ACTA UNIVERSITATIS LODZIENSIS FOLIA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA 6, 1988

Włodzimierz Michalak, Roman Gondko

HEMOCYJANINY STAWONOGÓW

W pracy przedstawiono najnowsze hipotezy, dotyczące struktury hemocyjaniny (Hc) stawonogów. Omówiono szczegółowo budowę składników tego białka. Zwrócono również uwagę na heterogenność Hc na poziomie łańcuchów polipeptydowych. Określono rolę, jaką spełniają poszczególne podjednostki (łańcuchy) w budowie większych agregatów hemocyjaniny.

WSTĘP

ł

Do grupy białek oddechowych zaliczamy proteiny transportujące tlen, spełniające tym samym istotną rolę w oddychaniu organizmów aerobowych. Dotychczas najlepiej poznana została budowa i funkcja barwnika krwi i mięśni kręgowców: hemo- i mioglobiny [115, 119], metaloprotein zawierających związane hemowo żelazo [82].

Bardziej zróżnicowane pod względem budowy i funkcji okazały się być białka przenoszące tlen u bezkręgowców. W tej grupie

Tabela 1

Typ białka	Grupa prostetyczna	Steichiometria wiązania O ₂	Barwa formy oksy-	Literatura
Hemoglobina bezkręgowców	protoporfiryna IX-FeII	Fe : 02	czerwona	[13]
Mioglobina bezkręgowców	protoporfiryna IX-FeII	Fe : 02	czerwona	[5]
Chlorokruoryna	chlorochem	Fe : 02	zielona	[13, 26]
Hemoerytryna	FeIII	2Fe : 0,	purpurowa	[38]
Hemocyjanina	CuII	2Cu : 02	niebieska	[17]

Białka oddechowe bezkręgowców Respiratory proteins in invertebrate

[145]

W. Michalak, R. Gondko

zwierząt poza wymienionymi już hemo- i mioglobinami, jak również hemoglobinami polimerycznymi, zwanymi dawniej erytrokruorynami, występują chlorokruoryny, hemoerytryny i hemocyjaniny [28, 38, 56].

Wspólną cechą wymienionych białek jest obecność atomów metalu (Fe, Cu) w cząsteczce oraz związane z tym charakterystyczne zabarwienie i zdolność odwracalnego przyłączania tlenu (tab. 1). Większość z nich (hemoglobiny, chlorokruoryny, hemocyjaniny) posiada strukturę polimeryczną.

Ogólne własności hemocyjanin

Pośród białek przenoszących tlen szczególne miejsce zajmują hemocyjaniny (Hc), ponieważ metalem wbudowanym w ich cząsteczkę jest nie żelazo lecz miedź [15, 21, 107]. Hemocyjaniny są obecne w hemolimfie większości przedstawicieli dwu typów zwierząt - Arthropoda (stawonogi) i Mollusca (mięczaki) [20, 115].

Hemocyjaniny są bezpośrednio rozpuszczone w hemolimfie, a ich stężenie wynosi 0,3-100 mg/ml u Arthropoda oraz 10-115 mg/ml u Mollusca [39].

Wspólną cechą hemocyjanin Arthropoda i Mollusca jest sposób wiązania tlenu. Cząsteczka O₂ zostaje przyłączona do dwóch atomów miedzi znajdujących się w "centrum aktywnym" makrocząsteczki [39, 107]. Większość badaczy skłania się ku tezie, że w białku występującym w formie odtlenowanej oba atomy miedzi są na +1 stopniu utlenienia [9, 53, 54, 63]. Podczas przyłączania tlenu następuje zmiana wartościowości obu atomów Cu [108, 113]. Tak więc w formie utlenowanej (HCO₂) miedź występowałaby na +2 stopniu utlenienia.

Forma utlenowana Hc ma barwę niebieską, uwarunkowaną obecnością wiązania Cu-O₂. Wykazuje ona charakterystyczne pasma absorpcji w ultrafiolecie (280 nm, 340 nm) i w świetle widzialnym (570 -580 nm) [21, 96, 107]. Forma odtlenowana jest bezbarwna. Widma ORD i CD natywnej hemocyjaniny są typowe dla białek globularnych z niewielką ilością struktur uporządkowanych (14% α -helisy i 29% β -struktury) [66].

