

Włodzimierz Michalak, Roman Gondko

STRUKTURA I FUNKCJA HEMOCYJANINY RAKÓW W WARUNKACH
FIZJOLOGICZNYCH

W surowicy 3 gatunków raków występujących w Polsce (*Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus*) oznaczono pH, zawartość kationów (Ca, Mg, Na, K) oraz procentową zawartość poszczególnych składników hemocyjaniny (Hc). Równolegle określono powinowactwo tlenowe surowicy (n , $\log P_{50}$). Pomiedzy badanymi parametrami ustalono związki korelacyjne.

Stwierdzono, że powinowactwo tlenowe surowicy ($\log P_{50}$) determinują zarówno czynniki środowiskowe (pH), jak również udział procentowy składników Hc (%24 S). Wyznaczone współczynniki regresji oraz współczynniki korelacji cząstkowej wskazują na większy udział pH w powinowactwie tlenowym surowicy.

W fizjologicznym zakresie stężeń oznaczane kationy nie wywierały znaczącego wpływu na własności funkcjonalne czy strukturalne hemocyjaniny raków.

WSTĘP

Hemocyjaniny, spełniające w hemolimfie Arthropoda i Mollusca rolę przenośnika tlenu, mogą występować u osobników tego samego gatunku w postaci agregatów (składników) o różnych stałych sedimentacji (Ericsson-Quenssel i Svedberg [5], Jeffrey [8]). Ilość i rodzaj tych składników występujących w stanie fizjologicznym jest zróżnicowana u poszczególnych gatunków. Tak np. u przedstawicieli Merostomata dominuje składnik 60 S, u Arachnida składnik 34 S, u Crustacea składniki 16 S lub 24 S (Johnson [9], Loewe i wsp., [13], Wood [23]).

Stwierdzono, że obecne w hemolimfie *A. leptodactylus* 3 składniki Hc miały następujące stałe sedimentacji - 5 S (monomer), 16 S/heksamer i 24 S (dodekamer). Procentowy ich udział w hemolimfie wynosi odpowiednio 10%, 40% i 50% (Gondko i Michalak [7]).

Ilościowy stosunek składników Hc w badanym środowisku zależy od jego pH oraz stężenia jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (Di Giambardino [6], Morimoto, Kegeles [18], Schutter i wsp. [19]). Wiadomo również, że in vitro powinowactwo tlenowe Hc Arthropoda zależy w dużym stopniu od tych samych czynników (Loewe i wsp. [13], Sevilla i Lagarique [20], Terwilliger [22]).

Zależność tak powinowactwa tlenowego, jak i stanu agregacji hemocyjaniny od tych samych parametrów wskazywałaby na istnienie powiązań pomiędzy czwartorzędową strukturą białka a jego własnościami funkcjonalnymi.

MATERIAŁ I METODY

Hemolimfę pobierano od przedstawicieli 3 gatunków raków występujących w Polsce: *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* i *Orconectes limosus*. Po wykrzepieniu skrzep odrzucano a surowicę odwirowywano przy 10 000 g przez 20 min i sączono przez watę szklaną. Następnie rozcieńczano ją dziesięciokrotnie wodą destylowaną i tak przygotowany roztwór używano do dalszych badań. Oznaczone metodą biuretową stężenie białka wahało się w granicach 1,5-4,0 mg/ml.

Pomiar pH. pH surowicy mierzono przy użyciu pehametru Beckman 4550, stosując mikroelektrodę zespoloną.

Ultrawiirowanie analityczne. Stałe sedimentacji białek surowicy oznaczano stosując pomiar ich szybkości sedimentacji w ultrawiirowce analitycznej typu MOM 3170. Używano dwumiejscowego rotora A 60-2 i dwusektorowej kuwety o grubości 12 mm. Zastosowano następujące warunki wirowania: szybkość rotora 48 000 r.p.m., temperatura 20°C. Do rejestracji stosowano system optyczny Philpota-Svenssona, wykonując zdjęcia co 6 min. Po obróbce filmu wyliczano stałe sedimentacji frakcji białkowych oraz metodą ważenia wyznaczano ich procentową zawartość.

Powinowactwo tlenowe. Powinowactwo tlenowe badano stosując zmodyfikowany tonometr Volvekampa (K o n i n g s [11]). Pomiarów dokonywano na spektrofotometrze Pye Unicam SP 1700 w jednocentymetrowej kuwecie przy długości fali 340 nm. Próbkę 3,5 ml surowicy odpowietrzano za pomocą argonu, a po dodaniu powietrza (2-5 ml) mierzono przyrosty absorpcji.

Zawartość kationów w surowicy. Zawartość wapnia i magnezu mierzono metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej, korzystając z aparatu AAS - 1 Carl Zeiss Jena. Zawartość sodu i potasu oznaczano metodą emisyjnej spektrometrii płomieniowej, dokonując pomiarów tym samym aparatem.

