenas* [158] gefunden. Die hohe effektive Energieübertragung ist ein Hinweis darauf, daß sowohl im oxy- als auch im apo-Hämocyanin die Tyrosinreste in einer charakteristischen Ausrichtung zu den Tryptophylresten stehen, und die Hypothese, daß eine Tyrosylemission in oxy- oder apo-Hämocyaninen nicht zu beobachten ist, weil der größte Teil der Energie auf Tryptophylreste übertragen wird, wird durch diese Ergebnisse untermauert.

4.2.4.2 Die Abhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz vom pH-Wert und der Temperatur

Die Auswirkungen des pH-Wertes auf die relative Fluoreszenzquantenausbeute wurden an den apo-Formen der Proteine untersucht. Dies deshalb, weil der Kupfer-Peroxid-Komplex die Fluoreszenz beeinflusst und es durch die pH-abhängige Sättigung des Hämocyanins mit Sauerstoff zu einer Beeinflussung der Fluoreszenzquantenausbeute kommen kann. Zwischen pH 5 und pH 6 steigt die Quantenausbeute sowohl im nativen Hc als auch bei den Untereinheiten an. Dabei war der Anstieg beim nativen Hämocyanin besonders markant. Wie in Abb. 44 zu sehen ist, existiert ein großer Bereich (pH 6 bis 9), in dem die Fluoreszenzquantenausbeute stabil bleibt.

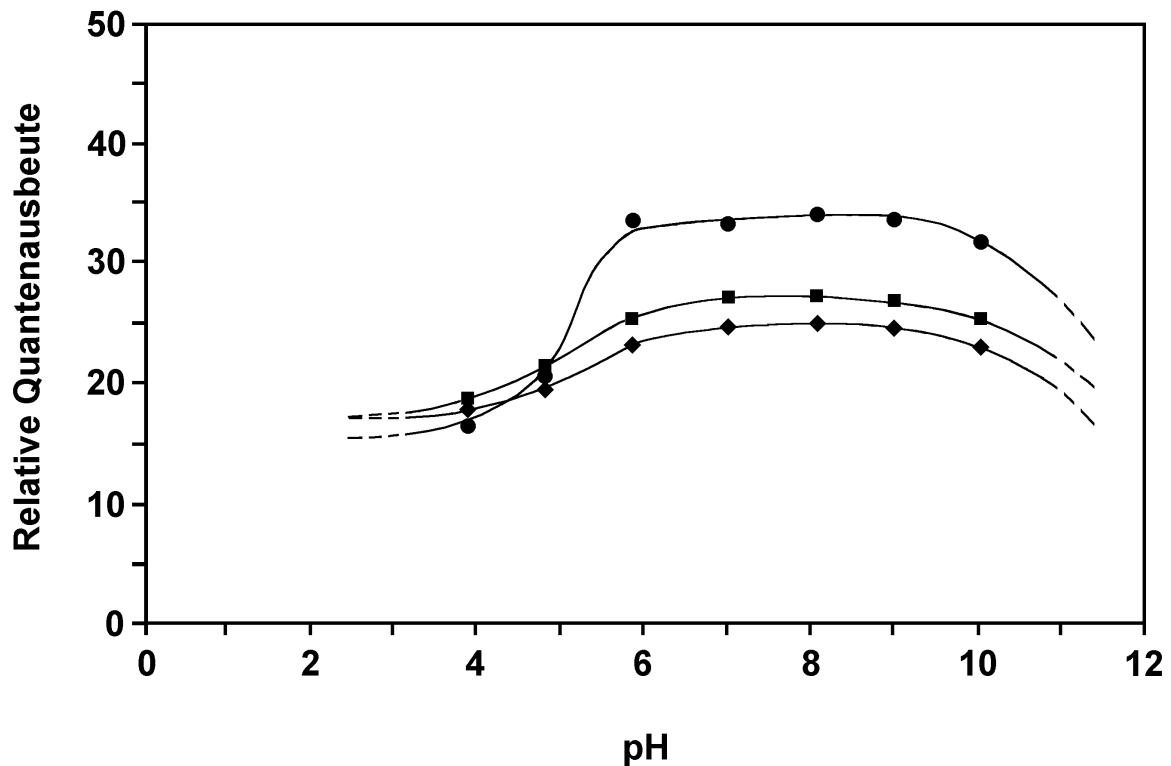


Abb. 44. pH-Abhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz der apo-Formen des undissoziierten Hämocyanins (●-●) und der Untereinheiten HaH-4 (◆-◆) und HaH-5 (■-■) nach der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 295 nm. Proteinkonzentration: 0.2 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl, pH 8.

Aus den Arrhenius-Plots (Abb. 45) wurde die Energie E_a für die thermische Desaktivierung angeregter Proteinfluorophore berechnet, die für die Untereinheiten Werte zwischen 7.50 kJ·mol⁻¹

und $10.15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ergab, während der Wert für das Dodekamer ca. fünfmal höher bei $50.50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ lag (Tabelle 14). Aus der Auswertung der Arrhenius-Plots (Abb. 45) und der Verschiebung des Emissionsmaximums der Tryptophylfluoreszenz (Abb. 46) ergab sich eine hohe Temperaturstabilität sowohl des Hämocyanins als auch der Strukturellen Untereinheiten. Diese Stabilität gegenüber thermaler Denaturierung ist mit 87°C für das native Hämocyanin extrem hoch. Die Untereinheiten denaturieren in einem Bereich zwischen 60°C und 70°C . Diese Werte sind niedriger als der Wert für das undissoziierte Hc, bewegen sich aber immer noch in Bereichen, die bei anderen Spezies für das undissoziierte Hämocyanin charakteristisch sind [160]. Dies bedeutet, daß das Hämocyanin durch die Aggregation der Strukturellen Untereinheiten stabilisiert wird.

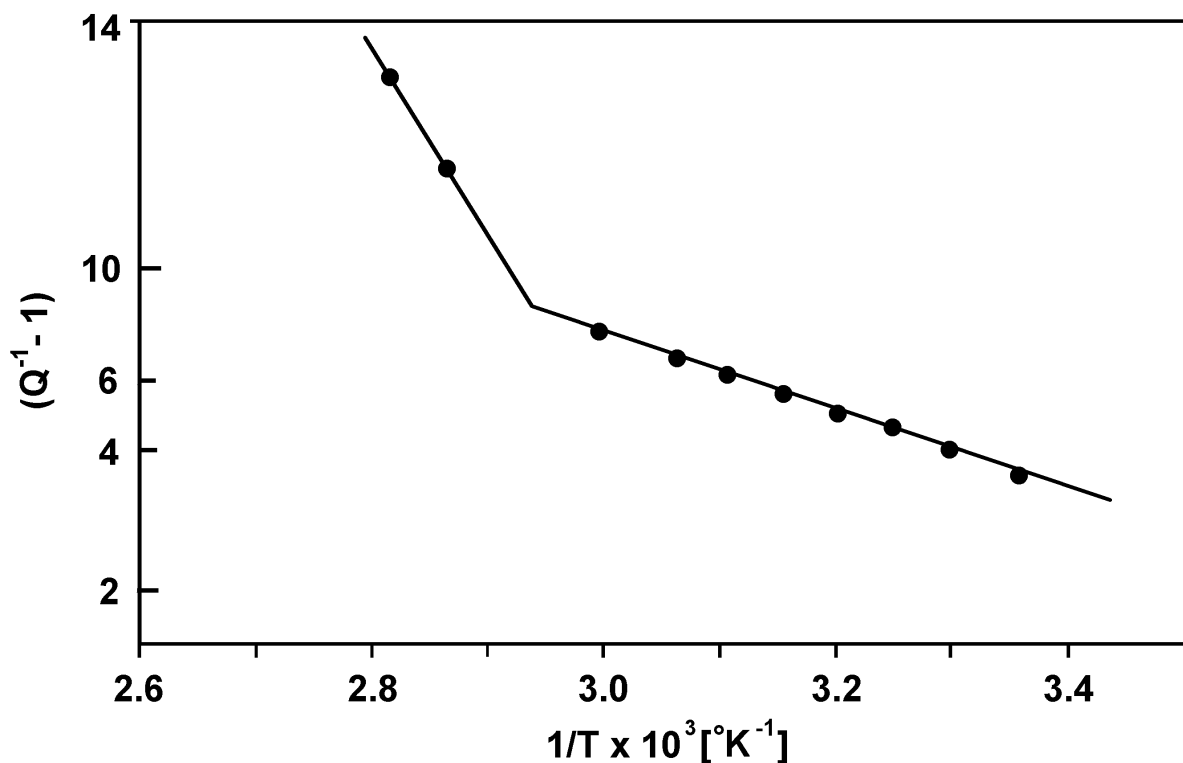


Abb. 45. Arrhenius-Plot der temperaturabhängigen Tryptophylfluoreszenz für die Funktionelle Untereinheit HaH-1 ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in einem Puffer aus $50 \text{ mM Tris}\cdot\text{HCl}$ und 10 mM CaCl_2 ($\text{pH } 8.0$). Die Fluoreszenzquantenausbeute wurde mit Ac-Trp-NH_2 als Standard berechnet.

Dieselbe hohe Temperaturstabilität wurde auch bei der Untersuchung der temperaturabhängigen Verschiebung der Wellenlänge des Maximums der Tryptophylemission gefunden, wo sich der Wert für das Dodekamer mit 77°C deutlich von den für die Untereinheiten berechneten Werten von 45°C bis 59°C abhebt. Diese Verschiebung von λ_{max} hängt mit der Veränderung der Konformation

zusammen, die mit einer gleichzeitigen Exposition von tiefer in der Proteinmatrix liegenden Tryptophylresten einhergeht.

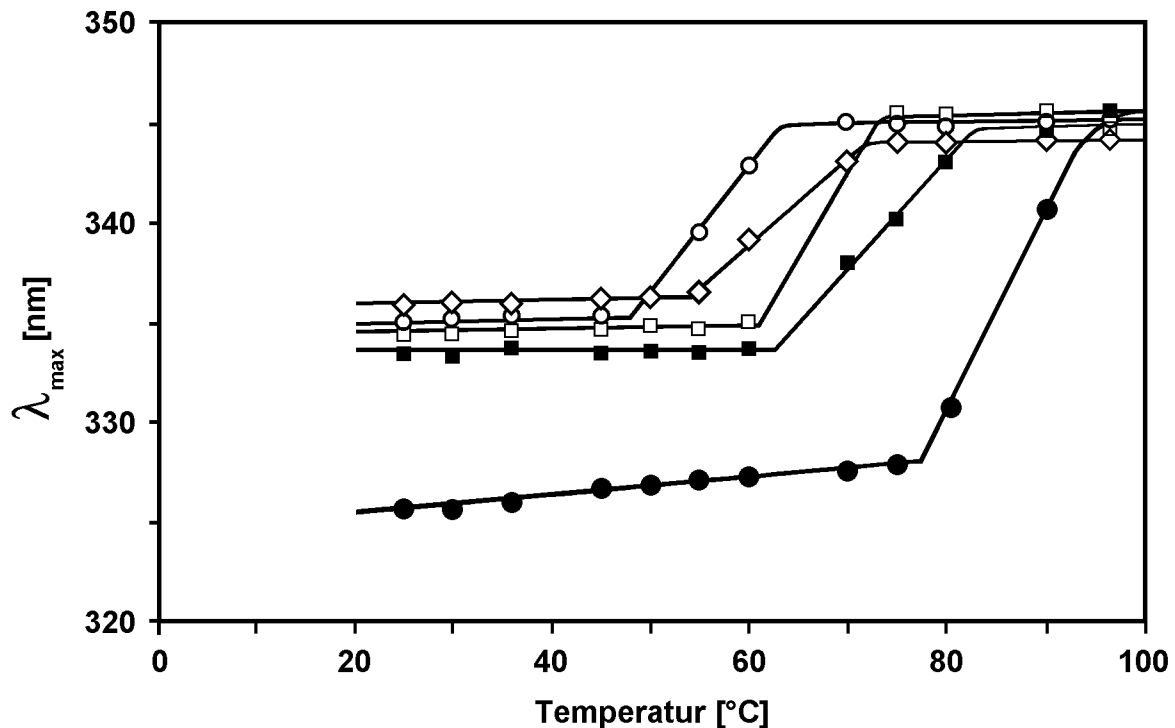


Abb. 46. Temperaturabhängigkeit des Emissionsmaximums der Tryptophylfluoreszenz des Hämocyanins von *Homarus americanus* Hc (●-●) und der Strukturellen Untereinheiten HaH-1 (□-□), HaH-2 (-), HaH-5 (■-■), HaH-6 (○-○). Proteinkonzentration: 0.2 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl (pH 8) mit 10 mM CaCl₂.

4.2.4.3 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung

Wie schon bei den Fluoreszenzuntersuchungen von KLH und seinen Strukturellen Untereinheiten fällt auch bei *Homarus americanus* die Abwesenheit einer Tyrosylemission auf. So sollte also auch hier ein relativ hoher von den Tyrosylgruppen aufgenommener Energiebetrag strahlungslos auf benachbarte Tryptophylreste übertragen und als Tryptophanfluoreszenz emittiert werden. Dies wurde durch die entsprechenden Berechnungen bestätigt, deren Ergebnisse in Abb. 47 graphisch dargestellt sind.

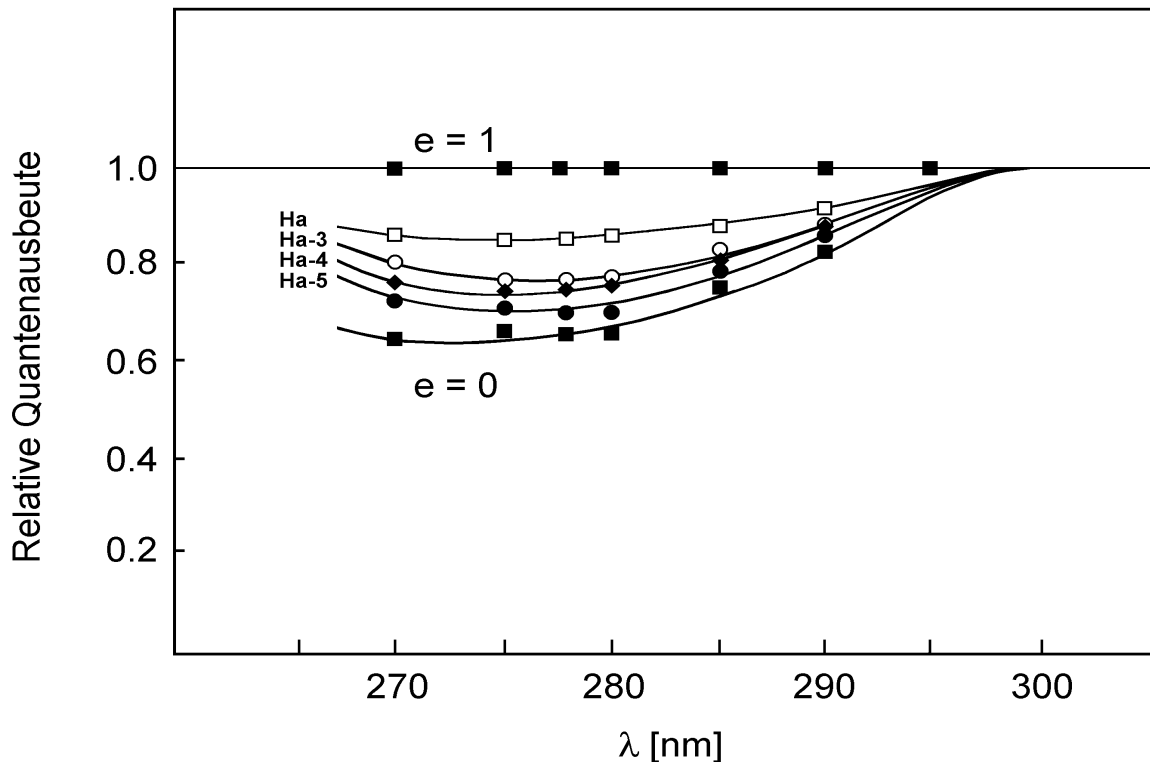


Abb. 47. Effektive Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung der apo-Formen des Dodekamers (\square - \square), HaH-3 (\circ - \circ), HaH-4 (\blacklozenge - \blacklozenge) und HaH-5 (\bullet - \bullet). Die Kurven (\blacksquare - \blacksquare) repräsentieren die Werte für $e = 0$ bzw. $e = 1$. Proteinkonzentration: $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: $50 \text{ mM Tris}\cdot\text{HCl}$ mit 10 mM CaCl_2 (pH 8).

Die beste Übereinstimmung zwischen den Messungen und den theoretischen Werten wurde für die dodekamere Form des Hämocyanins mit $e = 0.65$ und für die Strukturellen Untereinheiten in einem Bereich von $e = 0.25$ bis 0.40 gefunden. Dies bedeutet, daß im Dodekamer 65%, und in den Untereinheiten immer noch zwischen 25% und 40% des von Tyrosylgruppen absorbierten Lichtes auf Indolringe der Tryptophylreste übertragen wird. Die um etwa 50% niedrigere Übertragungsrate bei den freien Untereinheiten kann damit erklärt werden, daß durch die Dissoziation die relativen Orientierungen der Tyrosin- und Tryptophanreste zueinander verändert werden.

4.3 Isolierung und physikalisch-chemische Untersuchungen der Struktur des Hämocyanins von *Maia squinado*

4.3.1 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten von *Maia squinado*

Aus der Trennung des bei pH 10 dissoziierten Hämocyanins mittels Ionenaustausch-FPLC wurden insgesamt sieben Komponenten erhalten. Die 5 Hauptfraktionen 1 bis 5 entsprechen im weiteren den SU MsH-1 bis MsH-5, die beiden Nebenkomponten 6 und 7 den SU MsH-6 und MsH-7 (Abb. 48). Wie das UV-Spektrum der Untereinheiten und das aus den Spektren berechnete Absorptionsverhältnis von $A_{340} \cdot A_{278}^{-1} = 0.20$ zeigte, lagen alle Untereinheiten zu mehr als 90% in der oxygenierten Form vor. Die für die Sequenzierung noch einmal über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten Fraktionen zeigten, daß die Untereinheiten schon nach der FPLC-Trennung in reiner Form vorlagen (Abb. 49).

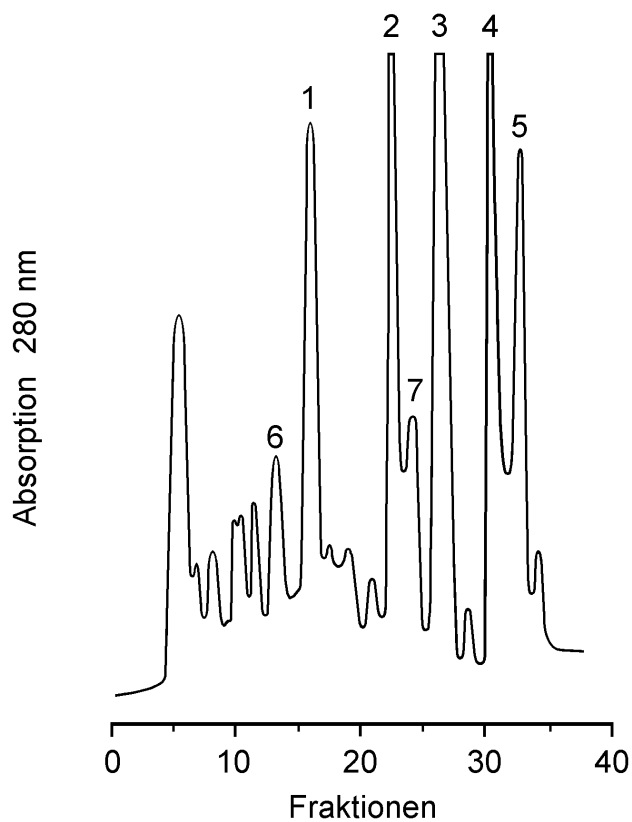


Abb. 48. FPL-Chromatogramm des dissoziierten Hämocyanins von *Maja squinado*; Dialysepuffer: 0.1 M NaHCO₃ (pH 10), 20 mM EDTA, 2 M Harnstoff; Säule: MonoQ HR 10/10; Elutionsmittel: Puffer A: 0.1 M NaHCO₃ (pH 10), 20 mM EDTA, 2 M Harnstoff; Puffer B: 1 M NaCl in Puffer A; Gradient: 10 min 0% B, 0% - 30% Puffer B in 10 min, 30% - 100% Puffer B in 50 min; Fließgeschwindigkeit: 2 mL min⁻¹; aufgetragene Menge: 6 mg·mL⁻¹ Protein in 500 µL Puffer A; Detektion bei $\lambda = 280$ nm.