Hemocyjaniny Arthropoda i Mollusca posiadają podobny skład aminokwasowy. Białka te charakteryzują się dużą ilością (do 25%) kwasów dikarboksylowych, oraz niewielką zawartością cysteiny (1--2%) i metioniny (2-3%) [21, 85, 89, 118]. Integralną częścią

białka są też węglowodany (3% w Hc Arthropoda i 9% u Mollusca) [39, 116]. Analiza składu aminokwasowego hemocyjanin obu typów sugeruje, że Hc Arthropoda i Mollusca nie wykazują homologii i są raczej produktem funkcjonalnej konwergencji [22, 23].

Struktura hemocyjanin Arthropoda i Mollusca

Mimo posiadania kilku wspólnych cech (zbliżony skład aminokwasowy, sposób wiązania tlenu, barwa) hemocyjapiny Arthropoda i Mollusca różnią się pod względem strukturalnym. Już w 1936 r. E r i c k s s o n-Q u e n s s e l i S v e d b e r g [20] stwierdzili, że hemocyjaniny różnych gatunków zwierząt posiadają zróźnicowane stałe sedymentacji. I tak wielkość stałych sedymentacji Hc Mollusca określono na 60, 100 i 130 S, natomiast dla Hc Arthropoda wynoszą one 5, 16, 24, 35 i 60 S. Często w hemolimfie może koegzystować kilka typów cząsteczek Hc [71, 74, 115].

Hemocyjaniny Mollusca zawierają 2,4-2,6 µg Cu/mg białka.Oznacza to, że 1 gramoatom miedzi przypada na 24 000-26 000 gramów białka [21, 38]. Zatem cząsteczka tlenu jest wiązana przez fragment o masie co najmniej 50 000 daltonów i jest to tzw. minimalna podjednostka funkcjonalna Hc. Natomiast Hc Arthropoda zawierają 1,7-1,9 µg Cu/mg białka [21, 39, 115]. W tym wypadku najmniejsza podjednostka funkcjonalna hemocyjaniny ma ok. 72 tys. daltonów. Wartość ta odpowiada średniej masie cząsteczkowej pojedynczego łańcucha polipeptydowego [115, 119]. W odróżnieniu, łańcuch polipeptydowy Hc Mollusca jest znacznie większy. Jego masa wynosi 300-400 tys. daltonów i zawiera on 8 miejsc wiążących tlen [24, 64].

Podcząs obserwacji cząsteczek Hc w mikroskopie elektronowym zauważono różnice w budowie hemocyjanin obu typów. Hemocyjanina homara Panulirus interruptus o stałej sedymentacji 16 S jest widoczna w mikroskopie elektronowym w postaci kwadratów, prostokątów bądź sześciokątów z maksymalnymi wymiarami 10-12 nm [119]. Tymczasem w przypadku cząsteczek Hc Mollusca pojedynczy łańcuch polipeptydowy obserwowano w postaci rozciągniętego sznurka, a cząsteczka niezdysocjowana to cylinder o średnicy 35 nm i wysokości u Gastropoda 35 nm, u Cephalopoda 17 nm [119]. Przedstawione fakty przemawiają za tym, iż hemocyjaniny Mollusca i Arthropoda mimo szeregu cech wspólnych stanowią odrębne grupy białek. Dalszą część artykułu poświęcono omówieniu właściwości fizyko-chemicznych hemocyjanin Arthropoda.

W. Michalak, R. Gondko

Fizyko-chemiczne własności składników Hc

Pierwsze badania wielkości makrocząsteczek dotyczyły m. in. właśnie hemocyjanin. W 1936 r. Ericksson-Quensel i Svedberg [20] poddali wirowaniu analitycznemu w różnym pH rozcieńczoną hemolimfę niektórych gatunków typu Arthropoda (tab. 2).

Stałe sedymentacji białek hemolimfy niektórych Arthropoda [20] Constant of sedimentation of hemolymph proteins in some Arthropoda [20]

Tabela 2

Gatunek	all and the second	Stałe sedyme	ntacji biał	ek hemolimf;	у.
Limulus polyphemus	56,6	36,4	24,0	16,1	5,87
Pandalus borealis		1	22,9	17,4	-
Palinurus vulgaris	-		-	16,4	4,1
Nephrops norvegicus	61 422 M	1.1.1	24,5	17,1	.5,97
Astacus fluviatilis	12.2	1.1.1.2	23,5	16,3	4,02
Cancer pagurus	1.1.1	32,7	23,6	16,4	4,71

Stwierdzono wówczas, że w fizjologicznym pH (7,2-7,6) stałe sedymentacji białek, występujących w hemolimfie poszczególnych gatunków, różniły się między sobą. Ponadto u tego samego osobnika mogą równocześnie występować cząsteczki Hc o różnych stałych sedymentacji. Zauważono, że w hemolimfie zawsze dominowała frakcja Hc o najwyższej stałej sedymentacji.

