

Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an einem Bruchstück des α -Hämocyanins der *Helix pomatia*

Von

Johann Berger und Ingrid Pilz*

Institut für Physikalische Chemie, Universität Graz, Österreich

und

Réné Witters und René Lontie

Laboratorium voor Biochemie, Katholieke Universiteit te Leuven, Belgien

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 3. Mai 1977)

*Small Angle X-Ray Scattering Studies on a Dissociation Product of *Helix Pomatia* α -Haemocyanin*

α -Haemocyanin of *Helix pomatia* was split into homogeneous fragments in an ethanolamine/HCl buffer, pH 10.2 and ionic strength 0.01. These fragments were studied by small angle X-ray scattering. The following results were obtained: radius of gyration 7.4 nm, volume 588 nm³, maximal diameter of the particle 23.9 nm, radius of the spherical subunits 2.5 nm and number of the subunits 6–9. With this information models of the particles were built and their theoretical scattering curves compared with the experimental one. Concerning molecular parameters and shape of the curve the results agreed within the limits of error with a study on the twentieths of the β -haemocyanin.

Einleitung

Hämocyanine sind die blauen Blutfarbstoffe vieler Arthropoden und Mollusken. Dabei übernehmen im Gegensatz zu Hämoglobin zwei Kupferatome die reversible Bindung eines Sauerstoffmoleküls^{1, 2}.

Die größten Hämocyanine kommen in der Klasse der Gastropoden vor. So hat^{3, 4} das Hämocyanin der Weinbergsschnecke *Helix pomatia* ein Molekulargewicht von 9×10^6 .

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. Kratky zum 75. Geburtstag mit den herzlichsten Glückwünschen gewidmet!

Dieser Blutfarbstoff der Weinbergschnecke besteht aus zwei Komponenten, die α - und β -Hämocyanin genannt werden. Die erste Unterscheidung war, daß die α -Komponente in 1M-NaCl-Lösung bei pH 5,7 in 2 Teile zerfällt, der β -Anteil nicht⁵. Inzwischen sind weitere Unterschiede bekannt geworden, zum Beispiel verschiedenes Verhalten bei Dialyse und Dissoziation^{6, 7}.

Erste Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an einem Hämocyanin wurden bereits 1943/44 vorgenommen⁸, allerdings mit apparativ unzulänglichen Mitteln. Weitere Untersuchungen wurden am Grazer Institut ab 1970 durchgeführt^{4, 9} und lieferten wichtige Resultate über verschiedene Molekülparameter und die Gestalt des Moleküls. Danach ist das Hämocyanin der *Helix pomatia* ein Hohlzylinder aus kugelförmigen Untereinheiten⁹.

Nach ähnlichen Versuchen am β -Anteil¹⁰ wurde auch bei der α -Komponente versucht, durch Untersuchungen der Dissoziationsprodukte Aufschlüsse über die Quartärstruktur des Moleküls zu gewinnen. Über eines dieser Bruchstücke wird hier berichtet.

Material

α -Hämocyanin der *H. pomatia* wurde nach *Heirwegh* et al.¹¹ präpariert. Diese Lösung, deren Konzentration bei 80 mg/ml lag, wurde im Grazer Institut 36 Stdn. gegen einen Äthanolamin/HCl-Puffer, pH = 10,2, dialysiert. In diesem Puffer, der eine Ionenstärke $I = 0,01$ aufwies, sollten nach *Siezen* und *Van Driel*⁸ Zwanzigstel des Moleküls vorliegen. Ein Ultrazentrifugenlauf (Abb. 1) bestätigte die Homogenität der Lösung. Wegen der extrem niederen Ionenstärke (Primary Charge Effect) konnten die Sedimentationskonstante und das Molekulargewicht des Teilchens nicht genau berechnet werden.

Für die Konzentrationsbestimmung mit einem Spektralphotometer bei 278 nm in 0,1M-Na-Tetraborat, pH = 9,2, wurde ein Extinktionskoeffizient von $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 14,16$ verwendet¹¹.