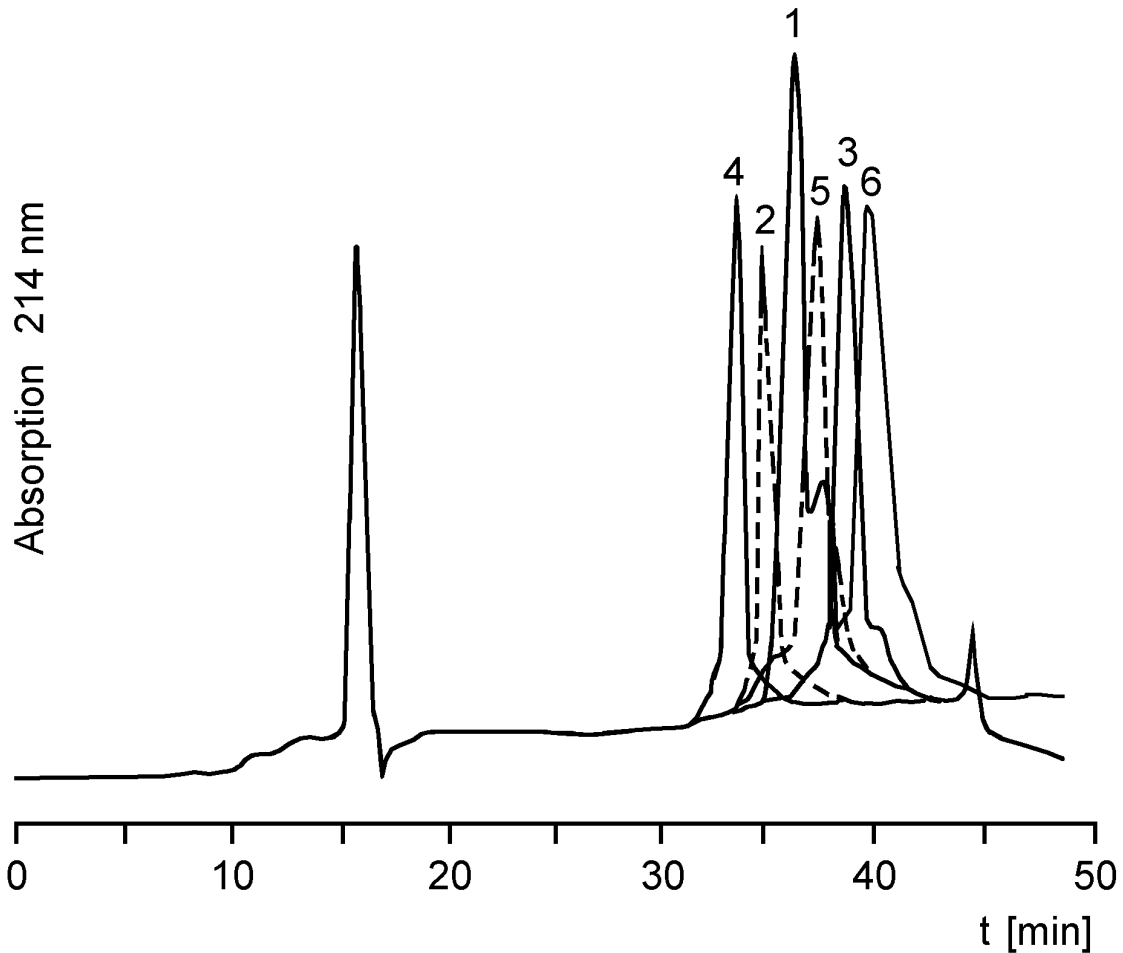


Abb. 49. HPL-Chromatogramme der Strukturellen Untereinheiten MsH-1 bis MsH-6. Bedingungen: Säule: Nucleosil 7 C₁₈; Elutionsmittel: Puffer A: 0.1% TFA in H₂O, Puffer B: 0.17% TFA, 80% Acetonitril in H₂O; Gradient: 10 min 10% Puffer B, 10% - 100% Puffer B in 70 min; Fließgeschwindigkeit: 1 mL·min⁻¹; injizierte Menge: 0.5 mg·mL⁻¹ Protein; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

Anhand von PAG-Elektrophoresen mit und ohne SDS-Zusatz konnte die Trennung und Aufreinigung der Proben verfolgt werden. Das ursprüngliche Dissoziationsgemisch enthielt 7 Banden, die den entsprechenden Peaks des FPL-Chromatogramms zugeordnet wurden. In Abb. 50 sind unter A die Banden der Funktionellen Untereinheiten MsH-1 bis MsH-3 zu sehen. Abschnitt B zeigt die Banden der Strukturellen Untereinheiten MsH-1 bis MsH-5.

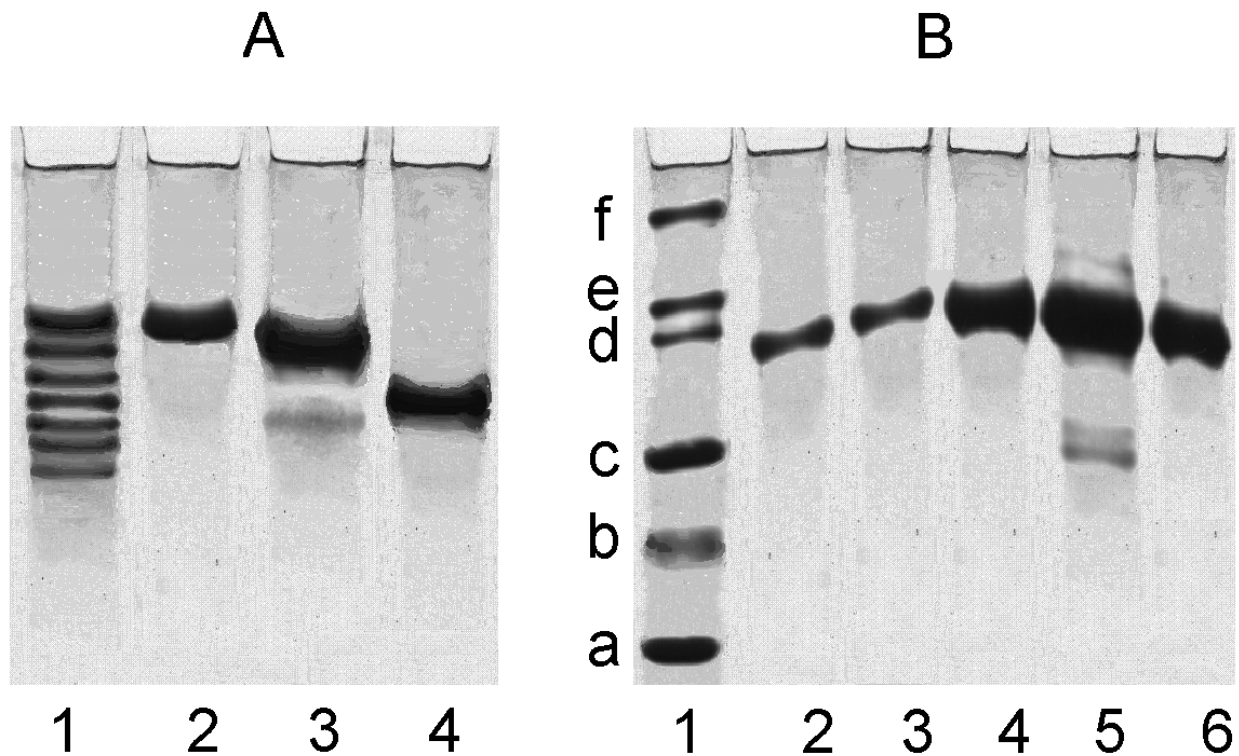


Abb. 50. PAG-Elektrophorese (10%, pH 8) der Untereinheiten von *Maia squinado*. (A) Bande 1: das Dissoziationsgemisch; Banden 2 - 4: Untereinheiten MsH-1/-2/-3 nach Auftrennung mit FPLC über eine MonoQ 10/10-Ionenaustauschersäule, (B) Bande 1: Standardproteine: a) Carboanhydrase ($M_r = 29$ kDa), b) Ovalbumin ($M_r = 45$ kDa), c) Rinderserumalbumin ($M_r = 66$ kDa), d) Phosphorylase B ($M_r = 97.4$ kDa), e) β -Galaktosidase ($M_r = 116$ kDa), f) Myosin ($M_r = 205$ kDa); Banden 2 - 6: die über eine Nucleosil 7C₁₈-Säule mittels HPLC aufgereinigten Untereinheiten MsH-1/-2/-3/-4/-5.

4.3.2 N-Terminale Sequenzen der Untereinheiten des Hämocyanins von *Maja squinado*

Zur Identifizierung und zur Überprüfung des Inhalts der erhaltenen FPLC-Fractionen wurden die Proteine N-terminal ansequenziert. Die Sequenzen der Strukturellen Untereinheiten von *Maja squinado* sind in Abb. 51 schon zuvor veröffentlichten Sequenzen anderer Spezies aus der Familie der Dekapoden vergleichend gegenübergestellt. Zur besseren Verdeutlichung der Homologie sind Deletionen eingefügt worden. Die Ähnlichkeiten der *Maja*-Sequenzen zu denen anderer Brachyuren sind augenfällig (Abb. 51). Allen Polypeptidketten zu eigen sind die konservierten

Aminosäurereste in den Positionen 11 (Lys), 12 (Gln) und 16 (Asn) (grau unterlegt und eingerahmt). Hohe Übereinstimmung zeigen die aufgeführten Untereinheiten in den Positionen 15 (Val), 18 (Leu) und 22 (Ile) (grau unterlegt), bei denen es zum Teil zu Substitutionen durch isofunktionelle Aminosäuren kommt. Eine weitergehende Übereinstimmung in Position 33 (Leu) auf alle angegebenen Untereinheiten, ist - trotz der geringen Anzahl von bekannten Sequenzen, welche die Aminosäure konserviert zeigen - wahrscheinlich.

	1	5	10	15	20	25	30	35																																
MsH-1	D	Q	P	G	D	V	-	K	T	H	K	-	Q	Y	D	V	N	R	L	L	F	F	K	I	S	P	I	S	D	A	Y	S	E	L	K	Q	L			
MsH-2				G	-	Q	L	A	L	K	-	Q	Q	T	V	N	R	L	L	N	K	I	Y	S	P	I	S	D	A	Y	S	E	L	K	Q	L				
MsH-3				G	G	P	-	A	G	K	-	Q	N	A	V	N	Q	L	L	V	L	I	Y	D	P	K	S	Y	K	D										
MsH-4				D	G	P	-	A	G	K	-	Q	N	T	V	N	Q	L	L	V	L	I	Y	L	Y	K														
MsH-5	D	H	A	G	T	V	S	K	A	H	K	-	Q	H	D	V	N	S	V	L	Y	K	V	Y	E	D	I													
MsH-6				G	G	P	S	Q	K	Q	K	-	Q	H	K	V	N	L	V	N	I	K	V	Y	I															
MsH-7				S	G	P	-	A	Q	K	-	Q	N	V	V	N	Q	L	L	V	L	I	Y	L	Y	K	X	D	S											
CpH-4					A	D	L	A	H	-	R	Q	Q	S	V	N	R	L	L	Y	K	I	Y	S	P	I	S	S	A	Y	A	E	L	K	Q	S				
CmagH-6		T	A	G	G	A	F	D	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	S	A	L	W	K	V	Y	E	D	I	Q	D	P	H	L	I	Q	L	S	Q			
CmH-3	D	S	P	G	G	A	S	D	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	S	T	L	X	K	V	Y	X	E	I													
CmH-4		G	F	G	E	-	D	I	A	M	K	-	Q	H	Q	V	N	S	L	L	D	I	L	F	V	F														
HaH-1				G	T	T	V	V	A	H	K	-	Q	Q	S	V	N	R	L	L	Y	K	V	T	S	H	I	P	D	T	F	F	S	L	K					
HaH-2					-	A	D	V	A	H	K	-	Q	Q	S	V	N	H	L	L	Y	L	V	T	S	H	Y	P	S	L	D	Y	S	L	L					
HaH-3	G	V	P	S	V	S	T	V	N	V	A	K	-	Q	H	D	V	N	F	L	L	F	K	V	Y	I														
HaH-4				G	A	Y	G	-	Q	Q	N	I	G	-	Q	L	F	V	N	I	L	I	F	L	F	Y														
HaH-5				G	A	-	G	E	A	L	N	A	-	K	R	Q	Q	D	V	N	H	L	L	D	L	I	Y	D	H	L	H	Y								
HaH-6					S	P	A	F	Q	A	Q	K	-	Q	A	K	V	N	D	V	L	D	K	L	Y															
AIH-b	D	A	S	G	-	A	T	L	A	-	K	R	Q	Q	V	V	N	H	L	L	E	H	I	Y	D	H	T	H	F	T	D	-	-	L	K	N	I	A		
CdH-M1	D	G	S	G	G	A	S	D	A	Q	K	-	Q	H	D	V	N	Y	L	L	F	K	V	Y	E	D	V	N	D	E	N	S	P							
CdH-M3'	G	V	G	D	V	H	D	E	Q	K	K	Q	Q	H	D	I	N	F	L	L	F	K	V	Y	E	V	L	X	D	I	X	-	-	L	K	X	V	A		
PiH-a	D	A	L	G	T	-	G	N	A	Q	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K	I	Y	E	P	T	K	Y	P	D	-	-	L	K	E	I	A		
PiH-b	D	A	L	G	T	-	G	N	A	N	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K	I	Y	E	P	T	K	Y	P	D	-	-	L	K	E	I	A		
PiH-c		A	D	C	Q	A	G																																	
PjH-Ia		A	D	X	Q	P	G																																	
PjH-Ib				D	S	V	G	S	-	T	A	Q	K	-	Q	N	N	I	N	H	L	L	D	K																
PjH-II				D	V	V	A	S	-	S	T	A	H	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D	K															
PiH-III				D	A	H	G	S	-	G	N	A	H	K	-	Q	Q	D	I	N	H	L	L	D																

Abb. 51. N-Terminale Sequenzen von *Maia squinado* (MsH-1 bis MsH-7) im Vergleich mit denen von *Homarus americanus* (HaH-1 bis HaH-6), *Astacus leptodactylus* (AIH-b [151]), *Cherax destructor* (CdH-M1, CdH-M3' [152]), *Cancer pagurus* (CpH-4 [152]), *Carcinus maenas* (CmH-3, CmH-4 [152]), *Panulirus interruptus* (PiH-a [11, 152, 153]), *Panulirus japonicus* (PjH-Ia, PjH-Ib, PjH-II, PjH-III [154]) und *Cancer magister* (CmagH-6 [155]). Streng konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt und eingerahmt, isofunktionelle Aminosäuren sind grau unterlegt, Aminosäuren die nicht in allen Sequenzen vorhanden sind, aber signifikant auftreten, sind eingerahmt.

Teilweise konserviert sind die AS in den Positionen 4 (Gly), 9 (Ala), 19 (Leu), und 21 (Lys) (eingrahmt). Diese Positionen sind bei den unterschiedlichen Polypeptidketten nicht durch isofunktionelle Aminosäuren substituiert. MsH-1, MsH-4 und MsH-5 beginnen N-terminal wie *Astacus*, *Cherax-M1*, sowie *P. japonicus-Ib*; *-II* und *-III* und *P. interruptus-a* mit einem Asparaginrest, bzw. mit dem Motiv DxxG. Bei MsH-4 folgt das G direkt auf das D, und es könnte diskutiert werden, ob sich das Motiv DxxG hieraus durch Insertion entwickelt hat oder es sich andererseits um eine Deletion handelt. Die SU MsH-3, MsH-4 und MsH-7 weisen als Beginn das Motiv xGPA (fetter schwarzer Rahmen) auf, welches bei MsH-6 auf das Motiv xGP reduziert ist, da das Ala durch ein Lys substituiert wurde. Obwohl MsH-3 und MsH-6 das gleiche Startmotiv GGP (fetter schwarzer Rahmen) zu eigen ist, besteht zwischen beiden Untereinheiten bis auf die konservierten Aminosäuren in Position 11, 12, 15, 16 und 23 keine weitere Übereinstimmung. MsH-3, MsH-4 und MsH-7 zeigen auch im weiteren Verlauf der Sequenz Übereinstimmungen, so in den Positionen 13 (Asn), und in den Positionen 17 bis 23 (QLLVLIY), was auf eine sehr enge Verwandtschaft dieser drei Untereinheiten schließen läßt. Interessant ist die Feststellung, daß sich Ms-4 und Ms-7 innerhalb der ersten 20 Positionen lediglich durch zwei Aminosäuren (Asp¹/Ser¹; Trp¹⁴/Val¹⁴) unterscheiden.

Tabelle 16. Homologien der Strukturellen Untereinheiten von *Maia squinado* (Angaben in Prozent). Homologien von über 50% sind fett gedruckt.

	MsH-2	MsH-3	MsH-4	MsH-5	MsH-6	MsH-7
MsH-1	40.0	43.8	37.5	52.4	27.8	35.3
	MsH-2	52.2	52.6	47.6	36.8	45.5
		MsH-3	76.2	38.1	47.4	66.7
			MsH-4	33.3	42.1	90.5
				MsH-5	52.4	33.3
					MsH-6	42.1

Diese enge Beziehung zwischen Ms-3, Ms-4 und Ms-7 wird auch durch die prozentuale Größenordnung der Homologie zwischen diesen Untereinheiten bestärkt, wie sie sich in Tabelle 16 darstellt. Eine Homologie von über 50% weisen außerdem noch die Paarungen MsH-1/MsH-5,

MsH-2/MsH-3, MsH-2/MsH-4 und MsH-5/MsH-6 auf. Zwischen allen anderen Untereinheiten existieren in dem betrachteten N-terminalen Bereich nur Homologien zwischen 27% und 47%. Eine interessante Feststellung ergibt der Vergleich zwischen MsH-7 und HaH-6, die ja unterschiedlichen Unterordnungen der Crustaceen angehören. Diese beiden Untereinheiten sind die einzigen einem c-terminalen Serin und weisen - mit entsprechenden Deletionen oder Insertionen im Anfangsbereich - ein Motiv S-P-A-Q-K-Q-xx-V-N-xx-L-xxx-Y auf. Auch zwischen anderen Untereinheiten von *Maia* und *Homarus* wurden größere Übereinstimmungen beobachtet. So besteht etwa zwischen MsH-2 und HaH-1 eine Homologie von 52%, MsH-5 und HaH-3 stimmen zu 54% und MsH-6 und HaH-6 zu 50% überein. Ebenfalls eine Homologie von 50% wurde zwischen MsH-5 und PjH-II sowie zwischen MsH-2 und PiH-a gefunden.

4.3.3 Untersuchungen mit Zirkulardichroismus

4.3.3.1 Bestimmung der Konformationsstabilität des *Maia squinado*-Hämocyanins und der SU unter dem Einfluß von pH-Wert, Temperatur und Guanidinhydrochlorid

Das CD-Spektrum des undissoziierten Hämocyanins zeigte einen ausgeprägten negativen Cotton-Effekt bei 210 nm und eine etwas schwächer ausgeprägte Schulter bei 222 nm (Abb. 52, durchgezogene Linie). Die Berechnungen der Sekundärstrukturen nach Yang *et al.* [148] ergab einen Anteil von 15% α -Helix und 38% β -Faltblattstruktur. Die Entfernung der Kupferionen aus dem Aktivzentrum sowie die Dissoziation in die Untereinheiten zeigte bei den CD-Spektren keine signifikanten Änderungen (Abb. 52, gestrichelte Linie: apo-MsH-3). Die CD-Spektren für die unterschiedlichen Formen des Hämocyanins von *Maja squinado* zeigen, daß die Konformation durch die Kupferionen im Aktivzentrum nicht wesentlich beeinflußt werden.

Hinsichtlich der Stabilität des Hämocyanins bzw. der Strukturellen Untereinheiten gegenüber dem pH-Wert wurde ein relativ breiter Bereich (pH 6 bis 9) gefunden, bei dem sich der Wert der Elliptizität bei 222 nm nicht änderte, die Konformation der Proteine sich also in diesem Bereich kaum ändert (Abb. 53).