W miarę zwiększania pH środowiska obserwowano wzrost liczby cząsteczek o niższych stałych sedymentacji. Wobec czego wysunięto wniosek, iż cząsteczki te są produktami alkalicznej dysocjacji natywnych cząsteczek Hc charakteryzujących się największą stałą sedymentacji pośród białek hemolimfy [16, 20].

Do chwili obecnej, wykorzystując szereg różnorodnych metod analitycznych (ultrawirowanie analityczne, filtracja żelowa, dyspersja światła), określono stałe sedymentacji hemocyjanin kilkudziesięciu gatunków stawonogów. Białka te ze względu na wielkości stałych sedymentacji podzielono na kilka klas. Wyróżniono wg rosnących stałych następujące klasy: 4-6 S, 14-17 S, 22-25 S, 34-39 S i 55-60 S. Cząsteczki te nazwano składnikami lub też kompotentami hemocyjanin. Dla uproszczenia przyjęto klasyfikację składników Hc wg przybliżonych stałych sedymentacji. Dlatego w

dalszej części pracy używano skróconego oznaczenia tj. 5 S, 16 S, 24 S, 36 S i 60 S. W tab. 3 przedstawiono rodzaje składników hemocyjanin różnych gatunków Arthropoda.

Tabela 3

Gatunek	5 S 1-mer	16 S 6-mer	24 S 12-mer	36 S 24-mer	60 S 48-mer	Literatu- ra
MEROSTOMATA Limulus polyphemus Tachypleus tridentatus	0	0		o	x x	[20] [99]
ARACHNIDA Eurypelma californicum Eurypelma helluo Cupiennius salei Androctonus australis Pandinus pallidus Mastigoproctus brasilianus Trichodamon froesi Tarantula palmata		x	x	x x x x x x x x x		[59] [59] [74] [74] [74] [74] [74] [74]
CRUSTACEA Callianasa californiensis Cacer pagurus Ligia exotica Ligia pallasi Cancer magister Callinectes sapidus Homarus americanus Cherax destructor Carcinus maenas Homarus gammarus Maja squinado Hyas araneus Macropipus holsatus Homarus vulgaris Astacus astacus Astacus leptodactylus Orconectes limosus Pandalus borealis Carcinus mediterraneus Potamon edulis Eriphia spiniphrons Silviocarcinus pandalinus Macrobranchium amazonicum Jasus edwardsii Panulirus interruptus Palinurus vulgaris Panaeus setiferus Bathynomus giganteus	0 0 0 0 0 0 0	*********************************	× × × × × × × × × × × × × × × × × × ×	x x 295		[90] [20, 87] [106] [105] [18, 55] [27, 29] [83] [80] [10] [71] [71] [71] [71] [71] [71] [71] [71

Składniki hemocyjanin Arthropoda Hemocyanin components of Arthropoda

U w a g a: o - składnik obecny w małej ilości.

W. Michalak, R. Gondko

Składnik Hc o największej wartości (60 S) występuje tylko w gromadzie Merostomata (staroraki). U Arachnida (pająki, skorpiony dominuje składnik o stałej 36 S (za wyjątkiem Hc pająka Cupiennius salei) [59, 77]. Stosunkowo najlepiej zbadana gromada - Crustacea (skorupiaki) zawiera głównie składniki 24 S i 16 S. Wyjątek stanowią gatunki Callianasa californiensis i Cancer pagurus, u których obserwowano w hemolimfie głównie składnik 36 S [87, 90]. Z drugiej strony, u części przedstawicieli tej gromady dominującym składnikiem okazała się być cząsteczka o stałej sedymentacji 16 S.

Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że Hc Arthropoda występuje w warunkach fizjologicznych w formie składników 16 S, 24 S, 36 S i 60 S. W niewielkich ilościach w hemolimfie niektórych gatunków występował składnik najmniejszy - 5 S [10, 20, 25, 87, 106].