Methodik

Die Röntgenkleinwinkelmessungen wurden mit einer Philips PW 1140-Anlage (50 kV, 30 mA) mit Kupfer-K-Strahlung durchgeführt. Als Kleinwinkelkamera wurde die im Grazer Institut entwickelte Type¹² verwendet. Ein elektronisches Schrittschaltwerk¹³ ermöglichte einen kontinuierlichen Tag- und Nachtbetrieb. Die Lösungen wurden in Markkapillaren von 1 mm Durchmesser bei 4 °C untersucht. Die Registrierung der gestreuten Strahlung erfolgte mit einem Proportionalzählrohr; ein Impulshöhen-diskriminator, auf Cu-K-Strahlung eingestellt, eliminierte die Bremsstrahlung.

Die erhaltenen Werte wurden mit verschiedenen EDV-Programmen an einer Univac 494 weiterverarbeitet. Das Programm Fylax¹⁴ mittelte die verschiedenen Streukurven, zog die Blindstreuung ab, dividierte die Intensitäten durch die verschiedenen Konzentrationen c und berechnete die Fehlerwerte. Der Kollimationseffekt, der durch die Verwendung eines strichförmigen Primärstrahls auftrat („Verschmierung“), wurde gemein-

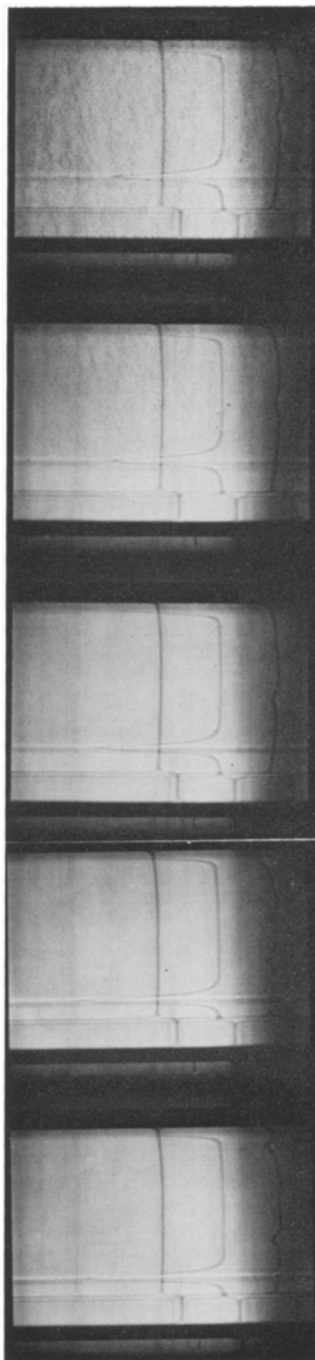


Abb. 1. Ultrazentrifugenlauf von α -Hämocyanin der *H. pomatia* in einem Äthanolamin/HCl-Puffer, pH = 10,2, $I = 0,01$ (mittlere Kurve). Die Aufnahme wurde mit einem Beckman-Spinco Model E bei 40 000 Umdrehungen/min gemacht

sam mit der $\text{CuK}\beta$ -Strahlung durch das Programm Desmglatt von *Glatter*¹⁵ eliminiert. Der Anteil der $\text{K}\beta$ -Linie wurde durch Absorption dieser Strahlung mit einem $30\ \mu\text{m}$ Ni-Filter festgestellt. Die Primärintensität, die zur Molekulargewichtsbestimmung bekannt sein mußte, wurde mit Hilfe eines nach der Rotatormethode geeichten Lupolenplättchens bestimmt^{16, 17}.

Wegen des langen *Guinier*bereiches¹⁸ der Streukurve konnte auf die Verwendung eines zweiten kleinen Eintrittsspalt zur Erzielung einer höheren Auflösung verzichtet werden; der gesamte Streubereich wurde mit einem $120\ \mu\text{m}$ -Spalt vermessen und nach innen in der *Guinier*auftragung extrapoliert. Mit 107 Punkten wurde ein Winkelbereich von $0,0023$ bis $0,12$ radians erfaßt.