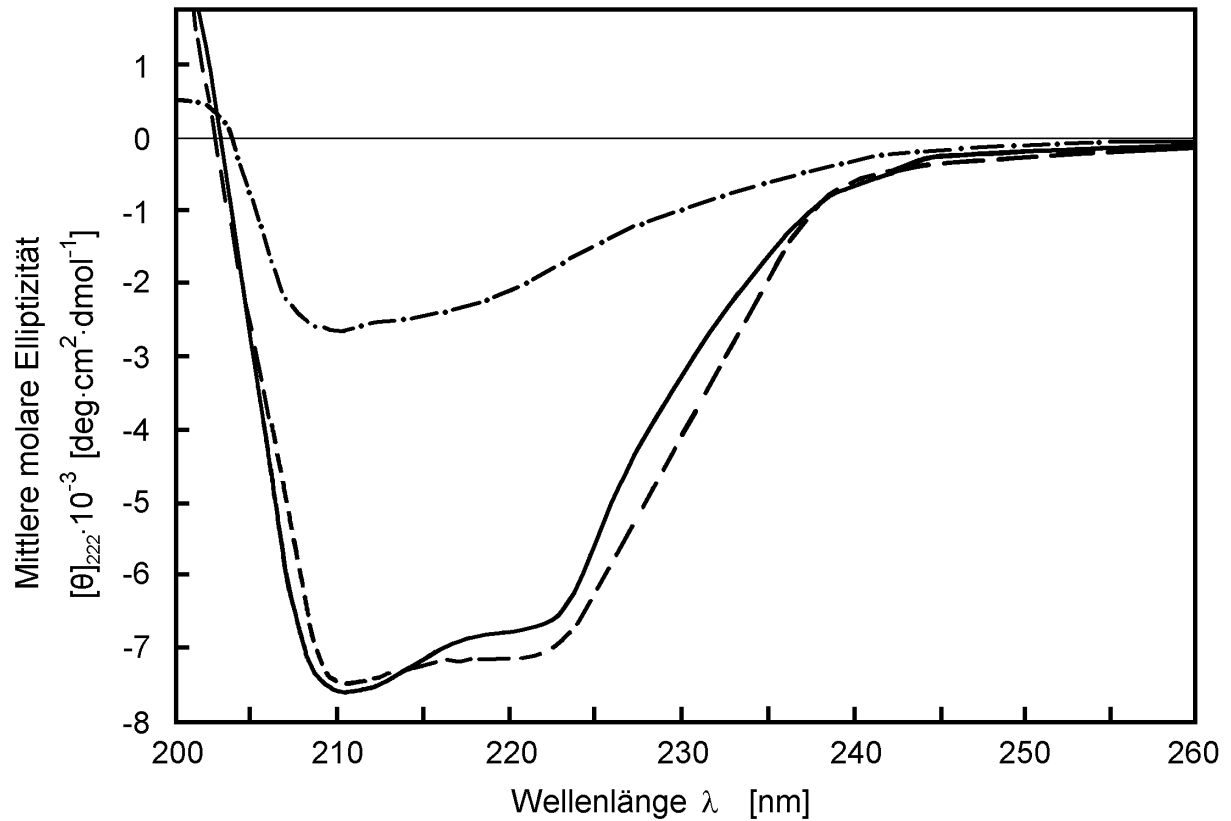


Abb. 52. CD-Spektren des undissoziierten Hämocyanins von *Maja squinado* (—), der apo-Form der FU MsH-3 (- -) und der apo-Form von MsH-3 nach 24stündiger Inkubation mit 6 M Gdn·HCl (• - • -). Proteinkonzentration: 0.4 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl, pH 8.2.

Die Temperaturabhängigkeit der Konformationsstabilität wurde im Bereich zwischen 20°C und 95°C untersucht. Die Werte der Elliptizität bei 222 nm wurden gegen die Temperatur aufgetragen und aus den Wendepunkten der Kurven die Denaturierungstemperatur bestimmt. Mit einer Entfaltungstemperatur von 72°C (oxy-Form) zeigt das Dodekamer eine relativ hohe Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung, wie dies auch schon bei *Homarus americanus* festgestellt worden war.

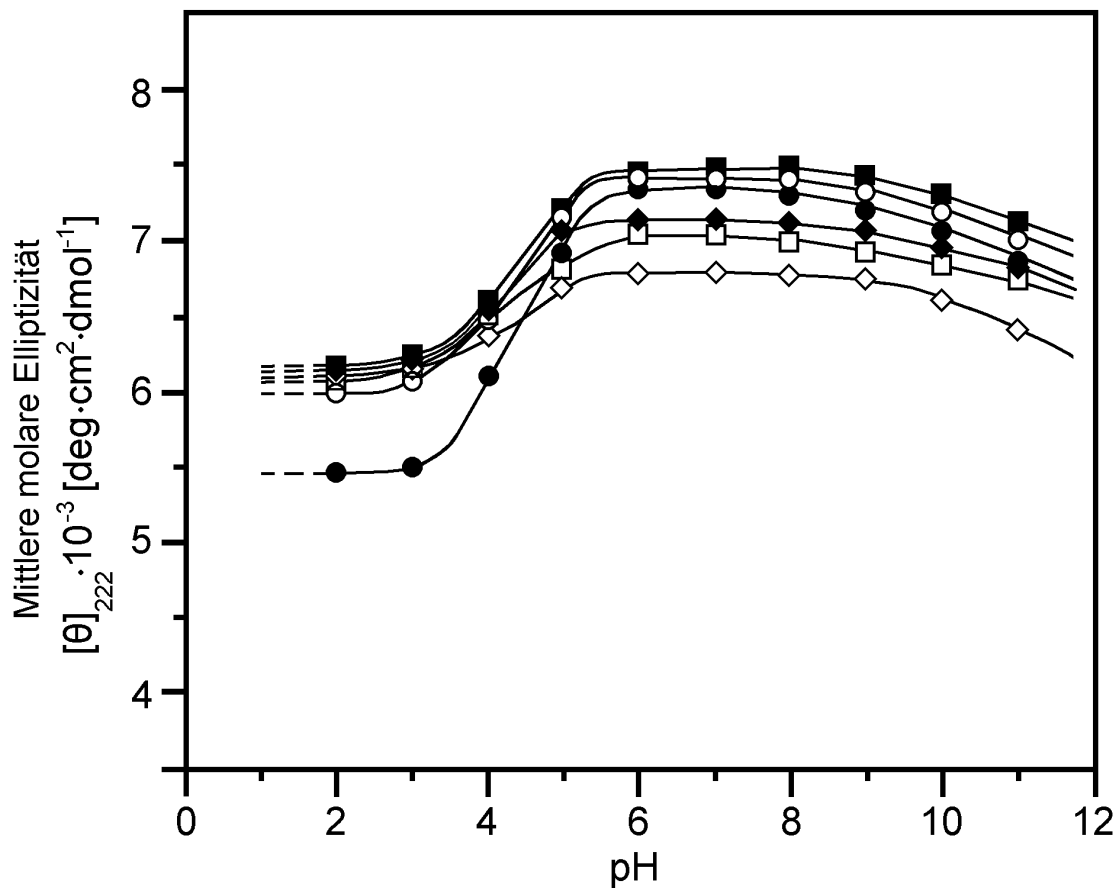


Abb. 53. Änderung der Elliptizität bei 222 nm bei pH-Werten von 2 bis 11. Natives Hämocyanin (●-●), MsH-1 (-), MsH-2 (□-□), MsH-3 (■-■), MsH-4 (◆-◆), MsH-5 (○-○). Proteinkonzentration: $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris-HCl mit 10 mM CaCl_2 . Zur Kalibrierung der Ordinate wurde für eine Strukturelle Untereinheit eine durchschnittliche Molekülmasse von 75 kDa angenommen.

Die Denaturierungstemperaturen der Strukturellen Untereinheiten bewegten sich in einem Bereich zwischen 49°C und 60°C . Die entsprechenden Temperaturen der apo-Formen der Proteine (Abb. 54, rechts) lagen um etwa 4 bis 6°C niedriger als die der oxy-Formen (Abb. 54, links). Der Vergleich der Denaturierungstemperaturen der oxy- und der apo-Formen (Tabelle 17) zeigt, daß der Kupfer-Peroxid-Komplex im Aktivzentrum einen gewissen Einfluß auf die Temperaturstabilität des Proteins ausübt.

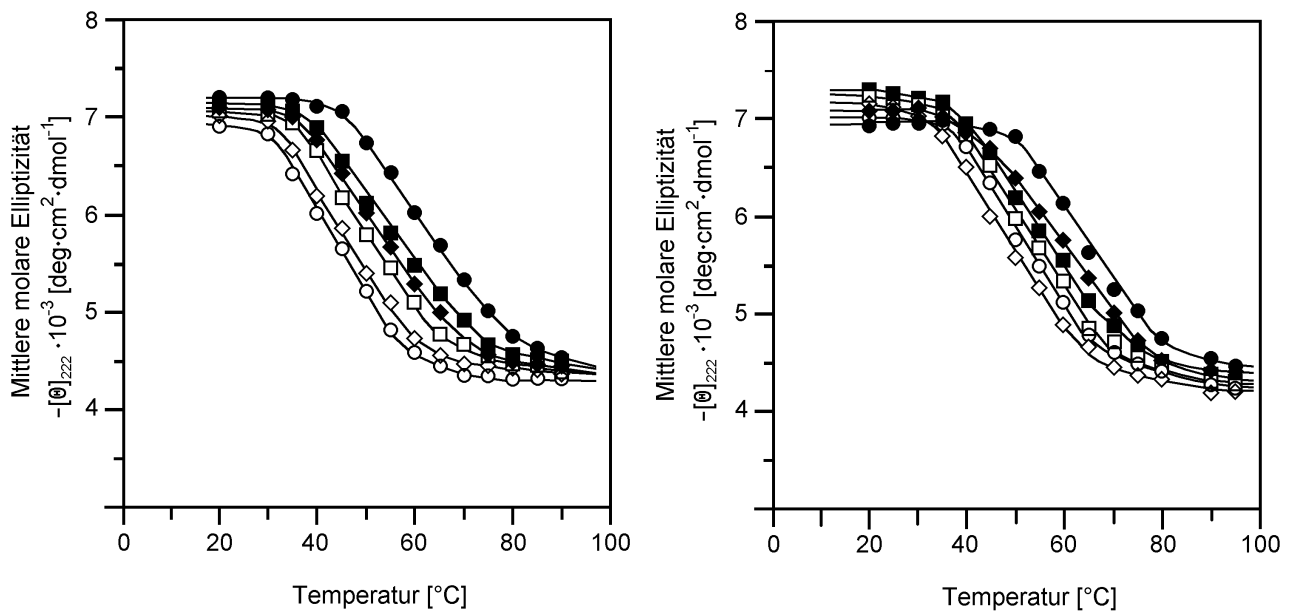


Abb. 54. Die Temperaturabhängigkeiten der Elliptizitäten bei 222 nm der oxy-Formen (links) und der apo-Formen (rechts) des Hämocyansins von *Maja squinado* (●-●) und seinen Strukturellen Untereinheiten MsH-1 (—), MsH-2 (□-□), MsH-3 (■-■), MsH-4 (◆-◆), MsH-5 (○-○). Proteinkonzentration: 0.4 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl, pH 8.2. Für die Kalibrierung der Ordinate wurde eine durchschnittliche Molekülmasse von 75 kDa pro Struktureller Untereinheit zugrunde gelegt.

Der Einfluß von Guanidinhydrochlorid auf die Stabilität der Proteine wurde ebenfalls anhand der Änderungen der Elliptizität bei 222 nm untersucht. Die Denaturierung setzt bei den Strukturellen Untereinheiten bei einer Konzentration von 1 M Gdn HCl ein, während das Aggregat bis zu einer Konzentration von 2 M Gdn·HCl stabil bleibt. Die vollständige Denaturierung tritt bei den SU bei Konzentrationen zwischen 4 M und 6 M Gdn·HCl, beim Aggregat bei 7 M Gdn·HCl ein. Abb. 52 zeigt das CD-Spektrum der FU MsH-3 in 6 M Gdn·HCl nach einer Einwirkungszeit von 24 h als Beispiel für ein weitgehend denaturiertes Protein. Wie auch schon bei den Temperaturversuchen festgestellt werden konnte, weist das Aggregat eine höhere Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen auf als die einzelnen Untereinheiten. Dies führt wieder zum Schluß, daß die Aggregation der Untereinheiten als ein entscheidender Beitrag zur Stabilisierung des Hämocyansins angesehen werden muß.

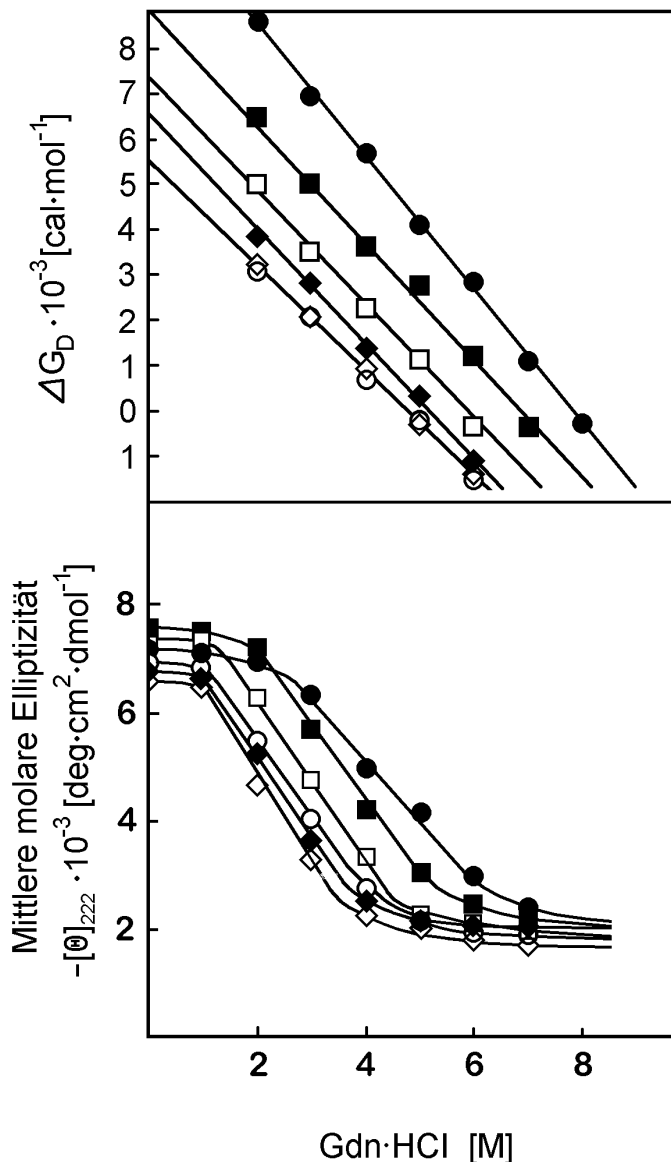


Abb. 55. Die Änderung der Freien Energie ΔG_D (oben) und der Elliptizität bei 222 nm (unten) als Funktion der Konzentration von Guanidiniumhydrochlorid der oxy-Formen des undissoziierten Hämocyanins (●-●), sowie SU MsH-1 (- -), MsH-2 (□-□), MsH-3 (■-■), MsH-4 (◆-◆), MsH-5 (○-○). Proteinkonzentrationen: $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Pufferlösung: 50 mM Tris·HCl, pH 8.2. Zur Kalibrierung der Ordinate wurde für eine Strukturelle Untereinheit eine durchschnittliche Molekülmasse von 75 kDa angenommen.

4.3.3.2 Bestimmung der freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$ des Hämocyanins von *Maia squinado* und seiner Strukturellen Untereinheiten

Die Änderung der Freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$, wurde für die verschiedenen Proteine durch Extrapolation der aus der Auftragung der Freien Energie ΔG_D gegen verschiedene Konzentrationen von Gdn·HCl erhaltenen Geraden auf die Konzentration $c_{\text{Gdn}\cdot\text{HCl}} = 0$ bestimmt. In Abb. 55 sind die Geraden für das native Hämocyanin und verschiedene Strukturelle Untereinheiten dargestellt. Die Werte von $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$ für die untersuchten Proteine sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Dodekamer etwa eineinhalb bis zweimal stabiler gegenüber der Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid ist als die einzelnen Strukturellen Untereinheiten. Dies steht mit den Ergebnissen der Temperaturversuche in Einklang und kann damit erklärt werden, daß durch die Aggregation der SU ein nicht zu unterschätzender Beitrag zur Stabilisierung des Dodekamers geleistet wird.

Tabelle 17. Die Werte der Freien Stabilisierungsenergie in Wasser $\Delta G_D^{H_2O}$, der Aktivierungsenergie E_a und der Denaturierungstemperatur aus den Fluoreszenzexperimenten (T_c) und aus den CD-Messungen (T_m) des Hämocyanins von *Maja squinado* und seiner Strukturellen Untereinheiten.

Protein	$\Delta G_D^{H_2O}$ [kcal·mol ⁻¹]	E_a [kJ·mol ⁻¹]	Fluoreszenz T_c [°C]	CD T_m [°C]	
				oxy-	apo-
Natives Hc	12.60	48.30	76	72	67
MsH-1	5.46	6.23	50	49	45
MsH-2	7.35	6.71	54	56	50
MsH-3	8.80	7.56	60	58	53
MsH-4	6.72	5.70	58	60	55
MsH-5	5.30	6.10	55	51	47

4.3.4 Fluoreszenzeigenschaften des *Maia squinado*-Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten

Das mit Licht von 295 nm bestrahlte native Hämocyanin von *Maia squinado* emittiert eine Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei 323 nm. Dieser Bereich um 320 nm ist typisch für die von Tryptophylseitenketten emittierte Strahlung [125, 160]. Ein Vergleich der Emissionseigenschaften von oxy- und apo-Formen unter denselben Bedingungen zeigte ein starkes Ansteigen der Fluoreszenzquantenausbeute ($Q_{oxy} = 0.021$; $Q_{apo} = 0.079$) nach der Entfernung des Kupfers und somit auch des Sauerstoffmoleküls aus dem Aktivzentrum. Gleichzeitig konnte eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums um 3 nm von 323 nm (oxy-Form) nach 326 nm (apo-Form)

festgestellt werden. Für die oxy-Formen der einzelnen Untereinheiten wurden, verglichen mit der oxy-Form des undissoziierten Hämocyanins, eine um etwa 20% bis 40% höhere Quantenausbeute erhalten, während die Quantenausbeute der entsprechenden apo-Formen nur um etwa 10% höher lag. Außerdem lag die Rotverschiebung der Emissionsmaxima der apo-Formen der Untereinheiten zwischen 1 und 4 nm.

4.3.4.1 Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid, Cs⁺ und I⁻

Fluoreszenzlöcher wie Acrylamid (neutral) sowie CsCl oder KI (geladen) geben darüber Auskunft, in welchen Bereichen Fluoreszenzemittenten - hier Tryptophylseitenketten - innerhalb eines Proteins positioniert sind. Dadurch, daß Acrylamid in die Proteinmatrix eindringen kann, ist es in der Lage die Strahlung tiefliegender Tryptophylreste löschen, während durch CsCl und KI nur die Fluoreszenz von auf der Oberfläche des Proteins sich befindenden Tryptophanresten gelöscht wird. Die Werte der Stern-Volmer-Konstante K_{SV} geben Aufschluß darüber, wie stark die Tryptophanreste mit den einzelnen Löschermolekülen in Wechselwirkung treten. Die Löschemperimente wurden wieder mit den apo-Formen des undissoziierten Hämocyanins und der einzelnen Strukturellen Untereinheiten durchgeführt, um Störeffekte durch selektive der Fluoreszenzlöschung der um das Aktivzentrum gruppierten Fluorophore durch den Kupfer-Peroxid-Komplex zu vermeiden. Für alle untersuchten Polypeptide wurden lineare Stern-Volmer-Plots gefunden (Abb. 56), die die Bestimmung einer Konstante für jedes Protein ermöglichten (Tabelle 18). Wie schon bei KLH und *Homarus americanus*-Hämocyanin wurden für das undissoziierte Hämocyanin sehr kleine Werte ($K_{SV} = 2.4 \text{ M}^{-1}$) für die Fluoreszenzlöschung gefunden, die bei frei in Lösung vorliegenden Tryptophanen bei 16.33 M^{-1} liegen. Die Werte für die SU liegen in einer Größenordnung von 3.5 M^{-1} bis 9.8 M^{-1} und damit zum Teil sehr nahe an den Werten ($9 - 12 \text{ M}^{-1}$) die für die an der Oberfläche von Proteinen lokalisierten Tryptophylreste berichtet wurden [161].