Dysocjacja alkaliczna hemocyjaniny

Jedna z właściwości hemocyjanin Arthropoda to dysocjacja cząsteczek pod wpływem alkalizacji środowiska. Tak np. Hc Astacus fluviatilis reagowała na wzrost pH środowiska (3,6-11,8 zmniejszeniem ilości składnika 24 S z równoczesnym wzrostem ilości składnika 16 S [20].

Metodą pomiaru dyspersji światła Di Giamberardino [16] stwierdził, że ze wzrostem pH masa cząsteczkowa Hc Eriphia spiniphrons zmniejszała się znacznie (739 tys. w pH 6 i 85 tys. w pH 9,5). Proces ten okazał się być niezależny od stężenia hemocyjaniny i siły jonowej środowiska. Podobne badania wykonano dla innych hemocyjanin [12, 24]. Picket [83] stwierdził, że w obecności jonów Ca²⁺ Hc Homarus americanus posiadała stałą sedymentacji 22-24 S i masę cząsteczkową 825 000. Usunięcie ze środowiska jonów wapnia w pH 8,4 spowodowało dysocjację Hc do podjednostek (składnik 16 S). Dalszy rozpad do cząsteczek 4 S następował wraz ze wzrostem pH do 9,3.

Cząsteczka 4 S (68 000) odpowiada masą najmniejszej podjednostce funkcjonalnej, wiążącej jedną cząsteczkę tlenu. Z porównania mas wszystkich komponentów tej Hc wynikałoby, że składnik 24 S zawiera 12 podjednostek 4 S, a składnik 16 S miałby ich 6. Tak więc Hc 24 S byłaby dodekamerem, a Hc 16 S heksamerem najmniejszej podjednostki funkcjonalnej (4 S). Taką samą strukturę tych 2 składników opisali również Morimoto i Ke-

g e l e s [79] oraz E l l e r t o n i wsp. [18]. Z uwagi na fakt, że w hemolimfie w zasadzie najmniejszym składnikiem Hc jest heksamer (16 S), został on nazwany przez niektórych autorów monomerem, a jego kolejne stopnie dimeryzacji – dimerem, tetramerem i oktamerem tego składnika. W tab. 4 przedstawiono podjednostkową strukturę hemocyjanin Arthropoda.

Tabela 4

Struktura hemocyjanin Arthropoda Hemocyanin structure of Arthropoda

Wyszczególnienie	Liczba peptydów							
	1	6	12	24	48			
Stała sedymentacji	5 S	16 S	24 S	36 S	60 S			
Masa cząsteczkowa (w tys.)	75	430	840	1720	3300			

Jony Ca²⁺ i H⁺ mają istotny wpływ na proces dysocjacji hemocyjaniny. Z reguły usunięcie dwuwartościowych kationów i doprowadzenie pH środowiska do ok. 10 powoduje całkowitą dysocjację cząsteczek Hc do łańcuchów polipeptydowych. Jednak wpływ tych czynników okazał się być zróżnicowany i zależny od rodzaju hemocyjaniny. Przykładem odmiennego zachowania jest dysocjacja Hc Limulus polyphemus, podczas której składnik 60 S rozpada się w określonych warunkach na monomery, dimery i tetramery komponentów 16 S - (tab. 5) [95].

Tabela 5

Zależność dysocjacji Hc Limulus polyphemus od warunków środowiska [95]

Dissociation dependence of Limulus polyphemus Hc on environmental condition

pH	Hemolimfa rozcieńczona 200x	+1 M NaCl	+0,01 M EDTA
5,5	8	8, (4), (2), (1)	(4), 2, 1
6,5	8	8	(6), 4, (2)
7,5	8, (4)	8	4, (2)
8,5	(8), 4, (2), (1)	8	0
9,5	(6), 4, 2, 1	8, (4)	0

U w a g a: 8 - oktamer 16 S (60 S), 6 - heksamer 16 S, 4 - tetramer 16 S (36 S), 2 - dimer 16 S (24 S), 1 - 16 S, 0 - monomer 5 S, () - składniki występujące w małych ilościach.

Rozpad Hc Limulus polyphemus następował dopiero w pH wyższym od 8,0. Duże stężenie NaCl (1 M) hamuje dysocjację, natomiast w obecności 0,01 M EDTA w pH 8,5 hemocyjanina dysocjowała całkowicie do monomerów 5 S (tab. 5).