Vier verschiedene Konzentrationen wurden vermessen, sie lagen zwischen $6,7$ und $34,3$ mg/ml. Die Zahl der registrierten Impulse lag pro Meßpunkt bei $100\ 000$, was einem relativen statistischen Fehler von etwa $0,3\%$ entspricht.

Resultate

Streumassenradius

Bei Vorliegen aller räumlichen Orientierungen eines Teilchens in einer Lösung ist der Innenteil der Streukurve nach *Guinier*¹⁸ eine *Gaußsche* Kurve. Aus der Auftragung — Logarithmus der Streuintensität gegen das Quadrat des Streuwinkels — erhält man eine Gerade, deren Neigung dem Streumassenradius R direkt proportional ist. Durch die Verlängerung zu kleinsten Winkeln erhält man die Streuintensität beim Winkel Null (Nullintensität), die dem Molekulargewicht und dem Volumen direkt proportional ist. Die aus dieser Auftragung (der sogenannten *Guinier*auftragung) erhaltenen Werte des Streumassenradius und der Nullintensität sind mit einem Konzentrationseffekt behaftet und müssen graphisch auf die Konzentration null extrapoliert werden. Abb. 2 zeigt die entschmierten Innenteile der Streukurve in *Guinier*auftragung. Der so erhaltene Wert für den Streumassenradius war $7,35 \pm 0,2$ nm.

Eine andere Möglichkeit, den Streumassenradius zu bestimmen, ist die Korrelationsfunktion $\gamma(r)$ ¹⁹, wobei man unter Korrelationsfunktion die Wahrscheinlichkeit versteht, auf zwei Punkte im Abstand r innerhalb des Teilchens zu stoßen. R ergibt sich aus folgender Beziehung:

$$R^2 = \frac{\int_0^{\infty} \gamma(r) r^4 \, dr}{2 \int_0^{\infty} \gamma(r) r^2 \, dr} \quad (1)$$

$\gamma(r)$ wird durch *Fourier*transformation der gestreuten Intensität erhalten. Außer dem Streumassenradius wird aus der Korrelationsfunktion noch der größte Durchmesser D_{max} innerhalb eines Teilchens erhalten, da $\gamma(r)$ bei diesem Wert null wird.

Für den Streumassenradius wurde aus der *Fouriertransformation* ein Wert von 7,46 nm erhalten, für D_{\max} 23,9 nm. Während der Streumassenradius auf Fehler im extrapolierten Innenteil nicht sehr empfindlich reagiert, machen sie sich im maximalen Durchmesser leider sehr bemerkbar. Da der Fehler bei der Extrapolation auf die Konzentration null relativ groß war ($\pm 5\%$), ist auch der Wert für D_{\max} mit Unsicherheiten behaftet.

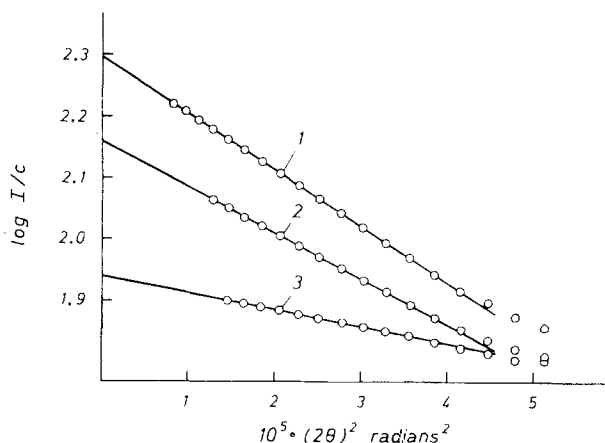


Abb. 2. *Guinierauftragung* der Innenteile der entschmierten Streukurven eines Bruchstücks des α -Hämocyanins der *H. pomatia*. Kurve 1: $c = 6,67$ mg/ml; Kurve 2: $c = 10,28$ mg/ml; Kurve 3: $c = 25,19$ mg/ml. I = Intensität (Impulse/sec)