Die mit den ionischen Löschermolekülen gefundenen Ergebnisse stützen diese Beobachtungen. Diese können aufgrund ihrer Hydrathülle und ihrer Ionengröße nicht in das Protein eindringen und löschen daher selektiv die Fluoreszenz von oberflächenpositionierten Tryptophanen. Die Stern-Volmer-Konstanten sind für das undissoziierte Hc im Vergleich zu den Standardwerten (für Cs⁺: $0.78 \text{ M}^{-1} / 2.0 \text{ M}^{-1}$; für I⁻: $1.0 \text{ M}^{-1} / 8.8 \text{ M}^{-1}$) wieder sehr klein und nehmen nach der Dissoziation etwas zu, allerdings in geringerem Maße als bei der Acrylamidlöschung, was auf

Abschirmeffekte durch geladenen Reste, die in elektrostatische Wechselwirkung mit den Löschermolekülen treten können, zurückzuführen ist. Gemessen an den Standardwerten fallen die K_{SV} -Werte für die I-Löschung sehr viel geringer aus ($1.6 \text{ M}^{-1} - 2.7 \text{ M}^{-1} / 8.8 \text{ M}^{-1}$) als die der Cs^+ -Löschung ($0.7 \text{ M}^{-1} - 1.1 \text{ M}^{-1} / 2.0 \text{ M}^{-1}$), deren Stern-Volmer-Konstanten auch einen höheren Anstieg nach der Dissoziation verzeichnen als die der I-Löschung.

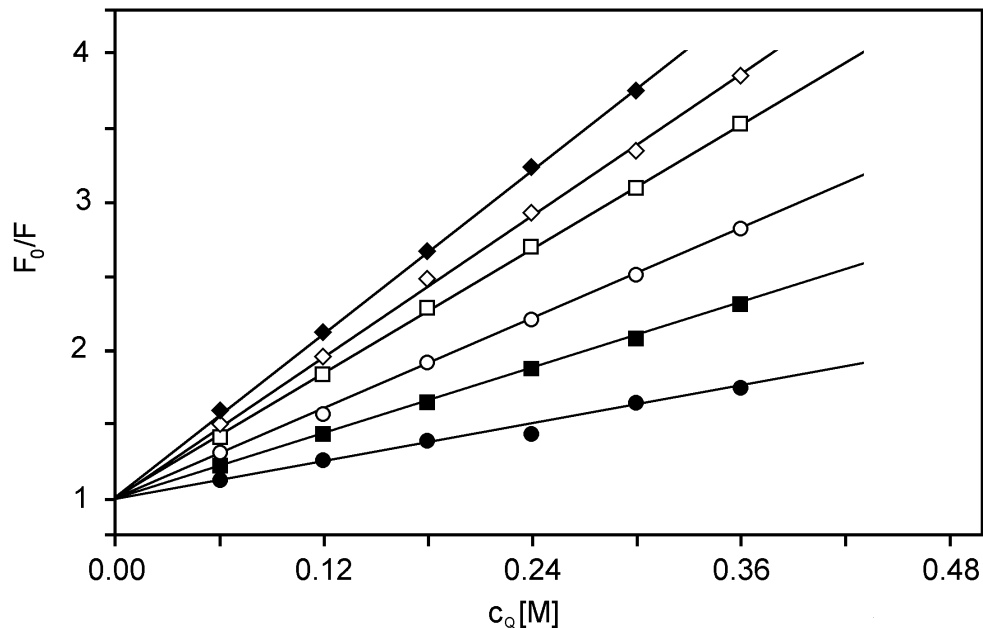


Abb. 56. Stern-Volmer-Plots der Fluoreszenzlöschung der apo-Formen des Hämocyanins von *Maia squinado* und seiner Strukturellen Untereinheiten mit Acrylamid nach der Anregung der Proben mit Licht der Wellenlänge 295 nm: Hc (●-●), MsH-1 (—), MsH-2 (□-□), MsH-3 (■-■), MsH-4 (◆-◆), MsH-5 (○-○). Proteinkonzentration: $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris·HCl, pH 8.2.

Für den Elektrostatischen Parameter E wurden Werte berechnet, die für eine negative Mikroumgebungen der Tryptophylreste sprechen. Wie bei KLH und dem Hämocyanin von *Homarus americanus* ist E für das Dodekamer mit 1.3 etwas niedriger als für die freien Strukturellen Untereinheiten, deren E -Werte sich über einen Bereich von 1.9 bis 2.4 erstrecken (Tabelle 18). Aus den unterschiedlichen E -Werten für die SU kann auf eine sehr differenzierte und heterogene Ladungsverteilung auf den Oberflächen der einzelnen SU geschlossen werden.

Tabelle 18. Fluoreszenzparameter des Hämocyanins von *Maia squinado* und seinen Strukturellen Untereinheiten.

Protein	Emission λ [nm] (Anregung bei 295 nm)	Fluoreszenzquantenausbeute [Q]	Tyr-Trp-Energie-transfer %	Acrylamidlöschung $K_{SV} [M^{-1}]$	KI-Löschung $K_{SV}^- [M^{-1}]$	CsCl-Löschung $K_{SV}^+ [M^{-1}]$	E $\frac{K_{SV}^-}{K_{SV}^+}$
Natives oxy-Hc	323±1	0.021					
apo-Hc	326±1	0.079	0.52	2.40	0.1	0.78	1.3
MsH-1 oxy-	336±1	0.028					
apo-	337±1	0.082	0.25	8.69	1.00	1.90	2.4
MsH-2 oxy-	333±1	0.030					
apo-	337±1	0.080	0.35	7.84	0.70	1.55	2.0
MsH-3 oxy-	336±1	0.026					
apo-	338±1	0.085	0.31	9.90	0.75	1.45	2.2
MsH-4 oxy-	334±1	0.024					
apo-	336±1	0.087	0.23	3.48	1.35	1.60	2.3
MsH-5 oxy-	333±1	0.025					
apo-	335±1	0.085	0.27	4.90	1.10	1.80	1.9
Ac-Trp-NH ₂	350±1	0.130	1.25	16.33	8.80	2.00	4.40

4.3.4.2 Die Abhängigkeit der Tryptophylfluoreszenz vom pH-Wert und der Temperatur

Die pH-Abhängigkeit der Quantenausbeute des Hc und der SU wurde anhand der apo-Formen untersucht, um Probleme mit der pH-abhängigen Sauerstoffsättigung des Aktivzentrums und den sich daraus ergebenden Fehlern bei der Berechnung der Quantenausbeute zu vermeiden. Wie in Abb. 57 zu sehen ist, steigt die Fluoreszenzquantenausbeute im Bereich von pH 4 bis pH 5 kontinuierlich an, um bei etwa pH 5.5 in ein Plateau überzugehen. Dieser stabile Bereich erstreckt sich von pH 5.5 bis pH 10, was bedeutet, daß die Proteine hier keiner wesentlichen konformativen Veränderung unterworfen sind.

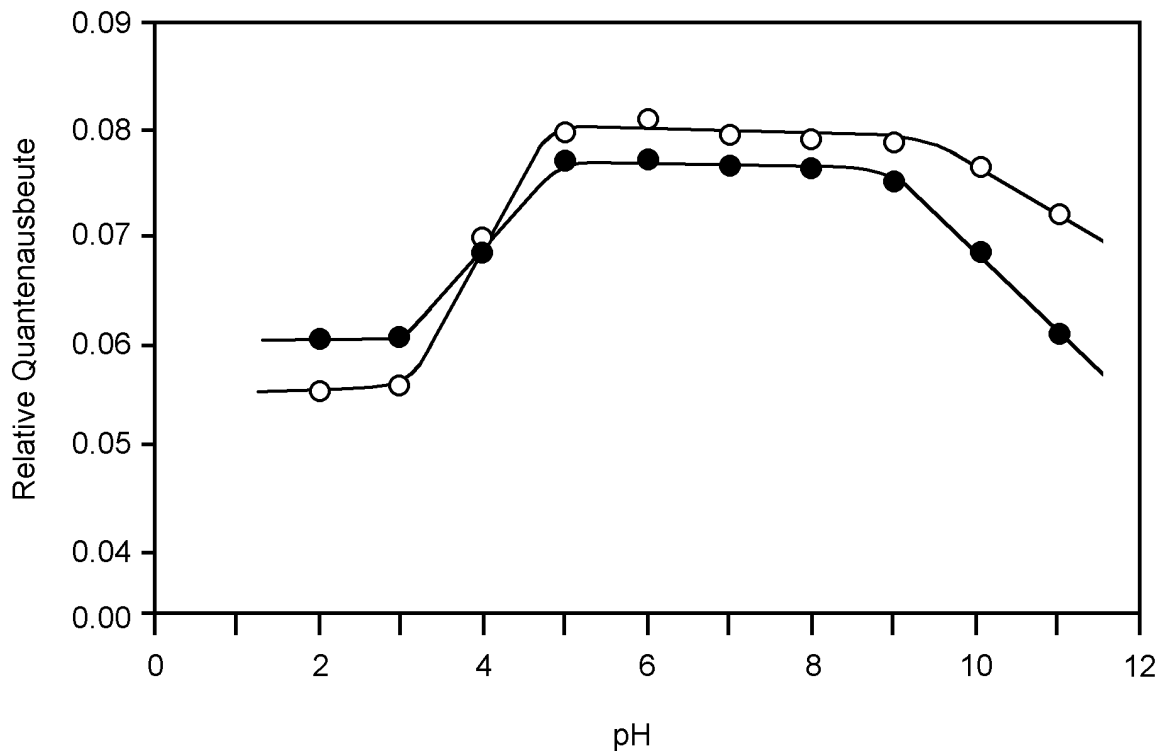


Abb. 57. pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute des Hämocyanins von *Maja squinado* und seine Strukturellen Untereinheiten nach der Anregung mit Licht der Wellenlänge 295 nm: Hc (●-●), MsH-I (○-○). Proteinkonzentration: 0.4 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris·HCl.

Die Temperaturabhängigkeit der Strahlungsintensität wurde in einem Temperaturbereich von 20°C bis 95°C untersucht. Es wurden für diese Messungen nur die apo-Formen der Proteine verwendet, da die Beladung des Aktivzentrums mit Sauerstoff temperaturabhängig ist und die Fluoreszenz-emission beeinflussen kann. Mit den erhaltenen Daten wurden Arrhenius-Plots (Abb. 58) erstellt, aus denen die 'Schmelztemperaturen' der verschiedenen Proteine bestimmt wurden (Tabelle 17). Für das undissoziierte Hämocyanin wurde für die Aktivierungsenergie E_a ein Wert von 48.3 kJ·mol⁻¹ gefunden. Mit 5.7 kJ·mol⁻¹ bis 7.6 kJ·mol⁻¹ sind die Werte der Strukturellen Untereinheiten zwischen fünf- und neunmal niedriger als die Aktivierungsenergie des Hämocyanins. Dieselbe Tendenz zeigen auch die Denaturierungstemperaturen T_c des Hämocyanins und seiner Strukturellen Untereinheiten.

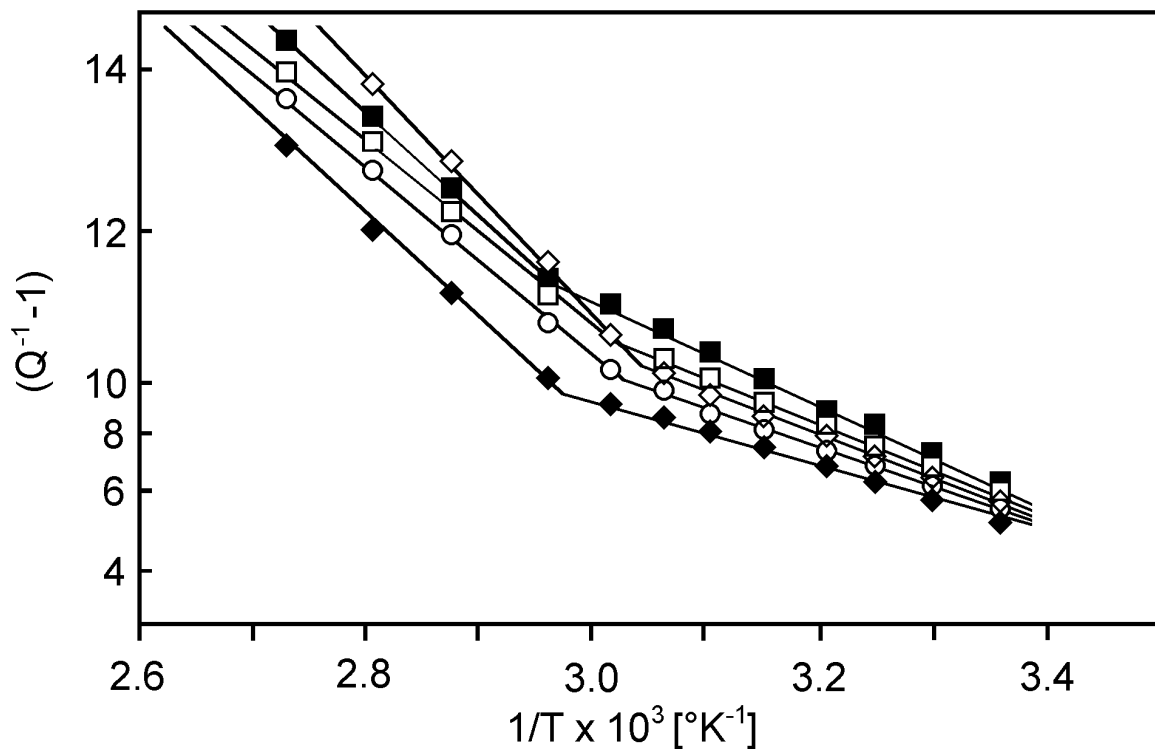


Abb. 58. Arrhenius-Plot der temperaturabhängigen Tryptophylfluoreszenz für die Strukturellen Untereinheiten MsH-1 (—), MsH-2 (□-□), MsH-3 (■-■), MsH-4 (◆-◆) und MsH-5 (○-○). Proteinkonzentration: 0.4 mg·mL⁻¹; Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.2). Die Fluoreszenzquantenausbeute wurde mit Ac-Trp-NH₂ als Standard berechnet.

Die temperaturbedingte Denaturierung ist irreversibel und wird von einer Rotverschiebung der Emissionsmaxima (λ_{\max}) begleitet. Diese Rotverschiebung resultiert aus der durch den Einfluß der höheren Temperatur verminderten Kompaktheit der Tertiärstruktur und den damit verbundenen Änderungen der Mikroumgebung der Tryptophylreste, die etwas polarer wird. Werden die Wellenlängen der Emissionsmaxima gegen die Temperatur aufgetragen, so kann am Ort der Diskontinuität die entsprechende kritische Temperatur der Denaturierung für das jeweilige Protein abgelesen werden (Abb. 59). Für die Untereinheiten betragen diese kritischen Temperaturen zwischen 50°C und 60°C und sind damit um 16 bis 26°C niedriger als die kritische Temperatur des Dodekamers, für das 76°C bestimmt wurden (Tabelle 17). Die aus den Fluoreszenzexperimenten ermittelten Denaturierungstemperaturen für das undissoziierte Hämocyanin von *Maja squinado* und seinen Strukturellen Untereinheiten liegen alle etwas höher als die aus den CD-Messungen

erhaltenen, liegen sich jedoch im selben Bereich und bekräftigen die relativ hohe Temperaturstabilität des Hämocyanins von *Maja squinado*.

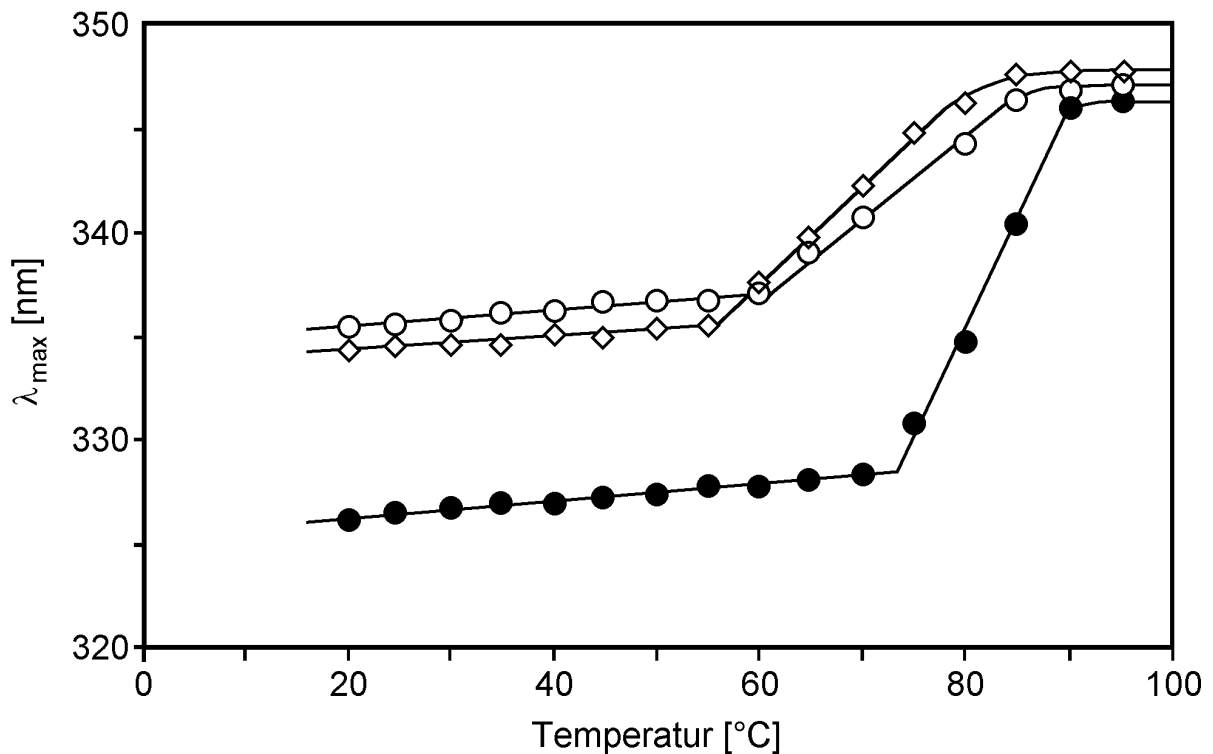


Abb. 59. Temperaturabhängigkeit des Emissionsmaximums der Tryptophylfluoreszenz des Hämocyanins von *Maja squinado* (●-●) und seiner Strukturellen Untereinheiten MsH-1 (-) und MsH-5 (O-O). Proteinkonzentration: $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris·HCl (pH 8.2).

4.3.4.3 Tyrosin-Tryptophan-Energieübertragung

Da auch bei *Maia squinado* keine Tyrosylemission beobachtet werden konnte, wurde die Energieübertragungsrate von Tyrosyl- auf Tryptophanreste bestimmt. In Tabelle 18 sind die Werte zusammengefaßt und in Abb. 60 mit einigen Beispielen graphisch dargestellt. Die beste Übereinstimmung der experimentellen mit den theoretischen Daten wurde für das Dodekamer mit $e = 0.52$ und für die SU in einem Bereich zwischen $e = 0.23$ und 0.35 gefunden. Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß im nativen Hämocyanin 52% und in den Strukturellen Untereinheiten zwischen 23% und 35% der von Tyrosylresten aufgenommenen Strahlung auf Tryptophylreste übertragen wird und als Tryptophylfluoreszenz emittiert wird.