W przypadku hemocyjaniny krewetki Callianasa californiensis cząsteczka 39 S w pH 7,6 i w nieobecności dwuwartościowych kationów rozpadała się na mniejsze, natywne składniki 25 S [90]. Podwyższenie pH do 8,4 powodowało dalszą dysocjację do składników 17 S, występujących w 2 formach "I" i "C". Po ponownym dodaniu jonów wapnia lub magnezu jedynie forma "C" reasocjowała do składnika 39 S. Całkowita dysocjacja tej hemocyjaniny na podjednostki 4-5 S następowała w pH 9,4. W tym przypadku w roztworze była obecna mieszanina monomerów i dimerów (5 S i 7 S). Następnie dimery mogły być rozdysocjowane do monomerów pod wpływem EDTA [90].

Na proces dysocjacji hemocyjanin mogą również oddziaływać jony innych metali. Proces dysocjacji Hc Androctonus australis najsilniej hamują sole magnezu, wapnia i manganu, najsłabiej zaś sole potasowe i amonowe [43].

Jednak nie w każdym przypadku usunięcie jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ oraz zwiększenie pH było wystarczające do całkowitego rozpadu cząsteczki Hc. Dysocjacja hemocyjaniny skorpiona Androctonus australis do podjednostek 5 S wymagała obecności mocznika w stężeniu 1 M [50]. Dodatek czynników redukujących był również niezbędny do procesu dysocjacji Hc pająka Cupiennius salei [68]. Na podstawie przytoczonych przykładów można przypuszczać, że podjednostki Hc (5 S) Arthropoda mogą być powiązane w większe agregaty nie tylko przy udziale wiązań wodorowych, ale także jonowych czy kowalentnych.

Heterogenność podjednostek (monomerów 5 S)

W określonych warunkach hemocyjaniny Arthropoda ulegają dysocjacji do najmniejszych podjednostek o stałej sedymentacji 5 S. Badania produktów takiej dysocjacji wykazały, że hemocyjanina 5 S jest elektroforetycznie heterogenna. Tak np. podjednostka 5 S kraba Carcinus maenas podczas rozdziału elektroforetycznego na octanie celulozy rozdzielała się na 2 frakcje [10]. Podobne właściwości wykazuje Hc Cancer magister. Carpenter i Van Holde po dializie tej Hc do buforu węglanowego o pH 9,93 stwierdzili, że podczas elektroforezy rozdzieliła się ona na 2 frakcje o masach

cząsteczkowych 76 000 i 86 000, występujące w równoważnych ilościach [11]. Metodą elektroforezy regularnej i elektroforezy z SDS określono heterogenność podjednostkową kilkunastu hemocyjanin Arthropoda (tab. 6).

Tabela 6

Gatunek	Liczba podjednostek (łańcuchów)	Literatura
MEROSTOMATA		
Limulus polyphemus	5-12	[30, 74, 101]
Tachypleus tridentatus	5	[99]
ARACHNIDA	and the first the	
Androctonus australis	6	[52]
Androctonus hector	6	[43]
Eurypelma californicum	7	[49]
Argiope bruennichii	4	[99]
Heterometrus sp.	5	[99]
CRUSTACEA		
Cancer magister	2-6	[11, 55, 60]
Callinectes sapidus	2	[27, 29]
Cherax destructor	3-6	[67, 80]
Jasus edwardsii	2	[86]
Ovalipes catharus	3	[86]
Astacus astacus	. 3	[89]
Astacus leptodactylus	4	[25]
Cancer pagurus	2	[8]
Ligia italica	5	[97]
Ligia exotica	1	[106]
Armadillo officinalis	5	[97]

Heterogenność podjednostek hemocyjanin niektórych Arthropoda Subunits heterogeneity of some Arthropoda Hc

Jak wynika z przedstawionych faktów, heterogenność hemocyjanin wykryto również na poziomie najmniejszych podjednostek funkcjonalnych. Ponieważ większość badaczy utożsamia cząsteczkę 5 S z pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, można więc mówić również o heterogenności łańcuchów polipeptydowych.

Kolejnym etapem badań nad hemocyjaniną było wyizolowanie pojedynczych łańcuchów polipeptydowych i zbadanie ich własności fi-

zykochemicznych. Wyizolowanie podjednostek Hc na skalę preparatywną okazało się rzeczą trudną. Hemocyjanina Limulus polyphemus po potraktowaniu EDTA w pH 9 oraz przejściu przez kolumnę z DEAE-Sephadex A-50 rozdzieliła się na 5 frakcji (I-V) [101]. Występowały one w hemocyjaninie w stosunku 1 : 1 : 3 : 1 : 0,7 i różniły się masą cząsteczkową, powinowactwem tlenowym oraz mapą peptydową po trawieniu z CNBr [102]. Jednak późniejsze badania tych frakcji wykazały, że nie są one homogenne elektroforetycznie [6, 30].