Molekulargewicht

Für das Molekulargewicht, das direkt proportional der Nullintensität und indirekt proportional dem Quadrat der Elektronendichtedifferenz zwischen gelöstem Makromolekül und Lösungsmittel ist, wurde ein Wert von rund 300 000 erhalten. Dabei wurde auf eine eigene Messung des isopotentialen spezifischen Volumens v_2' verzichtet und der Wert von $0,727$ cm^3 g^{-1} aus früheren Bestimmungen²⁰ verwendet. Da Ultrazentrifuguntersuchungen der Zwanzigstel des α -Hämocyanins ein Molekulargewicht von 365 000 bis 450 000 ergaben, könnte entweder das hier untersuchte Bruchstück kleiner sein oder es lieferte die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung einen zu tiefen Wert. Viel wahrscheinlicher ist der zweite Fall, da, wie bereits erwähnt, die Nullintensität nur mit einem relativ großen Fehler erhalten wurde und das ermittelte Molekulargewicht daher nur eine halbquantitative Größe darstellt.

Volumen und Hydratation

Das Volumen eines gelösten Makromoleküls ist direkt proportional der Nullintensität und indirekt der Invariante Q ¹⁹. Die Invariante

$$Q = \int_0^{\infty} I(2\theta)^2 d2\theta \quad (2)$$

wurde auf folgende Art berechnet: Soweit die Meßgenauigkeit es zuließ, wurde graphisch nach *Simpson* integriert (0—0,07 radians), der Außenteil, der nach $k/(2\theta)^4$ abfällt, wurde nach Bestimmung von k analytisch bis ∞ bestimmt. Der auf diese Art erhaltene Wert für das Volumen des Teilchens war 588 nm³.

Kurvengestalt

Abb. 3 zeigt die Streukurve in doppelt-logarithmischer Darstellung. Aus der Lage der beiden ausgeprägteren Minima im Außenteil, die eine charakteristische Distanz aufweisen, kann man nach *Glatter*²¹ bei Vorliegen kugelförmiger Untereinheiten deren Radius berechnen. In diesem Fall betrug er $2,68 \pm 0,2$ nm.

Diskussion und Modelle

Die in dieser Arbeit untersuchten Bruchstücke sind wahrscheinlich identisch mit den in der Literatur beschriebenen sogenannten „Zwanzigsteln“ des ganzen Moleküls²⁰. Die im Außenteil der Streukurve auftretenden Minima weisen darauf hin, daß das untersuchte Fragment aus annähernd kugelförmigen Untereinheiten aufgebaut ist; die gleichen Minima wurden bei den Streukurven des ganzen Moleküls der α - und β -Komponente und verschiedenen anderen Bruchstücken des Moleküls gefunden^{9, 10, 22}. Aus dem Invariantenvolumen des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bruchstückes und dem Volumen der kugelförmigen Untereinheiten errechnet sich die Zahl der Untereinheiten zu 6 bis 9. Bei genaueren Messungen an dem offenbar identischen Bruchstück der β -Komponente, den „Zwanzigsteln“, hatten wir einen Radius der kugelförmigen Untereinheiten von $\approx 2,5$ nm gefunden und als wahrscheinlichsten Wert für die Zahl der Untereinheiten acht bis neun ermittelt.

Abb. 3 bringt einen Vergleich der Streukurve des vorliegenden „Zwanzigstel“-Bruchstückes der α -Komponente mit jener der β -Komponente¹⁰. Da die Streukurve und auch die Molekülparameter, wie aus der Tabelle ersichtlich, sehr ähnlich sind, wurde zur Bestimmung eines streuungsäquivalenten Modells auf die bereits für das entspre-