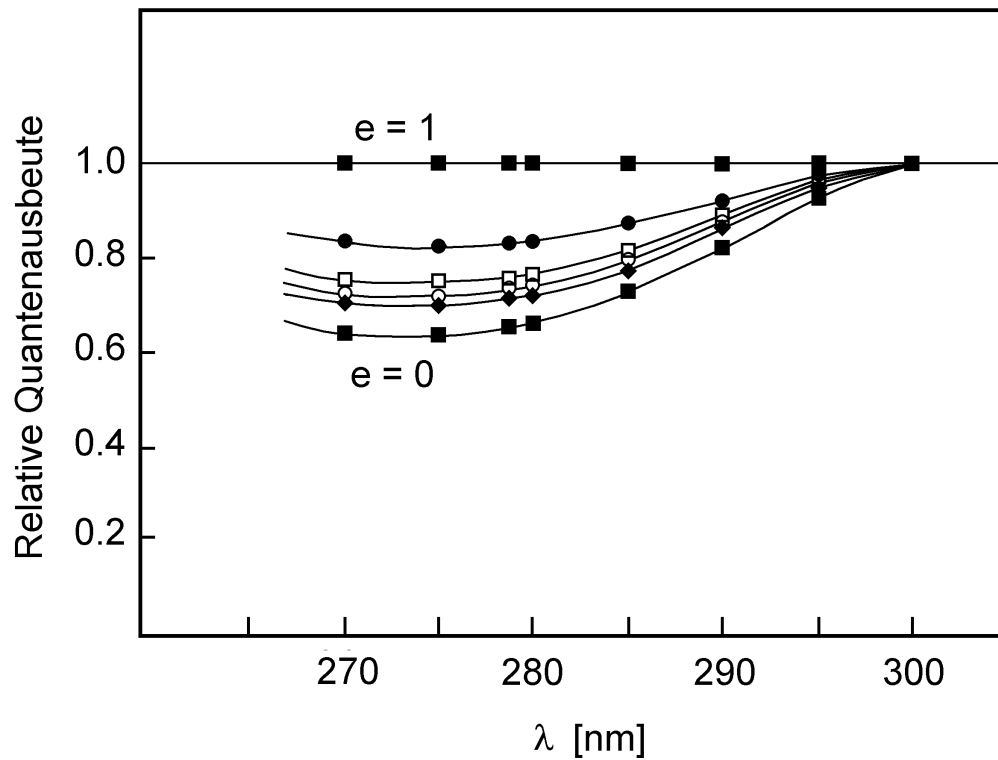


Abb. 60. Energieübertragung von Tyrosin- auf Tryptophanseitenketten bei den apo-Formen des Hämocyanins von *Maia squinado* (●-●) und seinen Strukturellen Untereinheiten MsH-2 (□-□), MsH-4 (◆-◆) und MsH-5 (○-○). (■-■) repräsentieren die theoretischen Werte für $e = 0$ und $e = 1$. Proteinkonzentration: $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Puffer: 50 mM Tris·HCl, (pH 8.2).

V. Experimenteller Teil

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Acetonitril p.a.	Merck, Darmstadt
Acetonitril s.g.	Applied Biosystems
Acetonitril (20% in Wasser) s.g.	Applied Biosystems
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose M	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
<i>Amarantus claudatus</i> -Agglutinin	Boehringer, Mannheim
Bioprene TM Plus	Applied Biosystems
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Concanavalin A	Boehringer, Mannheim
Coomassie BB R250	Serva, Heidelberg
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Sigma, Deisenhofen
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
EDTA	Boehringer, Mannheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
Erdnuß-Agglutinin	Boehringer, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylacetat s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff, Merck	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N-Methylpiperidin in H ₂ O/MeOH	Applied Biosystems, Weiterstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
3 M Natriumacetat-Puffer pH 3.8 s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
3 M Natriumacetat-Puffer pH 4.6 s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt

Natriumazid	Merck, Darmstadt
N-Acetyltryptophanamid	Sigma, München
PITC (5% in n-Heptan) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
PTH-Standard (in Acetonitril) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TMED	Serva, Heidelberg
Trifluoressigsäure (TFA) p.a.	Merck, Darmstadt
TFA (mit 0.002 % DTT) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
TFA (25% in Wasser mit 0.01% DTT) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
THF (5% in Wasser) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
TMA (12% in Wasser) s.g.	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Veronalpuffer	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
4-Vinylpyridin	Sigma, München

5.1.2 Enzyme und Proteine

Endoproteinase Asp-N	Boehringer, Mannheim
Chymotrypsin	Boehringer, Mannheim
Bromcyanid	Sigma, Deisenhofen
KLH	Biosyn, Fellbach
KLH2-c	Universität Mainz
<i>Homarus americanus</i> Hämoyanin	Universität Padova (Italien)
<i>Maia squinado</i> -Hämocyamin	Universität Padova (Italien)
Lactoglobulin	Applied Biosystems, Weiterstadt
Carboanhydrase	Sigma, Deisenhofen
β -Galaktosidase	Sigma, Deisenhofen
Myosin	Sigma, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen
Phosphorylase B	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen

5.1.3 Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche Servapor	Serva, Heidelberg
Nitrocellulosemembranen	Sartorius, Göttingen

5.1.4 Geräte

5.1.4.1 Gelchromatographie

Sephadex G-25	Pharmacia, Freiburg
Multirac 2111	LKB, Bromma (Schweden)
Uvicord SII 2238	LKB, Bromma (Schweden)
2-Channel Recorder 2210	LKB, Bromma (Schweden)
Microperpex Peristaltic Pump [®] 2132	LKB, Bromma (Schweden)

5.1.4.2 Polyacrylgelelektrophorese

Power Pack 35/75	Phase, Deeside, Clwyd (Großbritannien)
------------------	--

5.1.4.3 HPLC/FPLC

Konstantflußpumpe BT 8100	Biotronik, Maintal
UV/Vis-Detektor BT 8200	Biotronik, Maintal
Niederdruckgradientenmischer	Knauer, Berlin
Rheodyne 7125, 6-Weg	Rheodyne, Berkley (USA)
Integrator C-R6A Chromatopac	Shimadzu, Duisburg
Nucleosil 7C ₁₈ (250×10 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Mono-Q-HR 10/10 (100×3.6 mm)	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
POROS HQ/M	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden
Aquapore RP-300 (30×2.1 mm)	Applied Biosystems, Weiterstadt

5.1.4.4 Gefriertrocknung

LOC-1-Lyophilisator	Christ, Osterode/Harz
---------------------	-----------------------

5.1.4.5 Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie

Kratos Kompact MALDI I	Shimadzu Europe, Duisburg
Voyager	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden

5.1.4.5 Sequenzanalyse

473A Protein Sequencing System	Applied Biosystems, Weiterstadt
PTH C-18, 5 μ (2.1 \times 220 mm)	Applied Biosystems, Weiterstadt

5.1.4.6 Zirkulardichroismus

Jasco J-720 Dichrograph	Jasco Deutschland, Groß-Umstadt
Thermostat RTE-110	Neslab, Newington (USA)
Digitale Steuereinheit	Neslab, Newington (USA)
IBM PC-AT PS/2	IBM, New York (USA)
Multiscan CMS-3436	Miro Computer Products AG, Braunschweig
Desk-Jet 820 Cxi Professional Series	Hewlett-Packard, Palo Alto (USA)

5.1.4.7 UV-Spektroskopie

Uvicon 930	Kontron Instruments, Eching
------------	-----------------------------

5.1.4.8 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektrometer LS 50	Perkin Elmer, Überlingen
-------------------------------	--------------------------

5.1.4.9 Elektronenmikroskopie

Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop	Philips, Eindhoven (Niederlande)
--	----------------------------------

5.1.4.10 Sonstige Geräte

Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Digital pH-Meter 646	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer Combimag Rct	IKA Labortechnik, Staufen

Lyophilisationsanlage	Leybod-Heraeus, Stuttgart
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
Zentrifuge ECONOSPIN	Sorvall Instruments DuPont, Düsseldorf

5.2 Methoden

5.2.1 Isolierung von KLH2-c aus nativem Hämocyanin

KLH wurde aus der Hämolymphe von *Megathura crenulata* isoliert und wie bei Gebauer *et. al.* [128] beschrieben in die Untereinheiten dissoziiert. 6 mL der isolierten Strukturellen Untereinheit KLH2 wurden 24 h gegen 300 mL Glycin (pH 9.6) dialysiert, wobei der Puffer dreimal ausgetauscht wurde. Nach Abschluß der Dialyse lag das Protein in einer Konzentration von $4.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 12 mL Flüssigkeit vor. Jeweils 1 mL dieser Lösung wurde mit 10 μL Trypsinlösung ($10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) versetzt, was einem Substrat-Enzym-Verhältnis von 2% entsprach, und 5 h bei 37°C inkubiert. Aus 10 Verdauansätzen wurden jeweils 20 μL Lösung entnommen und vereinigt. Das Fragmentgemisch wurde mittels HPLC über eine Q-Sepharose-HP-Säule innerhalb von 200 min mit einem Gradienten von 0% bis 50% Puffer B bei einer Fließgeschwindigkeit von $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ getrennt. Als Puffer A wurde 0.04 M Tris-HCl (pH 8.0) als Puffer B 0.04 M Tris-HCl mit 1 M NaCl (pH 8) verwendet. Die KLH2-c enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Über eine Umkehrphasen-HPLC mit einer Nucleosil 7C₁₈-Säule (250×10 mm) wurde die KLH2-c-Fraktion aufgereinigt. Das Puffersystem bestand aus einem Puffer A (0.16% TFA in Wasser) und einem Puffer B (80% Acetonitril in A) und wurde mit folgendem Gradienten gefahren: nach 2 min bei 20% Puffer B wurde die Konzentration von B innerhalb von 48 min auf 80% erhöht. Die Fließgeschwindigkeit betrug $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ und die Absorption des Eluates wurde bei 214 nm gemessen. Die isolierte Funktionelle Einheit KLH2-c wurde mittels SDS-PAGE (Abb. 61) gekreuzter Immunelektrophorese (Abb. 62), N-terminaler Ansequenzierung und MALDI-MS identifiziert und auf ihre Reinheit geprüft.

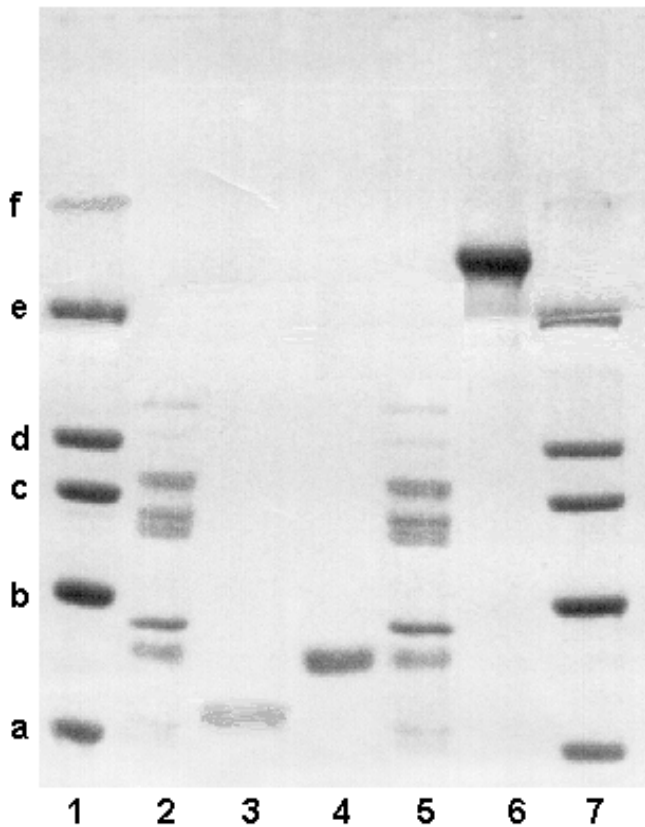


Abb. 61. SDS-PAGE zur Identifizierung von KLH2-c. Banden 1 und 7: Standardproteine: a) Carboanhydrase ($M_r = 29$ kDa) b) Ovalbumin ($M_r = 45$ kDa) c) Rinderserumalbumin ($M_r = 66$ kDa) d) Phosphorylase B ($M_r = 97$ kDa) e) β -Galaktosidase ($M_r = 116$ kDa) f) Myosin ($M_r = 205$ kDa); Banden 2 und 5: Fragmentgemisch der tryptischen Spaltung von KLH2; Bande 3: KLH2-b; Bande 4: KLH2-c; Bande 6: natives KLH. Bedingungen: Gel 7.5%; Proteinkonzentration: 3 - 6 μ g.

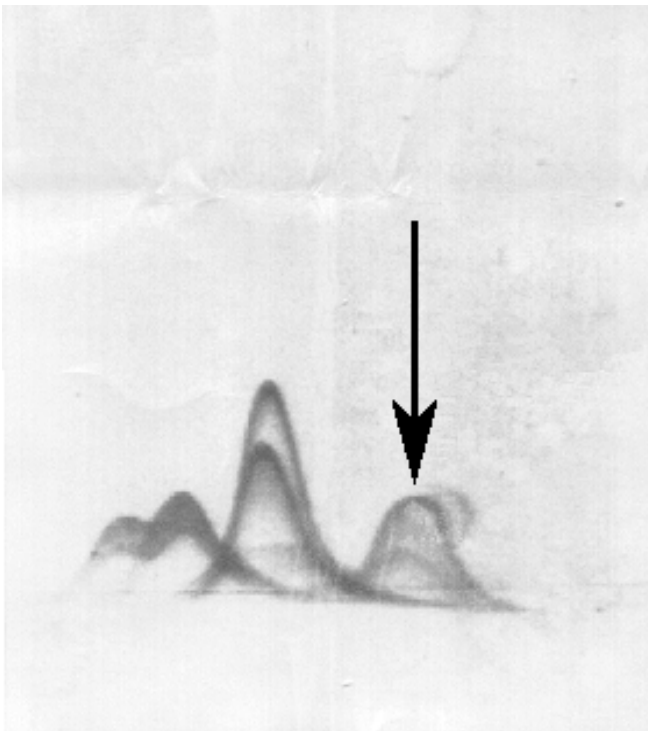


Abb. 62. Gekreuzte Immunelektrophorese des aus dem tryptischen Verdau von KLH2 erhaltenen Fragmentgemisches gegen Anti-KLH2. Der Pfeil kennzeichnet die Bande von KLH2-c. Gel: 1% Agarose M in Veronalpuffer; Proteinkonzentration: 6 μ g.

5.2.2 Isolierung von KLH2 aus IMMUCOTHEL®

Die Immucothel-Proben (Biosyn, Fellbach) enthielten KLH in einer Konzentration von $6.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Tris-HCl-Puffer (pH 7.4). 6 mL Lösung wurden 24 h gegen eine Pufferlösung aus 0.1 M Tris-HCl, (pH 6.5) mit 1 mM CaCl_2 und 0.5 mM MgCl_2 dialysiert und in Portionen von je 50 μL (ca. $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein) auf eine POROS HQ/M-Anionentauschersäule ($3.6\times 100 \text{ mm}$) aufgetragen. Dialysepuffer wurde als Puffer A und 1 M NaCl in A als Puffer B verwendet. Bei einer Fließgeschwindigkeit von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde die Konzentration von Puffer B nach 10 min bei 0% innerhalb von 70 min auf 100% erhöht. Die Absorption des Eluates wurde bei 214 nm detektiert.

5.2.3 Isolierung der Strukturellen Untereinheiten des Hämocyanins von *Homarus americanus*

Das Hämocyanin von *Homarus americanus* wurde von Prof. Dr. B. Salvato (Universität Padua) zur Verfügung gestellt. Zur Dissoziation in die Untereinheiten wurden 8 mL natives Hämocyanin (ca. $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) über Nacht gegen einen Puffer aus 0.1 M NaHCO_3 und 20 mM EDTA (pH 10), und anschließend weitere 24 h gegen den selben Puffer, der nun zusätzlich 2 M Harnstoff enthielt, dialysiert. Das dissoziierte Material wurde aufgereinigt, indem es über eine DEAE-Sepharose-Cl-6B-Säule ($3.0\times 100 \text{ cm}$) mit einem linearen Gradienten aus Dissoziationspuffer und 0 - 0.4 M NaCl eluiert wurde. Die größte Fraktion wurde nach dem Entsalzen über FPLC mit einer Mono-Q HR 10/10- Säule weiter aufgetrennt. Mit einer Flußrate von $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde Puffer B 10 min lang bei 0% belassen und dann innerhalb von 70 min auf 100% erhöht. Als Puffer A wurde der Dissoziationspuffer (0.1 M NaHCO_3 , 20 mM EDTA, pH 10 mit 2 M Harnstoff), als Puffer B der mit 1 M NaCl versetzte Puffer A verwendet. Für die Sequenzanalyse wurde ein Teil der aus dieser Trennung erhaltenen Fraktionen abschließend mittels HPLC über eine RP Nucleosil 7 C_{18} -Säule aufgereinigt. Als Puffer wurden 0.1% TFA in Wasser (Puffer A) und 0.085% TFA, 80% Acetonitril, 20% Wasser (Puffer B) verwendet. Die Probe wurde mit einem Gradienten von 10% Puffer B für 10 min und anschließender Erhöhung auf 100% B in 70 min und einer Fließgeschwindigkeit von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eluiert.

5.2.4 Isolierung und Aufreinigung der Strukturellen Untereinheiten des Hämocyanins von *Maia squinado*

Das nach Ricchelli *et al.* [150] aus der Hämolymphe isolierte und bei -20°C in einer 18% Sucroslösung gelagerte Hämocyanin wurde freundlicherweise von Prof. Dr. B. Salvato (Universität Padua) zur Verfügung gestellt. Zur Dissoziation in die Untereinheiten wurden 10 mL natives Hämocyanin (ca. $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) über 24 h gegen einen Puffer aus 0.1 M Natriumhydrogencarbonat (pH 10), der 20 mM EDTA und 2 M Harnstoff enthielt, dialysiert. Das Dialysat wurde über eine Ionenaustauscher-MonoQ HR 10/10-Säule mittels FPLC getrennt. Als Eluent A wurde der Dialysepuffer, als Eluent B der mit 1 M NaCl versetzte Puffer A verwendet. Das Protein wurde mit einem nichtlinearen Gradienten (10 min 0% Puffer B, in 10 min von 0 - 30% Puffer B, in 50 min von 30 - 100% Puffer B) mit einer Fließgeschwindigkeit von $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eluiert. Zur Reinheitskontrolle wurde ein Teil der Fraktionen mittels HPLC über eine Nucleosil 7 RP C_{18} -Säule eluiert (Puffer A: 0.1% TFA in H_2O , Puffer B: 0.17% TFA, 80% Acetonitril in H_2O). Bei einer Fließgeschwindigkeit von $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde die Ausgangskonzentration von 10 % Puffer B über 10 min gehalten und dann innerhalb von 70 min auf 100% Puffer B erhöht. Die durch die HPLC-Trennung erhaltenen Fraktionen wurden zur Sequenzanalyse verwendet.

5.2.5 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von apo-Hämocyanin

Zur Darstellung des apo-Hämocyanins wurde das native Protein 48 h lang bei 4°C gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), der 20 mM EDTA und 20 mM KCN enthielt, dialysiert. Die vollständige Entfernung der Kupferatome aus dem Protein wurde spektrophotometrisch durch Vermessen des Absorptionsverhältnisses der Banden bei 340 und 278 nm überprüft. Als Maß für die vollständig oxygenierte Form wurde ein Verhältnis von $A_{340}/A_{278} = 0.21$ angenommen.

5.2.6 Enzymatische und chemische Spaltungen von KLH2-c

5.2.6.1 Spaltung mit Endoproteinase Lys-C

Die Spaltung mit Endoproteinase Lys-C (schneidet C-terminal an Lysinresten) wurde in einem Puffer aus 0.025 M Tris-HCl (pH 8.3) mit 0.001 M EDTA und 1 M Harnstoff durchgeführt. Das Verhältnis Enzym:Substrat betrug 1:250 (w/w). 3.65 mg Protein wurden in 3500 μL Verdaupuffer

gelöst und 24 h bei 37°C inkubiert. Insgesamt 150 µL Lys-C (7.5 µg) wurden in drei Portionen zu je 50 µL am Beginn, nach 8 h und nach 16 h hinzugefügt. Nach beendeter Inkubation wurde der pH-Wert auf 4.8 gesenkt und ausfallendes Peptid abzentrifugiert (8 min bei 3200 U·min⁻¹). Die Probe wurde lyophilisiert und bei -20°C eingefroren.