Do rozdzielenia podjednostek nie są wystarczające metody chromatografii kolumnowej (filtracji żelowej czy też chromatografii jonowymiennej). Z reguły konieczne jest połączenie metod filtracji żelowej, chromatografii jonowymiennej, a także preparatywnej elektroforezy regularnej lub elektroforezy w gradiencie żelu poliakryloamidowego. Homogenność wyizolowanych łańcuchów ocenia się metodami elektroforetycznymi i immunoelektroforetycznymi [6, 72].

W tab. 7 przedstawiono stałe sedymentacji i masy cząsteczkowe wyizolowanych podjednostek hemocyjaniny skorpiona [43].

Tabela'7

Stałe sedymentacji i masy cząsteczkowe podjednostek hemocyjaniny Androctonus australis [43] Sedimentation constants and molecular weights of subunits of Androctonus australis Hc [43]

Unanananélatanta	Podjednostki							
wyszczegoinienie	1	2	3	4	5	6	x	
Stała sedymentacji			1.5		12211328		and the second	
monomeru	-	5,52	4,53	4,46	4,47	4,73	-	
dimeru	6,81	-	-	-	6,60	-	-	
Masa cząsteczkowa (w tys.)	70,5	68,5	71,1	66,0	69,0	65,5	68,5	

Zależnie od gatunku, jak również w zależności od stosowanej metody masa cząsteczkowa podjednostek 5 S Hc Arthropoda waha się w granicach 55 000-90 000. Podjednostki posiadają też różne punkty izoelektryczne [75, 89].

Cechą różnicującą podjednostki 5 S Hc jest ich skład aminokwasowy. Już samo istnienie kilku grup C- i N-końcowych jest przesłanką na obecność większej liczby łańcuchów polipeptydowych

hemocyjaniny tego samego gatunku [11, 81, 89, 112]. W tab 8 przedstawiono skład aminokwasowy 7 łańcuchów hemocyjaniny Eurypelma californicum [78].

Tabela 8

Skład aminokwasowy (w resztach) łańcuchów polipeptydowych Hc Eurypelma californicum [78]

Amino acid composition (is residues) of polypeptide chains in Eurypelma californicum Hc [78]

Lancuch	а	b	c2	c4	d	e	f	Średnia
Liz	46	24	33	27	33	38	29	34
His	38	22	33	21	24	26	29	27
Arg	52	39	51	23	35	40	52	43
Asp	70	68	86	73	89	94	77	81
Tre	31	36	32	30	31	33	39	33
Ser	26	37	41	40	55	33	45	40
Glu	53	60	58	77	68	63	74	65
Pro	19	31	22	32	29	28	16	24
Gli	32	45	65	84	62	54	49	54
Ala	42	30	- 39	56	42	38	47	42
Wal	27	42	28	37	34	36	31	33
Met	9	9	13	19	12	16	17	14
Ileu	2.5	25	17	22	28	30	18	24
Leu	48	52	47	51	63	57	68	56
Tyr	23	26	24	19	23	27	30	25
Fen	32	33	30	26	30	35	33	32
1/2 Cys	3	9	No	7	No	5	No	-
Try	2	8	8	15	8	5	6	7

U w a g a: Przyjęto następujący skład procentowy: a - 15%, b - 8,3%, c₂ - 15%, c₄ - 8,3%, d - 15%, e - 19%, f - 19%; No - nie oznaczono.

Poszczególne łańcuchy wykazują znaczne zróżnicowanie w zawartości lizyny, histydyny, argininy, seryny, proliny, glicyny i alaniny przy względnie stałych ilościach aminokwasów alifatycznych, aromatycznych i hydroksylowych. Wskazuje to na zachowanie strukturalnych powiązań w czasie ewolucji podjednostek Hc.

W przypadku innych gatunków, hemocyjaniny wykazują mniejsze zróżnicowanie pod względem składu aminokwasowego łańcuchów polipeptydowych. Stwierdzono to dla Hc Tachypleus tridentatus czy

W. Michalak, R. Gondko

też Hc Cherax destructor [66, 100]. Podobieństwo monomerów Hc Tachypleus tridentatus wykazali T a k a g i i N e m o t o [104] badając ich N-końcową sekwencję. Dla pięciu łańcuchów Hc tego gatunku oznaczonych jako α , β , γ , δ i ε sekwencja była taka sama: -Tre-Ile-Leu-Liz-Gli-Liz-Gln. Jedynie łańcuch δ posiadał inna sekwencję tj. -Wal-Ileu-Asp-X-Ileu-Leu-Glu-Liz.