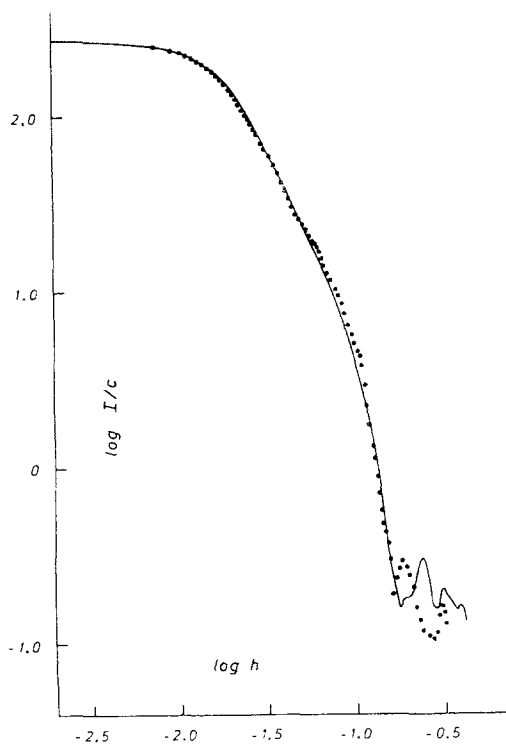


Abb. 3. Vergleich der Streukurven der β -Hämocyanin-Zwanzigstel²² (—) und des Dissoziationsproduktes des α -Hämocyanins (.....) von *H. pomatia*. I = Intensität, c = Konzentration der Lösung, $h = (4\pi/\lambda) \cdot \sin \theta$; θ = halber Streuwinkel

Tabelle 1. Vergleich einiger Molekülparameter eines Bruchstückes des α -Hämocyanins der *Helix pomatia* und der Zwanzigstel des β -Hämocyanins²²

	R [nm]	V [nm ³]	D_{\max} [nm]	Unter- einheiten [nm]	Zahl der Unter- einheiten
Bruchstück des α -Hämocyanins	$7,4 \pm 0,2$	$588 \pm 10\%$	$23,9 \pm 2,0$	$2,68 \pm 0,2$	6—9
Zwanzigstel des β -Hämocyanins	$7,5 \pm 0,1$	$635 \pm 5\%$	$21,9 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,1$	8—10