Obliczenia statystyczne. Uzyskane wyniki podano jako wartość średnią ($\bar{x}$) i odchylenie standardowe (s) dla każdego gatunku osobno. Istotność statystyczną różnic międzygatunkowych sprawdzano metodami analizy wariancji (test F Snedecora oraz wyliczenie długości połowy przedziału Duncana - D_m). Wyznaczono współczynniki korelacji r pomiędzy poszczególnymi parametrami. Dla 3 z nich, (pH, $\%24\text{ S}$ i $\log P_{50}$) wyliczono współczynniki korelacji cząstkowej i współczynnik korelacji wielorakiej.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tab. 1 zamieszczono średnie badanych parametrów surowic 3 gatunków raków. Średnią każdego z parametrów wyliczano z danych 7-10 osobników obu płci.

Metodą ultrawirowania analitycznego stwierdzono, że w surowicy badanych raków występują 3-4 frakcje białkowe o stałych sedymentacji równych w przybliżeniu 5 S, 16 S, 24 S i 30 S. Na podstawie naszych wcześniejszych badań (G o n d k o and M i c h a l a k [7]) ustalono, że 3 z nich to składniki hemocyjaniny o następującym stopniu agregacji: 16 S - 6x, 24 S - 12x i 30 S - 18x. Wartości te są podobne do danych dotyczących innych Hc Crustacea (M a r k l i wsp. [15]). Frakcja 24 S (dodekamer Hc) wykazywała największą zmienność (od 24,07 dla *O. limosus* do 24,57 dla *A. astacus*). U kilku osobników *A. leptodactylus* stwierdzono frakcję o stałej sedymentacji 30 S.

Udział procentowy poszczególnych frakcji białkowych wykazuje duże zróżnicowanie osobnicze i gatunkowe. W tab. 2 zamieszczono zawartość procentową składników 16 S i 24 S w surowicy kilku o-

T a b e l a 1

Parametry surowic trzech gatunków raków
Parameters of sera of three crayfish species

Gatunek	Zawartość kationów (g/l x 0,1)				Powinowactwo tlenowe		Stale sedimentacji frakcji białkowych				% zawartość frakcji białkowych				
	pH	Ca	Mg	Na	K	n	log P ₅₀	5S	16S	24S	30S	5S	16S	24S	30S
Orconectes	$\bar{x}$	7,44	0,062	0,0092	0,361	0,041	1,49	0,58	16,52	24,07		5,9	50,8	43,9	
limosus	s	0,14	0,020	0,0029	0,011	0,009	0,37	0,12	0,33	1,22		1,4	8,8	9,5	0,91
Astacus	$\bar{x}$	8,20	0,063	0,0074	0,362	0,043	1,33	0,72	16,84	24,57		4,7	26,5	69,2	3,45
astacus	s	0,21	0,016	0,0032	0,028	0,007	0,24	0,10	0,28	0,51		1,3	14,6	14,9	1,38
Astacus	$\bar{x}$	7,36	0,045	0,0043	0,384	0,047	1,55	0,38	5,45	24,55	30,78	12,9	38,4	46,7	4,8
leptodactylus	s	0,08	0,009	0,0009	0,079	0,010	0,14	0,13	0,52	0,45	1,37	3,5	3,4	5,7	0,20

U w a g a: Średnie wyliczone z 8-10 osobników 1 gatunku; x - wartość średnia, s - odchylenie standardowe.

T a b e l a 2

Σ16 S i Σ24 S u *Orconectes limosus*
 Σ16 S and Σ24 S in *Orconectes limosus*

Osobnik	Σ16 S	Σ24 S
1	43,9	56,1
2	58,9	33,0
3	40,5	53,1
4	53,2	40,9
5	48,6	46,3
6	65,9	28,8
7	45,1	46,7
8	47,6	48,2
9	62,1	33,1
10	42,1	52,9

sobników *O. limosus*. Nawet w obrębie jednego gatunku u niektórych osobników dominującą frakcją raz był dodekamer (24 S), a raz heksamer (16 S).

Można stwierdzić, że składnik 24 S wyraźnie dominuje w surowicy gatunku *A. astacus* (70%). Ten sam agregat przeważa również u *A. leptodactylus* (50%). Natomiast w surowicy *O. limosus* jest odwrotnie, chociaż w tych ostatnich 2 gatunkach stosunki obu frakcji można uważać za równoważne.

Różnice w składzie procentowym mają odzwierciedlenie w wartości stosunku składnika 24 S do 16 S ($\Sigma 24 S / \Sigma 16 S$). Waha się ona od 0,91 (*O. limosus*) do 3,45 (*A. astacus*).