5.2.6.2 Chymotrypischer Verdau

Die Spaltung mit Chymotrypsin wurde in einem Puffer aus 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 9) und 2 M Harnstoff mit einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:20 vorgenommen. Zu 2.4 mg in 2.2 mL Verdaupuffer gelöstem Protein wurden 120 µg, in 1 mM HCl gelöstes Chymotrypsin hinzugefügt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Verdaulösung wurde lyophilisiert und bei -20°C eingefroren.

5.2.6.3 Umsetzung mit Bromcyan

1.5 mg Protein wurden in 100µl 70%iger Ameisensäure gelöst, mit 50 mg Bromcyan in 500 µL TFA versetzt und unter Stickstoffatmosphäre 24 h im Dunkeln inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe des zehnfachen Volumens H₂O abgebrochen und 10 min bei 3200 U·min⁻¹ zentrifugiert, um ausgefallene Substanz abzutrennen. Anschließend wurde die Probe lyophilisiert und bei -20°C eingefroren.

5.2.6.4 Umkehrphasen-HPLC mit UV-Detektion

Die Spaltungsfractionen werden über eine Nucleosil 7C₁₈-Säule (250×10 mm) eluiert. Das Puffersystem bestand aus Puffer A: 0.16% TFA in Wasser und Puffer B: 80% Acetonitril in Puffer A. Der Endo-Lys-C- und der chymotryptische Verdau wurden mit einem Gradientenprogramm von 5 min 0% B und von 0 bis 100% B in 110 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 1.2 mL·min⁻¹ eluiert. Für die Trennung eines weiteren Aliquots des Lys-C-Verdaus wurde der Gradient verkürzt und nach 5 min bei 0% B innerhalb von 65 min auf 100% B erhöht und weitere 10 min bei 100% B belassen. Puffer B bestand aus 60% Acetonitril in Puffer A. Im Falle der Bromcyan-Umsetzung wurde 10 min bei einer Konzentration von 10% B eluiert. Anschließend wurde die Konzentration von Puffer B innerhalb von 100 min von 10% auf 100% erhöht. Die Flußrate betrug hier

1.0 mL·min⁻¹. Bei allen HPLC-Läufen erfolgte die Detektion im Durchflußphotometer bei 214 nm. Mit 4-Vinylpyridin umgesetzte Proben wurden über eine Umkehrphasensäule AquaporeTM RP-300 (30 × 2.1 mm) entsalzt. Als Puffer A wurde 0.1% TFA in Wasser, als Puffer B 80% Acetonitril/0.085% TFA in Wasser eingesetzt.

5.2.7 Kohlenhydratanalyse von KLH2-c

Die KLH-Untereinheiten wurden mit Trypsin in ihre Funktionellen Einheiten gespalten [131, 140], mittels SDS-PAGE (10% Polyacrylamid) getrennt und nach der Methode von Kyhse-Andersen [162] elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit 1% (w/v) in Puffer A (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) gelöstem Rinderserumalbumin blockiert. Nachdem die Membranen zweimal mit Puffer A und einmal mit Puffer B (Puffer A mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM MnCl₂, pH 7.5) gewaschen worden waren, wurden sie 2 h bei Raumtemperatur mit folgenden digoxigeninen Lektinen behandelt: Concanavalin A (1/100 verdünnt in Puffer B), Erdnuß-Agglutinin (1/100 verdünnt in Puffer B) und *Amarantus caudatus*-Agglutinin (1/500 verdünnt in Puffer B). Nach weiterem dreimaligen Waschen mit Puffer A wurden die Membranen 1 h bei Raumtemperatur mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten und alkalischer Phosphatase (1/1000 verdünnt in Puffer A) inkubiert und anschließend erneut dreimal mit Puffer A gewaschen. Die Proteine wurden in Puffer C (100 mM Tris, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9.5) einige Minuten mit einer Mischung aus NitroBlueTetrazolium (0.33 mg·mL⁻¹) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat (0.16 mg·mL⁻¹) angefärbt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Spülen der Membranen mit destilliertem Wasser gestoppt.

5.2.8 Allgemeine Vorschrift für die Reduktion und die S-Pyridylethylierung von Cystein-Resten

Das zu modifizierende Protein wurde in einem Puffer aus 0.25 M Tris·HCl (pH 8.5) mit 6 M Guanidinhydrochlorid und 1 mM EDTA gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine Lösung von frisch vorbereitetem 10%igem β-Mercaptoethanol (v/v in Wasser), was einem 100-fachen Überschuß bezogen auf die Zahl der Cysteinreste entspricht, zugefügt und bei Raumtemperatur 2 h im Dunkeln inkubiert. 4-Vinylpyridin wurde in einem 100-fachen Überschuß in Bezug auf die Zahl der Cysteinreste hinzugefügt und 2 h im Dunkeln stehen gelassen. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung zur Entsatzung über eine Aquapore RP-300-Säule mit einem Gradienten-

programm von 5 min 100% A, einem anschließenden linearen Gradienten von 0 auf 100% B innerhalb von 10 min und einer 15 minütigen Elutionsphase bei 100% B mit einer Fließgeschwindigkeit von $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ eluiert. Die Detektion erfolgte bei 214 nm [163].

5.2.9 Polycrylamidelektrophorese (PAGE)

5.2.9.1 Zur Herstellung der Elektrophoresegele verwendete Reagenzlösungen

Lösung A: 1 M Tris, pH 8.8

Lösung B: 1 M Tris, pH 6.8

Lösung C: 30% Acrylamid, 0.8% Methylenacrylamid in 100 mL dest. H₂O

Lösung E: 10% SDS in dest. H₂O

Lösung F: 1.51g Tris; 20 mL Glycin, 4 g SDS in 100 mL dest H₂O, pH 6.8, für reduzierende Bedingungen 1 mM DTT.

5.2.9.2 Trennungsgel 7.5% (SDS-PAGE)

2.8 mL Lösung A, 1.9 mL Lösung C, 0.075 mL Lösung E, 2.8 mL H₂O dest., 0.005 mL TMED, 0.05 mL frisch bereitetes (NH₄)₂S₂O₈ (10 mg in 500 μL H₂O) wurden in einer Saugflasche vermischt und an der Wasserstrahlpumpe 5 min lang entgast. Für PAG-Elektrophoresen unter nativen Bedingungen wird die Gelmischung ohne Zugabe von Lösung E angesetzt.

5.2.9.3 Trennungsgel 10% (SDS-PAGE)

2.8 mL Lösung A, 2.5 mL Lösung C, 0.075 mL Lösung E, 2.15 mL H₂O dest., 0.005 mL TMED, 0.05 mL frisch bereitetes (NH₄)₂S₂O₈ (10 mg in 500 μL H₂O) wurden in einer Saugflasche vermischt und an der Wasserstrahlpumpe 5 min lang entgast. Für PAG-Elektrophoresen unter nativen Bedingungen wird die Gelmischung ohne Zugabe von Lösung E angesetzt.

5.2.9.4 Stapelgel 5% (SDS-PAGE)

0.625 mL Lösung B, 0.85 mL Lösung C, 0.05 mL Lösung E wurden in einer Saugflasche mit 3.65 mL H₂O, 0.005 mL TEMED und 0.05 mL einer frisch bereiteten (NH₄)₂S₂O₄-Lösung

vermischt und an der Wasserstrahlpumpe 5 min lang entgast. Für Elektrophoresen unter nativen Bedingungen wurde keine Lösung E zugesetzt.

5.2.9.5 Denaturierungspuffer

Bevor die Proteinproben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit einem Denaturierungspuffer aus 3.2 mL 0,25 M Tris·HCl, pH 6.8, 1.0 mL SDS-Lösung (20 g in 100 mL H₂O), 0.02 mL Mercaptoethanol oder DTT, 0.05 mL 2% Bromphenolblau in H₂O und 100 mg Saccharose behandelt. Nichtreduzierender Puffer wurde ohne die Zugabe von Mercaptoethanol oder DTT angesetzt.

5.2.9.6 Lösung zum Anfärben des Gels

Aus 2.5 mg Coomassie BB R250, 450 mL Methanol, 100 mL Essigsäure und 450 mL H₂O wurde eine Lösung bereitet, mit der die Proben auf dem Gel markiert wurden.

5.2.9.7 Lösung zum Entfärben des Gels, Fixierlösung

50 mL Methanol und 75 mL Essigsäure wurden mit 1000 mL dest. H₂O vermischt. Um eine optimale Entfärbung zu erreichen, wurde die Fixierlösung während des Entfärbungsprozesses mehrmals ausgetauscht.

5.2.9.8 Agarose-Gel für die Immunelektrophorese

Aus 500 mL destilliertem Wasser, 10.3 g Natriumbarbiturat und 0.20 g Diethylbarbitursäure wurde eine Stammlösung angesetzt. Zur weiteren Verwendung wurde diese Stammlösung auf 2.5 L verdünnt. Für die Immunelektrophorese wurde mit der verdünnten Lösung und Agarose M ein 1%iges Gel hergestellt.

5.2.10 Massenspektrometrie

Für die Vermessung der Proben wurde ein Shimadzu Kratos Kompact MALDI-Spektrometer verwendet. Die zu vermessenden Proben wurden in 50 bis 60 µL 0.1% TFA gelöst, was zu einer Probenkonzentration zwischen 10⁻⁶ und 10⁻⁴ M führt. Als Matrix wurden 10 mg α-Cyano-4-

hydroxyzimtsäure in einer Lösung von 1 mL 0.1% TFA in 70% Acetonitril verwendet. Für das sogenannte "Sandwich-Verfahren" wurden auf einen Probenträger zuerst 0.2 bis 0.3 μL Matrix aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurden 0.3 μL Probenlösung aufgetragen, die getrocknet und von einer weiteren Matrixschicht bedeckt wurden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 337 nm mit einem fokussierten Laserstrahl mit einer Energiedichte von 10^6 bis 10^8 W/cm^2 und einer um 30 bis 60% verminderten Intensität des Laserstrahls, sowie einer Beschleunigungsspannung von 20 keV. Mehrere Laser-"Pulse" unter gleichen Bedingungen wurden akkumuliert. Zur Kalibrierung der Massenskala wurde Human Substance P ($M = 1347.7$ Da) und Rinderinsulin ($M = 5733.6$ Da) verwendet. Auch die von der Matrix generierten Massenpeaks können als Standard herangezogen werden.

Die Massenbestimmung des nativen KLH2-*c* wurde mit einem MALDI-Spektrometer des Typs "Voyager" der Firma PerSeptive durchgeführt. Eine Probe von ca. 50 pM wurde in 0,1% TFA (v/v) gelöst, gegen Wasser dialysiert und in einer Matrix von α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure vermessen. Als externe Standards wurde Hühnereialbumin ($M_r = 44400$ Da) und Rinderserumalbumin ($M_r = 66430$ Da) verwendet.

5.2.11 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalysen wurden mit einem Protein-Sequenator 473A (Liquid-pulsed-Sequenator) der Firma Applied Biosystems mit automatischem Edman-Abbau durchgeführt. Die lyophilisierten Proben wurden in 30 bis 60 μL 0,1% TFA/ H_2O gelöst, auf einen mit BioPreneTMPlus vorbehandelten, und mit 1 bis 3 Edman-Abbauzyklen von Verunreinigungen befreiten Filter aufgetragen und mit Stickstoff getrocknet. Die Temperatur der Reaktionszelle betrug 45°C , die des Umwandlungsgefäßes 60°C . Trennung und Analyse der PTH-Aminosäuren erfolgte über eine auf 55°C thermostatisierte RP- C_{18} -HPLC-Säule ($5\mu\text{m}$, 220×2.1 mm) mit UV-Detektion bei 269 nm. Die Proben wurden in 27 min mit einem linearen Gradienten von 12% auf 39% Puffer B und einer Fließgeschwindigkeit von $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eluiert. Als Puffer A wurde eine Lösung aus 9,0 mL Natriumacetat (pH 3.8) und 2,1 mL Natriumacetat (pH 4.6) in 1000 mL 5% THF/Wasser, als Puffer B Acetonitril verwendet. Die Funktionstüchtigkeit des Gerätes wurde mit β -Lactoglobulin als Standard überprüft.

5.2.12 Zirkulardichroismus

5.2.12.1 KLH, KLH1, KLH2

Das aufgereinigte Protein ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde in einem Puffer aus 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), der 10 mM CaCl_2 enthielt, gelöst und der Zirkulardichroismus gemessen. Die Konzentration des Proteins wurde bei 278 nm spektrophotometrisch unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{278} = 1.42 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bestimmt, wobei pro Struktureller Untereinheit ein durchschnittliches Molekulargewicht von 50 kDa angenommen wurde.

5.2.12.2 KLH2-c

Das über HPL-Anionenaustauschchromatographie isolierte KLH2-c (ungefähr $0.22 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Natriumdihydrogenphosphat (pH 7.0) dialysiert. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur mit 2%igem β -Mercaptoethanol behandelt.

5.2.12.3 *Homarus americanus* und *Maja squinado*

Das aufgereinigte Protein (0.2 bzw. $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde in einem Puffer aus 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), gelöst und der Zirkulardichroismus gemessen. Die Konzentration wurde UV-spektrometrisch unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{278} = 1.34 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei 278 nm bestimmt. Zur Bestimmung der molaren Konzentration wurde pro Struktureller Untereinheit eine Molekülmasse von 75 kDa zugrundegelegt.

5.2.12.4 Messungen zur Temperaturstabilität

Für die temperaturabhängigen Messungen (25°C - 95°C) wurden die Proben (je nach verwendetem Protein zwischen 0.2 und $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) für jeweils 10 min bei der eingestellten Temperatur equilibriert. Zur Feststellung der thermisch bedingten Entfaltung der Proteine wurden die Werte der Elliptizität des Minimums bei 222 nm als Funktion der Temperatur aufgetragen und der Wendepunkt der erhaltenen Kurven bestimmt.

5.2.12.5 Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid

Die Entfaltung von KLH, seiner Untereinheiten KLH1 und KLH2, sowie der Strukturellen Untereinheiten von *Homarus americanus* und *Maja squinado* unter dem Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorid wurden anhand der Änderung des Wertes der Elliptizität bei 222 nm bestimmt. Die Proben (0.2 mg·mL⁻¹) wurden in einem Puffer aus 0.05 M Tris·HCl (pH 8,0), der 10 mM CaCl₂ enthielt, gelöst. Die Freie Energie $\Delta G_D^{H_2O}$ wurde über die Gleichung

$$\Delta G_D^{H_2O} = - RT \ln K \quad (9)$$

mit $K = ([\Theta]_{\text{beob}} - [\Theta]_N) / ([\Theta]_D - [\Theta]_{\text{beob}})$, berechnet, wobei $[\Theta]_N$ die Elliptizität des gefalteten Proteins, $[\Theta]_D$ die Elliptizität des vollständig entfalteten Proteins und $[\Theta]_{\text{beob}}$ die Elliptizität des Proteins bei den verschiedenen Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorid bezeichnet [164].

5.2.12.6 Sekundärstrukturberechnungen

Jedes für die Berechnung der Sekundärstrukturen verwendete Spektrum stellt einen Mittelwert aus drei Messungen dar. Die Spektren wurden in einem Bereich von 195 bis 250 nm in 0.2 nm-Intervallen, einer Bandweite von 0.5 nm und einer Integrationszeit von 4 s aufgenommen. Gegen die Wellenlänge ist die Molare Elliptizität $[\Theta]$ (deg·cm²·dmol⁻¹) aufgetragen, für deren Berechnung für KLH2-c pro Aminosäure eine durchschnittliche Molekülmasse von 110 g·mol⁻¹ angenommen wurde. Die Berechnungen der Sekundärstrukturen folgten der Methode von Yang *et al.* [148]. Zusätzlich wurden Vorhersagen der Sekundärstruktur nach den Methoden von Chou und Fasman [135] und Garnier-Osborne-Robson [136] durchgeführt.

5.2.13 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm durchgeführt. Die ausgestrahlte Lichtintensität wurde über eine Periode von 1 s integriert und in einem Wellenlängenbereich zwischen 295 und 450 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden unter Anwendung folgender Gleichung bestimmt [165]:

$$Q_x = Q_{st} (F_x \cdot A_x^{-1}) (A_{st} \cdot F_{st}^{-1}). \quad (10)$$

Die mit dem Index x bezeichneten Größen Q (Quantenausbeute), F (Strahlungsintensität bei einer bestimmten Wellenlänge λ) und A (Absorption der Anregungswellenlänge) repräsentieren die Werte des untersuchten Proteins, die mit dem Index st bezeichneten Größen stellen die selben Parameter für die Standardsubstanz dar. Das als Standard eingesetzte N-Acetyltryptophanamid besitzt eine Quantenausbeute von 0.13 [166].

Der Wirkungsgrad e des Tyrosin-Tryptophan-Energieüberganges wurde unter Verwendung der folgenden Beziehung berechnet [167]:

$$Q = Q_{Trp}[f_{Trp}(\lambda) + e f_{Tyr}(\lambda)] \quad (11)$$

Q steht für die Fluoreszenzquantenausbeute der Proteinprobe bei der Anregungswellenlänge, Q_{Trp} für die Quantenausbeute der Tryptophylreste des Proteins nach Anregung bei 295 nm, $f_{Trp}(\lambda)$ und $f_{Tyr}(\lambda)$ repräsentieren die jeweiligen Absorptionen von Tryptophan und Tyrosin bei der Anregungswellenlänge λ und wurden aus dem molaren Verhältnis der beiden Aminosäuren im Protein berechnet.

5.2.13.1 Fluoreszenzpolarisation

Für die Messungen zur zeitaufgelösten Fluoreszenzpolarisation wurde ein Nanosekunden Photonen-zähler-Spektrofluorimeter und eine Stickstoffblitzlampe mit 'full width at half-maximum' (FWHM) bei 2.5 ns verwendet. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die Daten wurden durch Zusammenfassung der instrumentellen Antwortfunktion $Y(t')$ mit einer angenommenen Zerfallsfunktion $P(t)$ analysiert:

$$R_c(t) = \int_0^t Y(t')P(t - t') dt' \quad (12)$$

Die erhaltenen Werte von $R_c(t)$ wurden mit der experimentellen Zeitabhängigkeit $R_m(t)$ verglichen. Die Genauigkeit bei der Bestimmung der Lebensdauer des angeregten Zustandes betrug ± 0.2 ns. Die Zerfallskurven enthalten 10^4 Pulse im Maximum. Das Zeitintervall für diese Kurven betrug 100 ps pro Kanal.

Die theoretische Fluoreszenzintensität zur Zeit t wird durch die Funktion

$$P(t) = A_1 \cdot e^{-(t/\tau_1)^{-1}} + A_2 \cdot e^{-(t/\tau_2)^{-1}} \quad (13)$$

gegeben, mit A_1 und A_2 als den jeweiligen Amplituden. Mit dieser Funktion kann die Lebensdauer der angeregten Zustände bestimmt werden.

5.2.13.2 Messungen zur Temperaturstabilität

Für die temperaturabhängigen Messungen (25°C - 95°C) wurden die Proben für jeweils 10 min bei der eingestellten Temperatur equilibriert. Die Ergebnisse wurden gemäß der Arrheniusgleichung analysiert:

$$\ln(Q^{-1}-1) = -E_a(RT + \ln k)^{-1} \quad (14)$$

in der Q die Ausbeute der emittierten Quanten, E_a [kJ·mol⁻¹] die Aktivierungsenergie der strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Singlettzustandes, R die Allgemeine Gaskonstante und k die Reaktionsgeschwindigkeit darstellen.

5.2.13.3 Fluoreszenzlöschungsexperimente

Die Ergebnisse der Auslöschungsreaktion zwischen den angeregten Tryptophylseitenketten und Acrylamid wurden gemäß dem Gesetz von Stern und Volmer [168] analysiert:

$$F_0 \cdot F^{-1} = 1 + K_{SV} \cdot c_Q \quad (15)$$

F_0 und F sind hierin die Fluoreszenzintensitäten bei einer geeigneten Wellenlänge ohne und mit Löschermolekülen, K_{SV} ist die Löschungskonstante und c_Q die Konzentration der Löschersubstanz. Die durch das Acrylamid verursachten inneren Filtereffekte wurden mittels des Faktors $Y = \text{antilog}(\text{Abs}_{\text{exc}} + \text{Abs}_{\text{emiss}}) \cdot 2^{-1}$ mit Abs_{exc} als der Absorption bei der Anregungs- bzw $\text{Abs}_{\text{emiss}}$ als der Absorption bei der Strahlungswellenlänge, korrigiert.