Znacznie większe zróżnicowanie wykazuje N-końcowa sekwencja 7 podjednostek skorpiona Androctonus australis [35] (tab. 9). Aminokwasem N-końcowym 4 łańcuchów Hc Androctonus jest treonina (2, 4, 5B, 6). 6 łańcuchów hemocyjaniny tego gatunku posiada leucynę, walinę lub izoleucynę w pozycji 2 i lizynę w pozycji 5. W tab. 9 umieszczono również dla porównania N-końcową sekwencję łańcuchów innych hemocyjanin Arthropoda. Mimo widocznych różnic istnieją także pewne homologie, np. pomiędzy frakcją IV Limulus i

Tabela 9

Sekwencja łańcuchów polipeptydowych od N-końca hemocyjaniny niektórych Arthropoda

N-terminal sequence of polipeptide chains of some Arthropoda Hc

Łańcuch	Częściowa sekwencja od N-końca	Literatura
Tachypleus tridentatus	1 5 10 15 20	
α	TIKEKQASILALFEHLTSVP	[81]
χ + δ	T I ^a K E K Q N R P	[104]
β + ε΄	T I ^a K E K Q	[104]
δ	V L D X I ^b E K	[104]
Limulus polyphemus frakcja IV	TLKEKQDXIL	[35]
Eurypelma californicum e	PDKQKQLRVISLFEHMTSIN	[94]
Androctonus australis 2	TVKEKQDRIIPLFE	[35]
4	TVKEKQQXI ^b I ^b SI ^b FK	[35]
6	TVADKXARLPL	[35]
5A	GVQDKQERLLPLFD	- [35]
3B .	XLHEKQIRILKLFK	[35]
5B	TLNIEEKXXXLL	[35]
3C	APINIQRRILSLFE	[35]
Panulirus interruptus	DALGTGNAQKQ	[112]

U w a g a: X - aminokwas niezidentyfikowany, a- I i L, b - I lub L.

łańcuchami 2 i 4 Androctonus. Największą konserwatywność posiada region 5-6 (sekwencja -K-Q-) oraz 12-18 (sekwencja -L-F-X-H-X-T--S-). Homologie te świadczyłyby o wspólnym pochodzeniu badanych łańcuchów polipeptydowych.

Ustalenie faktycznej tzn. rzeczywistej liczby monomerów Hc występujących w określonym gatunku nie jest sprawą prostą. Dotychczas liczba ustalonych podjednostek Hc zależała w dużym stopniu od postępowania analitycznego. W miarę stosowania coraz doskonalszych metod analitycznych liczba podjednostek obserwowanych w Hc określonego gatunku zwiększała się. Typowym tego przykładem była liczba monomerów Hc Limulus polyphemus. Początkową ich liczbę -5, ustalił w 1974 r. Sullivan iwsp. [101], stosując metodę chromatografii jonowymiennej. W 1979 r. metodą immunoelektroforezy ustalono ich liczbę na 8 [30, 48]. Ostatnio Markl i wsp. [71, 74] zastosowali metodę tzw. "elektroforezy krzyżowej" porównując rozdziały elektroforetyczne w gradiencie żelu poliakryloamidowego z elektroforezą z SDS. Tym sposobem określono liczbę monomerów Hc Limulus polyphemus na 12 [74]. Podobną metodą B r enowitz [6] w 1981 r. wykazał istnienie w Hc Limulus 16 frakcji, różniących się elektroforetycznie, ale nieodróżnialnych immunologicznie. Autor sugerował, że identyczne immunologicznie podjednostki pełnią tę samą rolę w budowie większych składników hemocyjaniny, mimo różnic we właściwościach elektroforetycznych. Najprawdopodobniej faktyczna liczba podjednostek Hc Limulus wynosi jednak 8.

Również w przypadku hemocyjaniny skorpiona Androctonus australis obserwowano pierwotnie 6 [52], następnie 7 [49], a wreszcie 8 [47] różnych monomerów.