Jest interesującym fakt przewagi ilościowej heksameru (16 S) nad dodekamerem (24 S) u niektórych osobników. Z dotychczasowych prac dotyczących Hc Crustacea wynika, że składnik 24 S występuje w hemolimfie w największej ilości (Markl i wsp. [15]). Wyjątkiem są tu gatunki, w których składnik dodekameryczny jest nieobecny (Brouwer i wsp. [2], Kuiper i wsp. [12], Markl i wsp. [15]).

Tabela 3 przedstawia statystycznie istotne różnice pomiędzy 3 gatunkami raków dla badanych parametrów. Poszczególne gatunki różniły się między sobą w większości określanych parametrów.

Pomiędzy niektórymi parametrami stwierdzono statystycznie istotną zależność korelacyjną (tab. 4). Zarówno ilości Σ16 S, Σ24 S oraz $\log P_{50}$ są wzajemnie skorelowane z pH. Świadczy to o dużym

T a b e l a 3

Statystycznie istotne różnice (+) pomiędzy 3 gatunkami raków
w badanych parametrach (analiza wariancji)

Statistically significant differences
between the three crayfish species
in the parameters studied

Parametr	Test Snedecora ($F_o > F_{0,05}$)	Test Duncana $\bar{y}, -\bar{y}, > D_m (\alpha = 0,05)$		
		O. limosus/ A. astacus	O. limosus/ A. leptodactylus	A. lept./ A. astacus
pH	+	+		+
Ca	+			
Mg	+			
Na				
K				
n				
log P ₅₀	+	+	+	+
% S	+		+	+
%16 S	+	+	+	+
%24 S	+	+		+
%24 S/%16 S	+	+		+

T a b e l a 4

Statystycznie istotne współczynniki korelacji ($P < 0,05$), $n = 24$
Statistically significant correlation coefficients ($P < 0,05$), $n = 24$

Parametr	log P ₅₀	%16 S	%24 S	%24 S/%16 S
pH	0,66	-0,70	0,82	0,77
%24 S	0,51			

wpływie tego czynnika na funkcję i stopień agregacji Hc. Stwierdzono również korelację pomiędzy procentową zawartością składnika 24 S a wartością log P₅₀. Dla ustalenia wpływu pH (środowisko) i zawartości składnika 24 S (struktura Hc) na powinowactwo tlenowe surowicy wyznaczono równanie regresji posiadające następującą postać:

$$X_{\log P_{50}} = 0,80538X_{\text{pH}} + 0,01750X_{\%24 S} - 4,67726.$$

Wyższy współczynnik przy X_{pH} sugeruje większy wpływ pH na powinowactwo tlenowe. Potwierdzały to wyliczone współczynniki korelacji cząstkowej:

$$r_{\log P_{50}/\%24 S \cdot pH} = 0,0629$$

$$r_{\log P_{50}/pH \cdot \%24 S} = 0,6452$$

przy tym współczynnik wykluczający oddziaływanie $pH(0,0629)$ nie był statystycznie istotny. Natomiast współczynnik korelacji wielorakiej dla $\log P_{50}$ ($r_{\log P_{50} \cdot pH/\%24 S} = 0,6418$) jest istotny statystycznie przy $P < 0,05$.

Stwierdzono też, że zawartość kationów Ca, Mg, Na i K w fizjologicznym zakresie ich stężeń nie jest skorelowana z własnościami funkcjonalnymi i strukturalnymi Hc.

Z doniesień innych autorów wynika, że poszczególne podjednostki Hc (łańcuchy) różnią się pomiędzy sobą własnościami funkcjonalnymi (D e c k e r i wsp. [4], M a r k l i wsp. [15], S u l l i v a n i wsp. [21]). W hemolimfie jednak pojedyncze łańcuchy występują w bardzo małych ilościach. Uważa się powszechnie, że dopiero heksamer jest najmniejszą cząsteczką Hc, pełniącą rolę nośnika tlenowego w hemolimfie. Wiadomo też, że u niektórych Arthropoda różnice w powinowactwie tlenowym poszczególnych składników są znaczne (A r i s a k a i V a n H o l d e [1], L o e w e i wsp. [13], M i l l e r i V a n H o l d e [17]). Nasze wcześniejsze badania nie wykazały dużych różnic we własnościach funkcjonalnych heksameru i dodekameru Hc A. leptodactylus (G o n d k o i M i c h a l a k [7]). Niemniej fakt ich istnienia pozwala przypuszczać, że własności funkcjonalne Hc Crustacea mogą być regulowane stopniem agregacji tego białka. Statystycznie istotny współczynnik korelacji pomiędzy $\log P_{50}$ a $\%24 S$ potwierdzałby tę tezę, chociaż wcześniejsze badania C h a n t l e r i wsp. [3] oraz J o h n s t o n i wsp. [9] takich korelacji nie wykazały. Autorzy ci nie stwierdzili również korelacji pomiędzy poziomem jonów wapnia i stopniem agregacji białka w warunkach fizjologicznych. W niniejszych badaniach nie stwierdzono także korelacji pomiędzy stężeniem badanych kationów a własnościami funkcjonalnymi i strukturalnymi Hc. Wpływ jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} na stopień agregacji wyizolowanej Hc A. leptodactylus in vitro opisano już wcześniej (G o n d k o i M i c h a l a k [7]).