Aus dem Verhältnis $K_{SV}^- \cdot K_{SV}^{+1}$ der aus Fluoreszenzlöschungsexperimenten mit ionischen Löscher-molekülen erhaltenen Löschungskonstanten K_{SV}^- und K_{SV}^+ wurde der Elektrostatische Parameter E berechnet, mittels dessen sich Aussagen über die Mikroumgebung von Fluorophoren treffen lassen. Werte unter 2.6 indizieren eine negativ geladene, Werte zwischen 4.4 und 5.2 stehen für eine neutrale und Werte größer als 6.6 verweisen auf eine positiv geladene Umgebung.

5.2.14 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopaufnahmen wurden 2 μL des gereinigten *Homarus*-Hämocyanins mit einem Puffer aus 10 mM Tris·HCl (pH 7.0), der 10 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 enthielt, auf eine Konzentration von $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ verdünnt. Das Proteinmaterial wurde auf beglimmte, hydrophile, mit Pioloform beschichtete Trägerfilm aufgebracht und mit einer Lösung aus 1% wässrigem Uranylacetat negativ kontrastiert.

VI. Zusammenfassung

Seit der ersten Beschreibung des kupferhaltigen Atmungsproteins Hämocyanin durch Frederiq gewann diese Substanz immer größere Bedeutung. Die Feststellung, daß Hämocyanine hauptsächlich bei zwei Gattungen des Tierreiches, den Arthropoden und den Mollusken als Blutfarbstoff nachgewiesen wurden, war vor allem für die Zoologen zur Erstellung phylogenetischer Zusammenhänge von Interesse. Durch vielfältige Untersuchungen hat man heute genauere Vorstellungen zur Quartär- und Tertiärstruktur der Hämocyanine. Nur in einigen Fällen kennt man die Primärstruktur dieser Riesenmoleküle. Am weitesten fortgeschritten sind die Erkenntnisse über die Arthropodenhämocyanine, die sich aus Strukturellen Untereinheiten mit durchschnittlich 650 Aminosäureresten zusammensetzen. Jede SU besitzt zwei Kupferionen in einem Aktivzentrum.

Die Hämocyanine der Mollusken setzen sich aus 7 oder 8 globulären Funktionellen Einheiten mit je einem Paar Kupferionen im Aktivzentrum zusammen. Diese FE sind durch kurze Linkerregionen miteinander verknüpft und bilden Proteinketten mit einem Molekulargewicht von 350 bis 450 kDa. Das Hämocyanin der Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke *Megathura crenulata* (KLH) wurde zur Überprüfung des Immunstatus von Patienten mit Harnblasenkarzinom eingesetzt. Die Feststellung, daß die behandelten Patienten eine bis zu 80% niedrigere Rezidivrate aufwiesen als nicht behandelte, rückte die Hämocyanine in das Blickfeld der pharmazeutischen Industrie. KLH wird seit langem als Haptenträger zur spezifischen Antikörperbildung gegen niedermolekulare Antigene genutzt. Genaue Vorstellungen zu den Mechanismen, die für die starke Antikörperbildung eine Rolle spielen, können auf molekularer Basis erst durch Kenntnis von Primär- und Raumstruktur der Protein- und Kohlenhydratseitenketten erhalten werden. Mit dieser Kenntnis könnten dann kürzere Glykopeptidfragmente mit starker antigener Wirkung synthetisiert und pharmazeutisch eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Primärstruktur der Funktionellen Einheit "c" der Strukturellen Untereinheit KLH2 der Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke ermittelt. Gleichzeitig wurde damit zum ersten Mal die Aminosäuresequenz einer FE "c" eines Gastropodenhämocyanins bestimmt. Die Sequenz weist große Segmente streng konservierter Aminosäuren auf, die vor allem im Bereich der Bindungsstellen der Kupferionen lokalisiert sind. Im N- und C-Terminus wurden vielfältige Austausche von Aminosäuren gefunden. Bezogen auf streng konservierte Aminosäuren weist KLH2-c zur FE "c" des Cephalopoden *Octopus dofleini* eine

Homologie von 55% auf. Da beide FE von Hämocyaninen von Tieren unterschiedlicher Unterordnungen stammen, kann diese Übereinstimmung als Hinweis auf dieselbe strukturelle Funktion der Funktionellen Einheit "c" innerhalb des Gesamthämocyanins gewertet werden.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß sich KLH2-*c* durch eine ungewöhnliche Kohlenhydratstruktur von den anderen Funktionellen Einheiten des Hämocyanins unterscheidet. Bei den meisten bisher bekannten Funktionellen Einheiten von Arthropoden und Mollusken wurden *N*-Glykane gefunden. Bei KLH2-*c* konnten keine Verknüpfungsstellen für *N*-glykosidische Zuckerketten gefunden werden, Bindungsversuche mit verschiedenen Lektinen ergaben jedoch, daß KLH2-*c* *O*-glykosidisch verknüpfte Zuckerstrukturen enthält.

Die Strukturellen Untereinheiten KLH1 und KLH2 wurden mittels einer neuartigen Ionenaustauschersäule direkt aus Immucothel® isoliert. Sowohl das Gesamthämocyanin als auch KLH1 und KLH2 wurden auf ihre Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur und verschiedenen Konzentrationen an Guanidinhydrochlorid und Harnstoff untersucht. Das native Hämocyanin erwies sich hierbei als geringfügig stabiler als die einzeln vorliegenden Strukturellen Untereinheiten (SU), was darauf schließen läßt, daß Aggregationen der SU einen stabilisierenden Einfluß haben. Harnstoff und Guanidinhydrochlorid beeinflussen vor allem die α -helikalen Strukturen der Proteine. Fluoreszenzmessungen ergaben, daß zwischen 25% und 65% der Energie des von Tyrosin absorbierten Lichtes strahlungslos auf Tryptophan übertragen wird. Außerdem belegen die Versuche, daß die Tryptophanreste tief im Inneren der Proteinmatrix und in enger Nachbarschaft zu Tyrosinresten lokalisiert sind.

Die Hämocyanine der Arthropoden *Homarus americanus* und *Maja squinado* wurden in ihre Strukturellen Untereinheiten dissoziiert und deren Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien und bei erhöhter Temperatur untersucht. Beide Hämocyanine wiesen mit 80°C (*Homarus americanus*) und 72°C (*Maja squinado*) eine hohe Temperaturstabilität auf. Ähnlich hohe Denaturierungstemperaturen wurden bisher nur bei *Eurypelma californicum* festgestellt, einer Vogelspinnenart, deren Lebensraum sehr starken Temperaturschwankungen ausgesetzt ist.

Die Fluoreszenzmessungen führten auch bei diesen beiden Hämocyaninen zu dem Ergebnis, daß die vorhandenen Tryptophanreste in inneren Bereichen des Gesamtproteins lokalisiert sind. Nach Dissoziation der nativen Moleküle steigt die Fluoreszenzquantenausbeute stark an und Versuche mit ionischen Fluoreszenzlöschern ergaben, daß einige Tryptophanreste in den Berührungszonen zwischen den Strukturellen Untereinheiten liegen und nach der Dissoziation auf deren Oberfläche

exponiert sind. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Strukturellen Untereinheiten von *Homarus americanus* und *Maja squinado* N-terminal ansequenziert und mit den Strukturellen Untereinheiten anderer Arthropoden sowie untereinander verglichen. Sie weisen mit SU von Tieren der gleichen Gattung große Gemeinsamkeiten auf, sind aber auch untereinander sehr stark homolog. Es wurden innerhalb der ersten 20 Aminosäuren drei streng konservierte Bereiche gefunden. Die Diversifizierung der FU innerhalb dieses Bereiches wird durch Deletionen, Insertionen oder Austausch von Aminosäuren bewerkstelligt.

Die hier präsentierten Ergebnisse tragen mit dazu bei, den Aufbau und die Wirkungsweise von Hämocyaninen besser zu verstehen und die phylogenetische Entwicklung von Arthropoden und Mollusken zu beleuchten. Im Falle der Strukturaufklärung der Funktionellen Untereinheit KLH2-c ist diese Arbeit auch ein Beitrag zur Entwicklung neuartiger Vakzine und Immunmodulatoren auf dem Gebiet der Krebsforschung.

VII. Literatur

- [1] Fredericq, L. (1878) Sur l'hémocyanine, substance nouvelle du sang de Poulpe (*Octopus vulgaris*), Compt. Rend. Acad. Sci. **87**, 996-998.
- [2] Svedberg, T., Hedenius, A. (1934) The sedimentation constants of the respiratory proteins, Biol. Bull. **66**, 191-223.
- [3] Eriksson-Quensel, I.B., Svedberg, T. (1936) The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins, Biol. Bull. **71**, 498-547.
- [4] Kubowitz, F. (1938) Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins, Biochem. Z. **299**, 32-57.
- [5] van Holde, K.E. (1967) Physical studies of hemocyanins. III. Circular dichroism and absorption spectra, Biochemistry **6**, 93-99.
- [6] Ellerton, H.D., Ellerton, N.F., Robinson, H.A. (1983) Hemocyanin - a current perspective, Prog. Biophys. Molec. Biol. **41**, 143-248.
- [7] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, Nature **227**, 680-685.
- [8] van Holde, K.E., Miller, K.I. (1982) Haemocyanins, Quart. Rev. Biophys. **15**, 1-129.
- [9] Schneider, H-J., Drexel, R., Feldmaier, G., Linzen, B., Lottspeich, F., Henschen, A. (1983) Hemocyanins in spiders. XVIII. Complete amino-acid sequence of subunit e from *Eurypelma californicum* hemocyanin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. **364**, 1357-1481.
- [10] Schartau, W., Eyerle, F., Reisinger, P., Geisert, H., Storz, H., Linzen, B. (1983) Hemocyanins in spiders. XIX. Complete amino-acid sequence of subunit d from *Eurypelma californicum* hemocyanin, and comparison to chain e, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **364**, 1383-1409.
- [11] Bak, H.J., Beintema, J.J. (1989) *Panulirus interruptus* hemocyanin. The elucidation of the complete amino-acid sequence of subunit a, Eur. J. Biochem. **169**, 333-348.
- [12] 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* hemocyanin, Nature **309**, 23-29.
- [13] Drexel, R., Siegmund, S., Schneider, H-J., Linzen, B., Gielens, C., Préaux, G., Lontie, R., Kellermann, J., and Lottspeich, F. (1987) Complete amino acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*), Biol. Chem. Hoppe-Seyler **368**, 617-635.

- [14] Xin, X.-Q., Gielens, C., Witters, R., Préaux, G. Amino acid sequence of the functional unit g from β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 113-118.
- [15] Top, A., Gielens, C., Witters, R., van Beeumen, J., Préaux, G. Partial amino-acid sequence and location of the carbohydrate chain in functional unit f of *Sepia officinalis* haemocyanin. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 119-124.
- [16] Declerq, L., Witters, R., Préaux, G. Partial sequence determination of *Sepia officinalis* hemocyanin via cDNA. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 131-134.
- [17] Lang, W.H. (1988) cDNA cloning of the *Octopus dofleini* hemocyanin: sequence of the carboxyl terminal domain, *Biochemistry* **27**, 7276-7282.
- [18] 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. USA* **88**, 244-248.
- [19] Stoeva, S. Idakieva, K., Genov, N., Voelter, W. (1997) Complete amino acid sequence of dioxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasiana* hemocyanin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **238**, 403-410.
- [20] Miller, K.I., Cuff, M.E., Lang, W.F., Varga-Weisz, P., Field, K.G., van Holde, K.E. (1998) Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications, *J. Mol. Biol.* **278**, 827-842.
- [21] Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., Hendrickson, W.A. (1998) Crystal structure of a functional unit from *Octopus dofleini* hemocyanin *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- [22] Cass, A.E.G. Superoxide Dismutases. In: Harrison, P.M. (ed.) *Metalloproteins I: Metalproteins with redox roles*, Verlag Chemie, Weinheim-Derfield Beach-Basel 1985, 121-156.
- [23] Wehner, R. Gehring, W., *Zoologie*, 22. völlig neu bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1990, 287-295.
- [24] Storch, V., Welsch, U., *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-New York 1994, 224-237.
- [25] Markl, J. (1995) Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine, *Forschungsmagazin* **1**, 50-59.

-
- [26] Markl, J., Decker, H. Molekular Structure of the Arthropod Hemocyanin, in: Ch. P. Mangum (ed.) Comparative and Environmental Physiology 13, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1992, 325-376.
- [27] Gaykema, W.P.J., Volbeda, A., Hol, W.G.J. (1985) Structure determination of *Panulirus interruptus* haemocyanin at 3.2 Å resolution. Successful phase extention by sixfold density averaging, J. Mol. Biol. **187**, 255-275.
- [28] Volbeda, A., Hol, W.G.J. (1989a) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å, J. Mol. Biol. **209**, 249-279.
- [29] Linzen, B., Soeter, M.N., Riggs, A.F., Schneider, H-J., Schartau, W., Moore, M.D., Yokota, E., Behrens, P.Q., Nakashima, H., Tagaki, T., Nemoto, T., Vereijken, J.M., Bak, H.J., Beintema, J.J. Volbeda, A., Gaykema, W.P.J., Hol, W.G.J. (1985b) The structure of arthropod hemocyanins, Science **229**, 519-524.
- [30] Markl, J., Winter, S. (1989) Subunit-specific monoclonal antibodies to tarantula hemocyanin, and a common epitope shared with calliphorin, J. Comp. Physiol. **159B**, 139-151.
- [31] Terwilliger, N.B. (1982) Effect of subunit composition on the quaternary structure of isopod (*Ligia pallasii*) hemocyanin, Biochemistry **21**, 2579-2586.
- [32] Stöcker, W., Raeder, U., Bijlholt, M.M.C., Wichertjes, T., van Bruggen, E.F.J., Markl, J. (1988) The quaternary structure of four crustacean 2 × 6 hemocyanin: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits, J. Comp. Physiol. **158B**, 271-289.
- [33] Markl, J. (1980) Hemocyanins in spiders. XI. The quaternary structure of *Cupiennius* hemocyanin, J. Comp. Physiol. **140B**, 199-207.
- [34] Bijlholt, M.M.C., van Bruggen, E.F.J. (1986) A model of the architecture of the hemocyanin from the arthropod *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda), Eur. J. Biochem. **155**, 339-344.
- [35] van Bruggen, E.F.J. An electron microscopists view of the quaternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanins. In: Wood, E.J. (ed.) Structure and function of invertebrate respiratory proteins. Life Chem Rep. Suppl. **1**, Harewood, London 1983, 1-14.
- [36] Cavellec, A., Boisset, N. Taveau, J-C., Lamy, J.N. Image processing of electron - microscopic views of *Callianassa californiensis* hemocyanin. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers. Leuven University Press, Leuven 1990, 271-274.

- [37] Lamy, J., Bijlholt, M.M.C., Sizaret, P-Y., Lamy, J., van Bruggen, E.F.J. (1981) Quarternary structure of scorpion (*Androctonus australis*) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy, *Biochemistry* **20**, 1849-1856.
- [38] Markl, J. Kempter, B. (1981a) Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immuno electrophoresis, *J. Comp. Physiol.* **141B**, 495-502.
- [39] Bijlholt, M.M.C., van Heel, M.C., van Bruggen, E.F.J. (1982) Comparison of the 4×6 -meric hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis, *J. Mol. Biol.* **161**, 139-153.
- [40] Mangum, C.P., Scott, J.L., Black, R.E.L., Miller, K.I., van Holde, K.E. (1985) Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3721-3725.
- [41] Lamy, J., Sizaret, P-Y., Frank, J., Verschoor, A. Feldman, R.J., Bonaventura, J. (1982) Architecture of *Limulus polyphemus* hemocyanin, *Biochemistry* **21**, 6825-6833.
- [42] Lamy, (1983a) Quarternary structure of *Limulus polyphemus* hemocyanin, *Biochemistry* **22**, 5573-5583.
- [43] Bijlholt, M.M.C. (1986) Electron microscopy studies of the quarternary structure of arthropod hemocyanins, Dissertation, Rijkuniversiteit Groningen, Nederlande.
- [44] Hamilton, M.G., Rodriguez, R.R., Wall, J.S., Herskovits, T.T. Investigation of the organization of gastropodan hemocyanins by light scattering, ultracentrifugation, and scanning transmission electron microscopy (STEM). In: Préaux, G., Lontie, R (eds) *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven University Press, Leuven 1990, 305-308.
- [45] Harris, J.R., Gebauer, W. Markl, J. (1993) Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*): a parallel subunit model, *J. Struct. Biol.* **111**, 96-104.
- [46] Herskovits, T.T., Hamilton, M.G. (1991) Higher order assemblies of Molluscan hemocyanins, *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**, 19-34.
- [47] van Holde, K.E., Miller, K.I. (1995) Haemocyanins, *Adv. Prot. Chem.* **47**, 1-81.
- [48] Makino, N. (1971) Hemocyanin from *Dolabella auricularia*, *J. Biochem.* **70**, 149-155.
- [49] Ghiretti-Magaldi, A., Salvato, B., Tallandini, L., Beltramini, M. (1979) The hemocyanin of *Aplysia limacina*, *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**, 577-584.

-
- [50] Senozan, N.M., Landrum, J., Bonaventura, J., Bonaventura, C. Hemocyanin of the giant keyhole limpet *Megathura crenulata*. In: Lamy, J., Lamy, J. (eds.) Invertebrate dioxygen-binding proteins. Marcel Dekker, New York 1981, 703-717.
- [51] Herskovits, T.T., Mazzella, L.J., Villanueva, G.B. (1985b) Light-scattering investigation of the dissoziation behavior of *Lunatia heros* and *Lunatia littorea* hemocyanins, *Biochemistry* **24**, 3862-3870.
- [52] Herskovits, T.T., Guzman, A.E., Hamilton, M.G. (1989a) The hemocyanin of the whelck *Busycon contrarium* (Conrad) - aggregation states and subunit structure, *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**, 181-187.
- [53] Herskovits, T.T., Blake, P.A., Gonzales, J.A., Hamilton, M.G., Wall, J.S. (1989b) Subunit structure and higher order assembly of the hemocyanins of melongenidae family: *Melonena corona* (Gmelin), *Busycon canaliculatum* (Linné), *B. carica* (Gmelin), *B. contrarium* (Conrad), and *B. spiratum* (Lamarck), *Comp. Biochem. Physiol.* **94B**, 415-421.
- [54] van Holde, K.E., Miller, K.I., Lang, W.H. Molluscan hemocyanins: Structure and function. In: Mangum, C.P. (ed.) *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 13, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - London - Paris - Tokyo - Hong Kong - Barcelona - Budapest 1992, 257-300.
- [55] Herskovits, T.T., Hamilton, M.G. (1987c) Hydrophobic stabilization of the chiton hemocyanins. Effects of urea, Hofmeister salts and pH on their dissoziation, *Biochim. Biophys. Acta* **915**, 157-167.
- [56] Herskovits, T.T. (1988) Recent aspects of the subunit organization and dissoziation of hemocyanins, *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 597-611.
- [57] Lang, W.H., van Holde, K.E. cDNA cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin. In: Préaux, G. Lontie, R (eds.) *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven 1990, 135-140.
- [58] Lamy, J., Leclerc, M., Sizaret, P.-I., Lamy, J., Miller, K.I., McParland, R., van Holde, K.E. (1987) *Octopus dofleini* Hemocyanin: structure of the seven-domain polypeptide chain, *Biochemistry* **26**, 3509-3518.
- [59] Gielens, C., Bosman, F., Préaux, G., Lontie, R. (1983) Structural studies by limited proteolysis of the haemocyanin of *Sepia officinalis*, *Life Chem. Reports Suppl.* **1**, 121-124.