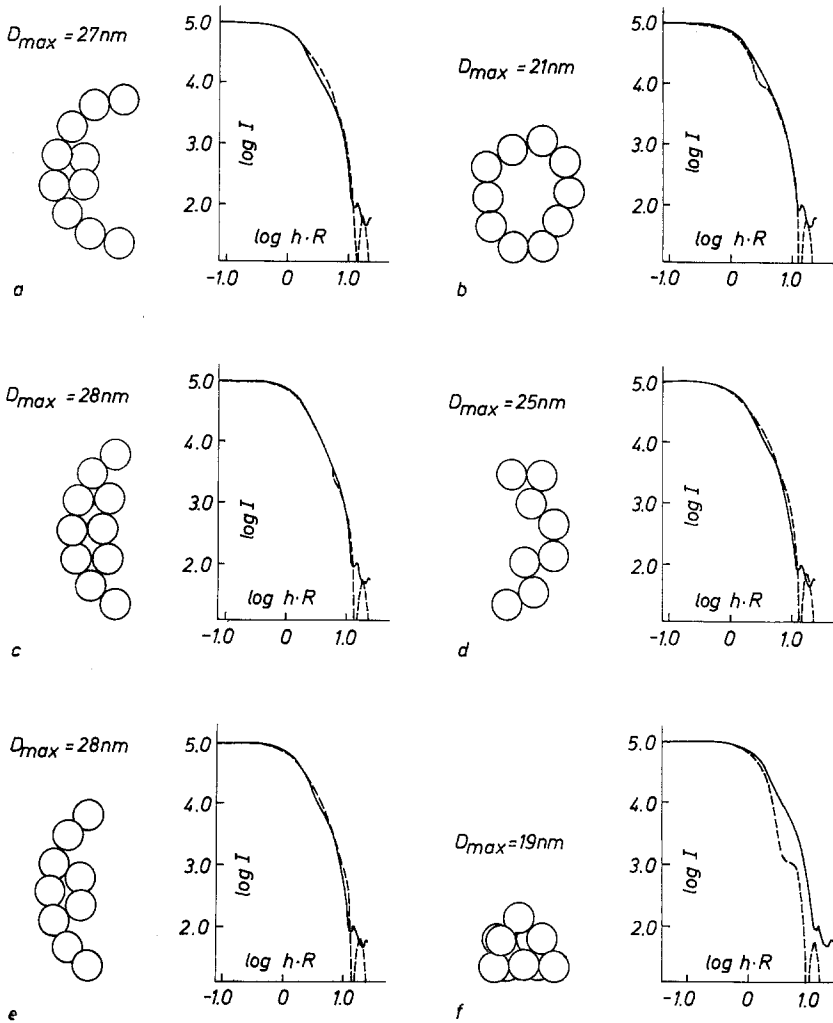


Abb. 4. Theoretische Modelle (-----) und ihre Streukurven im Vergleich zur experimentellen Kurve (—) eines Bruchstücks des α -Hämocyansins der *H. pomatia*. R = Streumassenradius, weitere Symbole wie in Abb. 3. Ausführliche Erklärungen im Text

chende Bruchstück der β -Komponente berechneten Modelle zurückgegriffen¹⁰. Die etwas gegenüber dem β -Bruchstück verschobene Lage der beiden Außenteil-Minima ist wahrscheinlich auf die wesentlich niedrigere Ionenstärke der hier untersuchten Lösung (0,01 gegenüber 1,0)

und auf die dadurch verursachte Quellung der Untereinheiten zurückzuführen.

In Abb. 4 sind einige Modelle zu sehen, die nach elektronenmikroskopischen Bildern von *Siezen* und *van Bruggen*²⁰ erstellt wurden.

Die Zahl der Untereinheiten der Modelle beträgt 8—10. Ein streuungsäquivalentes Modell sollte in der Streukurvenform mit der experimentellen Kurve übereinstimmen und auch die gleichen charakteristischen Daten, wie Streumassenradius und maximalen Durchmesser,

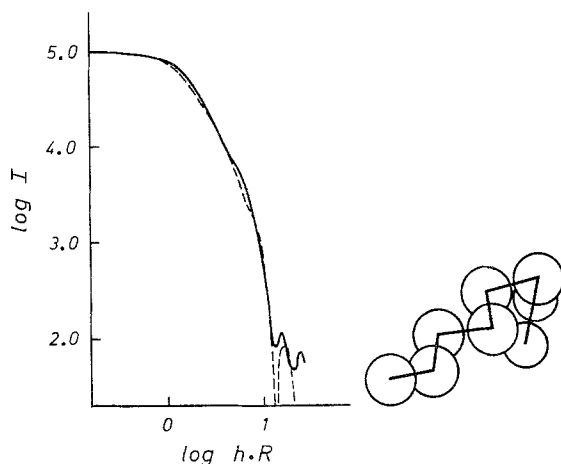


Abb. 5. Modell des Bruchstücks des α -Hämocyanins der *H. pomatia* und Vergleich der theoretischen Streukurve (-----) mit der experimentellen eines Bruchstücks des α -Hämocyanins der *H. pomatia* (Symbole siehe Abb. 3).

Das Modell besteht aus 8 Untereinheiten mit einem Radius von 2,5 nm

besitzen. Alle sichelförmig gebogenen Modelle (Modell a, c, e und d) würden zwar in der Kurvenform in erster Näherung passen, wie der Vergleich mit der experimentellen Streukurve in Abb. 4 zeigt, besitzen aber einen zu großen Streumassenradius und einen zu großen Durchmesser. Ringförmige oder kompakte Modelle (Modell b und f) sind auf Grund ihrer Kurvenform auszuschließen. Die befriedigendste Übereinstimmung zeigte das Modell in Abb. 5, das für die β -Komponente ermittelt wurde. Dieses Modell wurde nach den neuesten morphologischen²³ und biochemischen Ergebnissen²⁴ gebaut. Es besteht aus acht Untereinheiten mit einem Radius von 2,5 nm.