W 1981 r. Miller i Van Holde, badając wpływ stopnia zasolenia wody na funkcję i strukturę hemocyjaniny *Callinasa californiensis*, stwierdzili, że stabilność funkcji Hc wynika bezpośrednio ze zmian występujących na poziomie molekularnym tego białka. Zatem powiązania strukturalno-funkcjonalne były w tym wypadku udokumentowane. Jednak Hc *Callinasa* charakteryzuje odmienny sposób agregacji niż Hc pozostałych Crustacea. Agregacja następuje tutaj bezpośrednio ze składnika 16 S do składnika 39 S z pominięciem formy 24 S. Uogólnianie tych zależności na inne hemocyjaniny byłoby więc przedwczesne.

LITERATURA

- [1] Arisaka F., Van Holde K. E. (1979), *J. Mol. Biol.*, 134, 41-73.
- [2] Brouwer M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1978), *Biochemistry*, 17, 2148-2154.
- [3] Chantler E. N., Harris R. R., Bannister W. H. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 46A, 333-343.
- [4] Decker H., Markl J., Loewe R., Linzen B. (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360, 1505-1507.
- [5] Ericksson-Quenssel J. B., Svedberg T. (1936), *Biol. Bull.*, 71, 498-547.
- [6] Di Giambardino L. (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 273-278.
- [7] Gondko R., Michalak W. (1980), [in:] *Invertebrate oxygen binding proteins*, eds J. Lamy, J. N. Lamy, M. Dekker, New York, 41-48.
- [8] Jeffrey P. D. (1979), *Biochemistry*, 18, 2509-2512.
- [9] Johnson M. L., Yphantis D. A. (1978), *Biochemistry*, 17, 1448-1455.
- [10] Johnston W., James T. W., Barber A. A. (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, 22, 261-267.
- [11] Konings W. N. (1969), *Structure and function of hemocyanin* Ph. D. Thesis, Rijksuniversiteit Groningen.
- [12] Kuiper H. A., Gaastra W., Beintema J. J., Van Bruggen E. F. J., Schepman A. M. H., Drenth J. (1975), *J. Mol. Biol.*, 99, 619-629.
- [13] Loewe R., Schmidt R., Linzen B. (1977),

- [in:] Structure and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin, 50-54.
- [14] Markl J., Hofer A., Bauer G., Markl A., Kempter M., Brenzinger M., Linzen B. (1979), J. Comp. Physiol., 133, 167-175.
- [15] Markl J., Bonaventura C., Bonaventura J. (1981), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 429-437.
- [16] Miller K., Van Holde K. E. (1974), Biochemistry, 13, 1668-1674.
- [17] Miller K. J., Van Holde K. E. (1981), J. Comp. Physiol., 143, 261-268.
- [18] Morimoto K., Kegeles G. (1971), Arch. Biochem. Biophys., 142, 247-257.
- [19] Schutter W. G., Van Bruggen E. F. J., Bonaventura J., Bonaventura C., Sullivan B. (1977), [in:] Structure and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin, 13-21.
- [20] Sevilla C., Lagarique J. G. (1979), Comp. Biochem. Physiol., 64, 531-536.
- [21] Sullivan B., Bonaventura J., Bonaventura C. (1974), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2558-2562.
- [22] Terwilliger N. B., Terwilliger R. C., Applestein M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1979), Biochemistry, 18, 102-108.
- [23] Wood E. J. (1980), Assays Biochem., 16, 1-47.

Laboratorium Nauk Biologicznych
Uniwersytet Łódzki

Włodzimierz Michalak, Roman Gondko

STRUCTURE AND FUNCTION OF CRAYFISH HEMOCYANIN UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

The following parameters were determined in the serum of three crayfish species occurring in Poland (*Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* Orconectes limosus): pH, cations content (Ca, Mg, Na, K) and per cent content of individual hemocyanin (Hc) components. In parallel, oxygen affinity of the serum ($n, \log P_{50}$) was measured. Correlation relationship were checked between the parameters studied.

It was found that the oxygen affinity of the serum ($\log P_{50}$) is determined by both environmental factors (pH) and per cent content of various Hc Components (%24 S). Regression coefficients and partial correlation coefficients determined point to a greater effect of pH on the oxygen affinity of the serum.

The cations studied did not exert any significant effects on the functional and structural properties of crayfish hemocyanin within the physiological range of concentrations.