-
- [60] Gielens, C., Verschueren, L.J., Préaux, G., Lontie, R. (1980) Fragmentation of crystalline β -hemocyanin of *Helix pomatia* with plasmin and trypsin. Location of the fragments in the polypeptide chain, Eur. J. Biochem. **103**, 463-470.
- [61] Stoeva, S., Dolashka, P., Parvanova, K., Genov, N., Voelter, W. (1997) Multidomain structure of the *Rapana thomasi* (Gastropod) hemocyanin structural subunit RHSS1, Comp. Biochem. Physiol. **118B**, 927-934.
- [62] Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., Dolashka, P. Domain structure of the *Rapana thomasi* (Gastropod) hemocyanin. In: GIT Labor-Fachzeitschrift, Special Edition April 1997, 75-79.
- [63] van Holde, K.E., Miller, K.I. Kinetics and equilibria of *Octopus* hemocyanin association. In: Linzen, B (ed.) Invertebrate oxygen carriers, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1986, 245-246.
- [64] van Holde, K.E., Miller, K.I., Schabtach, E., Libertini, L. (1991) Assembly of *Octopus dofleini* hemocyanin. A study of the kinetics by sedimentation, light scattering, and electron microscopy, J. Mol. Biol. **217**, 307-321.
- [65] 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. USA **87**, 1496-1500.
- [66] Billiald, P., Lamy, J., Wichertjes, T., van Bruggen, E., Lone, P., Gielens, C., Préaux, G. Immunoelectron microscopy of the hemocyanins of *Octopus dofleini* and *Octopus vulgaris*. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 343-346.
- [67] Wichertjes, T., Gielens, C., Schutter, W.G., Préaux, G., Lontie, R., van Bruggen, E.F.J. (1986) The quaternary structure of *Sepia officinalis* hemocyanin, Biochim. Biophys. Acta **872**, 183-194.
- [68] Herskovits, T.T., Blake, P.A., Hamilton, M.G. (1988) Subunit dissoziation and denaturation of *Fasciolaria tulipa* hemocyanin, Comp. Biochem. Physiol. **90B**, 869-874.
- [69] Vannoppen-VerEecke, T., Lontie, R. (1973) The Effect of alkaline earth ions on the cooperativity of the oxygenation of *Helix pomatia* haemocyanin, Comp. Biochem. Physiol. **45B**, 945-954.
- [70] van Holde, K.E., Miller, K.I. (1985) Assoziation-dissoziation equilibria of *Octopus* hemocyanin, Biochemistry **24**, 4577-4582.

-
- [71] Herskovits, T.T., Hamilton, M.G. (1987d) Stabilizing influence of calcium and magnesium ions on the decameric structure of the chiton hemocyanins, *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 607-614.
- [72] Herskovits, T.T., Cousins, C.J., Hamilton, M.G., Wall, J.S. The dissoziation of *Yioida limatula* hemocyanin: The influence of pH, urea, and salts. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven 1990, 309-314.
- [73] Brohult, S., Borgman, K. L'Hémocyanine de *Helix pomatia* est-elle composée de deux espèces de molécules? In: Tiselius, A., Pedersen, K.O. (eds.) *The Svedberg 1884 - 1944*, Almqvist and Wiksell, Uppsala 1944, 429.
- [74] Gebauer, W., Stoeva, S., Voelter, W., Dainese, E., Salvato, B., Beltramini, M., Markl, J. (1999) Subunit organization of the gastropod *Rapana thomasiana*, *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 128-134.
- [75] Keller, H., Lieb, B., Altenheim, B., Gebauer, D., Richter, S., Stricker, S., Markl, J. (1999) Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the \approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units *f*, *g* and *h*, *Eur. J. Biochem.* **264**, 27-38.
- [76] Markl, J., Savel-Niemann, A., Wegener-Strake, A., Süling, M., Schneider, A., Gebauer, W., Harris, J.R. (1991) The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH), *Naturwissenschaften* **78**, 512-514.
- [77] 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. Struct. Biol.* **128**, 280-286.
- [78] 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.
- [79] van Kuik, J.A., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. Carbohydrat analysis of hemocyanins. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven 1990, 157-163.
- [80] van Kuik, J.A. (1987) Structural determination of the carbohydrate chains from arthropod and mollusc hemocyanin by means of 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, Dissertation, Rijksuniversiteit Utrecht, Niederlande.

-
- [81] van Kuik, J.A., Sijbesma, R.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Wood, E.J. (1987b) Primary structure determination of seven novel N-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnea stagnalis*, Eur. J. Biochem. **169**, 399-411.
- [82] Lommerse, J.P.M., Thomas-Oates, J.E., Gielens, C., Préaux, G., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. (1997) Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from α_D -hemocyanin of *Helix pomatia*, Eur. J. Biochem. **249**, 195-222.
- [83] Préaux, G., Gielens, C., Witters, R., Lontie, R. (1988) The structure of molluscan haemocyanins and their homology with tyrosinases, Bull. Soc. Chim. Belg. **97**, 1037-1044.
- [84] Felsenfeld, G., Printz, M.P. (1959) Specific reactions of hydrogen peroxide with the active site of hemocyanin. The formation of "methemocyanin", J. Am. Chem. Soc. **81**, 6259-6264.
- [85] Préaux, G., Gielens, C. Hemocyanins. In: Lontie, R. (ed.) Copper Proteins and Copper Enzymes, CRC Press, Boca Raton Florida 1984, 159-205.
- [86] 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**, 2809-2815.
- [87] Kitajima, N., Fujisawa, K., Moro-oka, Y. (1989) μ - η^2 : η^2 Peroxobinuclear copper complex, $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-jPr}_2\text{px})_3)_2(\text{O}_2)]$, J. Am. Chem. Soc. **111**, 8975-8976.
- [88] Ling, J., Nestor, L.P., Czernuszewicz, R.S., Spiro, T.G., Fraczekiewicz, R., Sharma, K.D., Loehr, T.M., Sanders-Loehr, J. (1994) Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and molluscs. Evidence from Raman spectroscopy and normal coordinate analysis, J. Am. Chem. Soc. **116**, 7682-7691.
- [89] Lindner, G. Muscheln und Schnecken der Weltmeere. BLV-Bestimmungsbuch. BLV Verlag, München 1975.
- [90] Die große farbige Enzyklopädie Urania-Tierreich in sechs Bänden, Band 2: Wirbellose Tiere, Urania Verlag, Leipzig - Jena - Berlin 1994, 498.
- [91] Website der National Oceanic and Atmospheric Administration / National Undersea Research Program (NURP) 1975; http://www.photolib.noaa.gov/lb_images/nurp/nur01521.htm.
- [92] Website der National Oceanic and Atmospheric Administration / Natural History of Useful Aquatic Animals, Shellfish & miscellaneous Sea Creatures - Page 1; http://www.photolib.noaa.gov/lb_images/historic/nmfs/figb0543.htm

-
- [93] Website der British Marine Life Study Society; <http://ourworld.compuserve.com/homepages/BMLSS/spider.htm>, Peter Glanvill, 1992.
- [94] Website der British Marine Life Study Society, <http://ourworld.compuserve.com/homepages/BMLSS/news3.htm#spiny> Spider, Marine Wildlife News 1998.
- [95] Die große farbige Enzyklopädie Urania-Tierreich in sechs Bänden, Band 2: Wirbellose Tiere, Urania Verlag, Leipzig - Jena - Berlin 1994, 517-518.
- [96] Wehner, R. Gehring, W., Zoologie, 22. völlig neu bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 1990, 155-160.
- [97] Voet, D., Voet, J.G., Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim-New York-Basel-Cambridge 1992, 1110-1135.
- [98] Male, D.K., Roitt, I.M., Erworbene (adaptive) und angeborene Immunität. In: Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. (Hrsg.) Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1991, 1-10.
- [99] Wehner, R. Gehring, W., Zoologie, 22. völlig neu bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 1990, 302-308.
- [100] Schirmacher, V., Tumoren: Entstehung, Metastasierung und immunologische Abwehrmechanismen. In: Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. (Hrsg.) Immunologie, 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1991, 185-203.
- [101] Schirmacher, V., (1990) Krebsimpfung mit Tumorzellen, Spektrum der Wissenschaft **1**, 38-50.
- [102] Swanson, M.A., Schwartz, R.S. (1967) Immunsuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence, The New England Journal of Medicine **277**, 163-170.
- [103] Olsson, C.A., Chute, R., Rao, C.N (1974) Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate, J. Urol. **111**, 173-176.
- [104] Stiefel, T. (1998) Multipitoper Carrier für neuartige Impfstoffe, BioTec **4**, 40-43.
- [105] Harris, J.R., Gebauer, W., Guderian, F.U.M., Markl, J. (1997) Reassoziation from Immucothel® followed by separation of KLH1 and KLH2, Micron **28**, 31-41.
- [106] Roth, R. Hämocyanin - ein starkes Antigen, Immunologie Spektrum **3**, Boehringer GmbH, Mannheim 1990, oS.
- [107] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1987) Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc. **78**, 53-68.

- [108] Karas, M., Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.
- [109] Sanger, F., Tuppy, H. (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin, *Biochem. J.* **49**, 463-490. Sanger, F., Thompson, E.O.P (1953) The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin, *Biochem. J.* **53**, 353-374.
- [110] Edman, P. (1950) Method of determination of amino-acid sequences in peptides, *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-293.
- [111] Edman, P. and Bregg, G. (1967) A protein sequenator, *Europ. J. Biochem.* **1**, 80-91.
- [112] Laursen, R.A. (1971) Solid phase Edman degradation. An automatic peptide sequencer, *Eur. J. Biochem.* **20**, 89-102.
- [113] Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein Sequenator, *J. Biol. Chem.* **256**, 7990-7997.
- [114] Galla, H-J., Müller, H-J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1988, 22-30.
- [115] Quadrifoglio, F., Urry, D.W. (1968) Ultraviolet rotatory properties of polypeptides in solution. II. Poly-L-serine, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2760-2765.
- [116] Greenfield, N., Fasman, G. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* **8**, 4108-4116.
- [117] Galla, H-J., Müller, H-J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 1988, 46-71.
- [118] Ricchelli, F. (1990) An investigation of the electronic environment of tryptophan in proteins: reliability of fluorescence quenching experiments, *J. Photochem. Photobiol.* **7B**, 93-97.
- [119] Jurincic, 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.
- [120] 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.
- [121] Markl, J., Nour el Din, M., Winter-Simanowski, S., Simanowski, U. (1991) Specific IgG activity of sera from egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH), *Naturwissenschaften* **78**, 30-31.

-
- [122] Harris, J.R., Gebauer, W., Söhngen, S.M., Markl, J. (1995) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): Purification of intact KLH1 through selective dissoziation of KLH2, *Micron* **26**, 201-212.
- [123] Tamburro, A.M., Salvato, B., Zatta, P. (1976) A circular dichroism study of some hemocyanins, *Comp. Biochem. Physiol.* **55B**, 347-356.
- [124] Albergoni, V., Cassini, A., Salvato, B. (1972) The carbohydrate portions from *Octopus vulgaris*, *Comp. Biochem. Physiol.* **41B**, 445-451.
- [125] Burstein, E.A., Vedenkina, N.S., Ivkova, M.N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.* **18**, 263-279.
- [126] 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 conformational stability of the native protein and its structural subunits, *Biochem. J.* **315**, 139-144.
- [127] Stoeva, S., Dolashka, P., Bankov, B., Voelter, W., Salvato, B., Genov, N. (1995) Spectroscopic properties of *Callinectes sapidus* hemocyanin subunits, *Spectrochim. Acta* **51A**, 1965-1974.
- [128] Ricchelli, F., Jori, G., Tallandini, L., Zatta, P., Beltramini, M., Salvato, B. (1985) The role of copper and quaternary structure on the conformational properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 461-469.
- [129] O'Neil, J.D.J., Hofmann, T. (1987) Tyrosine and Tyrosinate fluorescence of pig intestinal Ca^{2+} binding protein, *Biochem. J.* **243**, 611-615.
- [130] Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 819-846.
- [131] Gebauer, W., Harris, J.R., Heid, H., Süling, M., Hillenbrand, R., Söhngen, S., Wegener-Strake, A., Markl, J. (1994) Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH1 and KLH2, *Zoology* **98**, 51-68.
- [132] Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H., Hol, W.G.J. (1993) Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation, *Prot. Sci.* **2**, 597-619.

- [133] Magnus, K.A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W.G.J (1994) Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences, *Proteins* **19**, 302-309.
- [134] Gielens, C., De Geest, N., Xin, X.-Q., Devreese, B., van Beeumen, J., Préaux, G. (1997) Evidence for a cystein-histidine thioether bridge in functional units of molluscan haemocyanins and location of the disulfide bridges in functional units *d* and *g* of the β_c -haemocyanin of *Helix pomatia*, *Eur. J. Biochem.* **248**, 879-888.
- [135] Chou, P.Y., Fasman, G.D (1978) Empirical predictions of protein conformation, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 251-276.
- [136] Garnier, J., Osguthorpe, D.J., Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins, *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- [137] Stoeva, S., Idakieva, K., Rachev, R., Voelter, W., Genov, N. (1997) Amino-terminal oxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasiana* Grosse (gastropod) hemocyanin: carbohydrate content, monosaccharide composition and amino acid sequence studies, *Comp. Biochem. Physiol.* **117B**, 101-107.
- [138] Loncke, P. Vanderzande, M., Gielens, C., Préaux, G., Identification of the missing FU in *Octopus vulgaris* hemocyanin from a comparison with *Sepia officinalis* hemocyanin. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven 1990, 295-298.
- [139] J.J. Beintema, Evolutionary aspects of dioxygen carriers. In: Préaux, G., Lontie, R. (eds.) *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven 1990, 513-520.
- [140] Söhngen, S.M., Stahlmann, A., Harris, J.R., Müller, S.A., Engel, A., Markl, J. (1997) Mass determination, subunit organization and control of oligmerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH), *Eur. J. Biochem.* **248**, 602-614.
- [141] 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* α -hemocyanin, *J. Biol. Chem.* **260**, 13984-13988.
- [142] Hall, R.L., Wood, E.J. (1976) The carbohydrate content of gastropod hemocyanin, *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 307-309.

-
- [143] Gielens, C., Verhoegarden, R., Muylle, K., Préaux, G. Microheterogeneity of functional unit d of the β_c -haemocyanin of *Helix pomatia*. In: Préaux, G. Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 147-152.
- [144] Préaux, G. Gielens, C. Comparison of the sensitivity of molluscan haemocyanins to limited proteolysis and of the location of the carbohydrate chains in their functional units. In: Préaux, G. Lontie, R. (eds.) Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, Leuven 1990, 99-106.
- [145] Vanhoegarden, R., Gielens, C., Préaux, G. (1988) Location of carbohydrate in the functional unit d of β -haemocyanin of *Helix pomatia*, Arch. Int. Physiol. Biochim. **96**, 64.
- [146] Wood, E.J., Chaplin, M.F., Gielens, C., de Sadeleer, J., Préaux, G., Lontie, R. (1985) Relative molecular mass of the polypeptide chain from β_c -haemocyanin of *Helix pomatia* and carbohydrate composition of the functional units, Comp. Biochem. Physiol. **82B**, 179-186.
- [147] Wirguin, I., Suturkova-Milosevic, L., Briani, Ch., Latov, N. (1995) Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen, Cancer Immunol. Immunother. **40**, 307-310.
- [148] Yang, J.T., Wu, C-S.C., Martinez, H.M. (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism, Methods Enzymol. **130**, 208-269.
- [149] Herskovits, T.T, San George, R.CD., Erhunmwunsee, L.J. (1981b) Light-scattering investigations of the subunit dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin. Effects of salts and ureas, Biochemistry **20**, 2580-2587.
- [150] Herskovits, T.T., Russel, M.W., Carberry, S.E. (1984) Light-scattering investigations of the subunit structure and sequential dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin, Biochemistry **23**, 1875-1881.
- [151] Schneider, H.-J., Voll, W., Lehmann, L., Grißhammer, R., Goettgens, A.; Linzen, B. Partial amino acids sequence of crayfish (*Astracus leptodactylus*) hemocyanin. In: Linzen, B. (ed.) Invertebrate Oxygen Carriers, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1986, 173-176.
- [152] Neuteboom, B., Sierdsema, J.S., Beintema, J.J. (1989a) The relationship between N-terminal sequences and immunological characterization of crustacean hemocyanins, Comp. Biochem. Physiol. **94B**, 587-592.

-
- [153] Jekel, P.A., Bak, H.J., Soeter, N.M., Vereijken, J.M., Beintema, J.J. (1988) *Panulirus interruptus* hemocyanin. The amino acid sequence of subunit *b* and anomalous behaviour of subunits *a* and *b* on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS, Eur. J. Biochem. **178**, 403-412.
- [154] Makino, N., Kimura, S. (1988) Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin. I. Isolation and properties, Eur. J. Biochem. **173**, 423-430
- [155] Durstewitz, G., Terwilliger, N.B. (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.
- [156] Stoeva, S., Dolashka, P., Hristova, R., Genov, N., Voelter, W. (1999) Subunit composition and N-terminal analysis of arthropod hemocyanins, Comp. Biochem. Physiol. **122B**, 69-75.
- [157] Hristova, R., Dolashka, P., Stoeva, S., Voelter, W., Salvato, B., Genov, N. (1997) Spectroscopic properties and stability of hemocyanins, Spectrochim. Acta **53A**, 471-478.
- [158] Ricchelli, F., Salvato, B., Filippi, B., Jori, G. (1980) Conformational changes of *Carcinus maenas* hemocyanin induced by urea, Arch. Biochem. Biophys. **202**, 277-288.
- [159] 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.
- [160] Teale, F.W.J. (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution, Biochem. J. **76**, 381-388
- [161] Bannister, W.H., Wood, E.J. (1971) Ultraviolet fluorescence of *Murex trunculus* haemocyanin in relation to the binding of copper and oxygen, Comp. Biochem. Physiol. **40B**, 7-18.
- [162] Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitro-cellulose, J. Biochem. Biophys. Methods **10**, 203-209.
- [163] Hawke, D., Yuan, P. S-pyridylethylation of cystein residues. In: User Bulletin **28**, Applied Biosystems, Weiterstadt 1987, 1-8.
- [164] Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, Methods Enzymol. **131**, 266-280.
- [165] Kirby, E.P., Steiner, R.F. (1970) The influence of solvent and temperature upon the fluorescence of indole derivatives, J. Phys. Chem. **74**, 4480-4490.

- [166] Lehrer, S.S. (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion, *Biochem.* **10**, 3254- 3263.
- [167] Eisinger, J. (1969) Intramolecular energy transfer in Adrenocorticotropin, *Biochemistry* **8**, 3902-3908.
- [168] Stern O. und Volmer, M. (1919) Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz, *Phys. Z.* **20**, 183-188.

Meine akademischen Lehrer waren

an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen:

E. Bayer, M. Brendle, G. Gauglitz, J. Gelinek†, W. Göpel†, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, D. Krug, N. Kuhn, U. Kunze†, E. Lindner, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pommer, V. Schurig, F.F. Seelig, J. Strähle, W. Voelter, U. Weber, K. Wegmann.

an der Universität Stuttgart:

G. Becker, K. Brederock, F. Effenberger, U. Einsele, P. Fischer, B. Föhlisch, H. Herlinger, G. Kothe, H.E.A. Kramer, W. Oppermann, G. Simchen, A. Simon, J. Weidlein, J. Weitkamp.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jürgen Schütz
Geburtsdatum/-ort: 07.01.1963, Reutlingen
Eltern: Jakob Schütz
Wilhelmine geb. Hildenbrand

Schulische Ausbildung

09.69 - 07.73 Mörike-Schule in Reutlingen-Sondelfingen
09.73 - 07.82 Isolde-Kurz-Gymnasium Reutlingen mit Abschluß Abitur

Studium

10.82 - 02.84 Freie Kunstschule Stuttgart
10.86 Grundstudium Chemie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10.89 Hauptstudium an der Universität Stuttgart
03.95 Diplomprüfung
04.95 - 09.95 Diplomarbeit bei Priv. Doz. Dr. P. Fischer mit dem Thema: "Einbau von Cycloalkyl- und Oligo(oxyethylen)-Seitenketten als substanzklassen-spezifische Selektoren in unterschiedliche Polysiloxanphasen für die Gaschromatographie."
seit 10.95 Promotion bei Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, mit dem Thema: " Isolierung, Sequenzierung und Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften von stukturellen Untereinheiten und funktionellen Einheiten verschiedener Arthropoden- und Molluskenhämocyanine."

Berufliche Tätigkeiten

01.86 - 09.86 Angestellter am Deutschen Institut für Textil- und Verfahrenstechnik
seit 10.96 Assistent im Biochemischen Grundpraktikum für Mediziner und Zahnmediziner, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
seit 10.98 Lehrauftrag der FH Sigmaringen für Allgemeine Chemie in der Fachrichtung Facility Management

Wehrdienst

10.84 - 12.85 Grundwehrdienst
10.86 - 08.93 Wehrübungen und Lehrgänge Unteroffizier (ROB) und Offizier
08.93 Ernennung zum Offizier