Befriedigenden Aufschluß darüber, in welcher Form das untersuchte Bruchstück tatsächlich vorliegt, können weitere Messungen an größeren Bruchstücken — insbesondere dem Dimeren des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bruchstückes — bringen.

Danksagung

I. Pilz und *J. Berger* danken dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die großzügige Unterstützung. *R. Lontie* und *R. Witters* wünschen dem Fonds voor Collectief Fundamenteel Onderzoek (Contract 2.0016.76) zu danken.

Literatur

- ¹ *A. C. Redfield, T. Coolidge* und *H. Montgomery*, *J. Biol. Chem.* **76**, 197 (1928).
- ² *R. Guillemet* und *G. Gosselin*, *C. R. Soc. Biol.* **111**, 733 (1932).
- ³ *E. J. Wood, W. H. Bannister, C. J. Oliver, R. Lontie* und *R. Witters*, *C. R. Biochem. Physiol.* **40 B**, 19 (1971).
- ⁴ *I. Pilz, O. Kratky* und *I. Moring-Claesson*, *Z. Naturforsch.* **25 b**, 600 (1970).
- ⁵ *S. Brohult* und *K. Borgman*, in: *The Svedberg 1884—1944*, S. 429. Uppsala: Almqvist & Wiksell. 1944.
- ⁶ *R. J. Siezen* und *R. van Driel*, *J. Mol. Biol.* **90**, 91 (1974).
- ⁷ *C. Gielens, G. Préaux* und *R. Lontie*, *Eur. J. Biochem.* **60**, 271 (1975).
- ⁸ *O. Kratky, A. Sekora* und *H. Friedrich-Frekša*, *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Klasse* 1946, Nr. 5; *O. Kratky*, *J. Polymer Sci.* **3**, 195 (1948).
- ⁹ *I. Pilz, O. Glatter* und *O. Kratky*, *Z. Naturforsch.* **27 b**, 518 (1972).
- ¹⁰ *J. Berger, I. Pilz, R. Witters* und *R. Lontie*, *Eur. J. Biochem.*, eingereicht.
- ¹¹ *K. Heirwegh, H. Borginon* und *R. Lontie*, *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 517 (1961).
- ¹² *O. Kratky*, *Z. Elektrochem.* **62**, 66 (1958).
- ¹³ *H. Leopold*, *Elektronik* **14**, 359 (1965).
- ¹⁴ *P. Zipper*, *Acta Phys. Austriaca* **36**, 27 (1972).
- ¹⁵ *O. Glatter*, *J. Appl. Crystallogr.* **7**, 147 (1974).
- ¹⁶ *O. Kratky, I. Pilz* und *P. J. Schmitz*, *J. Colloid Interface Sci.* **21**, 24 (1966).
- ¹⁷ *O. Kratky*, *Makrom. Chem.* **35 a**, 12 (1960).
- ¹⁸ *A. Guinier*, *Ann. Phys.* **12**, 161 (1939).
- ¹⁹ *G. Porod*, *Kolloid Z.* **124**, 83 (1951).
- ²⁰ *R. J. Siezen* und *E. F. J. van Bruggen*, *J. Mol. Biol.* **90**, 77 (1974).
- ²¹ *O. Glatter*, *Acta Phys. Austriaca* **36**, 307 (1972).
- ²² *J. Berger, I. Pilz, R. Witters* und *R. Lontie*, *Eur. J. Biochem.* **73**, 247 (1977).
- ²³ *J. F. L. van Breemen, G. J. Schuurhuis* und *E. F. J. van Bruggen*, Morphology of Helix pomatia hemocyanin and its subunits. Vth Hemocyanin Meeting, Malta 1976.
- ²⁴ *C. Gielens, G. Préaux* und *R. Lontie*, Structural investigations on β -haemocyanin of Helix pomatia. Vth Hemocyanin Meeting, Malta 1976.

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Prof. Dr. Ingrid Pilz
Institut für Physikalische Chemie
Universität Graz
Heinrichstraße 28
A-8010 Graz
Österreich