Równocześnie u niektórych gatunków nie wykryto heterogenności na poziomie łańcuchów polipeptydowych. Przykładem są tu hemocyjaniny 3 gatunków Crustacea - Panulirus interruptus [40]. Ligia exotica [106] i Panaeus setiferus [8].

U kilku gatunków Arthropoda po potraktowaniu Hc środkami redukującymi wykazano zmianę liczby obserwowanych monomerów [33, 70, 71, 72]. W przypadku niektórych hymocyjanin elektroforeza bez merkaptoetanolu prowadziła do otrzymania frakcji odpowiadających masie 130 000-160 000 [33]. I tak Hc raka Cherax destructor po dializie wobec 10 mM EGTA rozdzielała się pódczas elektroforezy na 3 pasma M_1, M_2 i/ M_3 o masach odpowiednio 70 000, 72 000 i 132 000 [33]. W obecności 10 M ditiotreitolu dodatkowo pojawiło się pasmo M_3 o masie 84 000. Fakt ten tłumaczono obecnością w natywnej

cząsteczce hemocyjaniny dimeru M_3 , zbudowanego z 2 monomerów 5 S (w tym 1 M_3), związanych mostkiem dwusiarczkowym. Obecność dimerów stwierdzono także w innych hemocyjaninach. S c h n e ider i wsp. [93] wykazali 2 różne dimery w Hc Eurypelma californicum, które oznaczono jako 4D i 5. Po inkubacji z 5 mM cysteiną dimer 5 dysocjował do 1 monomeru 3. Drugi z dimerów - 4D, dysocjujący w obecności 10 mM EDTA, jest heterodimerem, w skład którego wchodzi monomer 2. Także w hemocyjaninie skorpiona Androctonus australis podjednostka 1 istnieje w natywnej strukturze tego białka jako dimer o stałej sedymentacji 6,81 (tab. 10) [43]. M a r k 1 [74] stwierdził obecność struktur dimerycznych w hemocyjaninach 5 gatunków Chelicerata.

Tabela 10

Strukturalne odpowiedniki podjednostek Hc Eurypelma i Androctonus [73] Subunits corresponding structures of Hc Eurypelma and Androctonus [73]

Eu	rypelma calífornicum	Androctonus australis
1	a	3A, 3B
	b-c	3C-5B
	d	5A
	e	6
A Relow	f	2
	g	4

Skład aminokwasowy dimerów jest podobny do składu aminokwasowego monomerów [33].

Na podstawie przytoczonych przykładów można uważać, że dimery są zróżnicowane tak pod względem budowy, jak i własności fizykochemicznych. Istnieją np. dimery zbudowane z 2 jednakowych łańcuchów (homodimer 5 Androctonus australis), jak również z łańcuchów niejednakowych (heterodimery M_3) Cherax destructor i 4D Eurypelma californicum [33, 43, 78]. Niektóre z nich tzw. dimery stabilne są połączone najprawdopodobniej wiązaniami typu -S-S-, mniej stabilne są połączone słabszymi wiązaniami jonowymi podatnymi na działanie takich czynników, jak EDTA.

Obecność cząsteczek dimerycznych w strukturze białka spowodowała zainteresowanie się badaczy ich rolą w budowie natywnej cząsteczki hemocyjaniny. W eksperymentach reasocjacji Hc Cherax destructor Jeffrey iwsp. [33] stwierdzili, że dodanie

jonów wapnia z jednoczesnym obniżeniem pH do mieszaniny monomerów M_1 i M_2 daje w rezultacie agregat o ruchliwości elektroforetycznej heksameru (16 S). Skłoniło to autorów do przypuszczenia, że podjednostki hemocyjaniny nie są równocenne w budowie składników o wyższych stałych sedymentacji.

L a m y [45], badając reasocjację podjednostek hemocyjaniny Androctonus australis, zauważył, że wyizolowana w stanie czystym, podjednostka 4 oraz jej kombinacje z innymi tworzy jedynie heksamer. Podjednostka.2 miała tendencję do agregacji podwójnej lub potrójnej. Wydaje się więc, że określone typy podjednostek spełniają szczególną rolę w budowie oligomerów Hc skorpiona. Schutter i Bijlholt zbadali proces reasocjacji Hc Limulus poliphemus. Stwierdzili oni, że frakcje II i V Hc Limulus są niezbędne do utworzenia struktur większych niż heksamery. Nieobecność frakcji III daje nieregularną agregację heksameru. Struktury heksameryczne mogą być budowane z frakcji II, III i IV. Nie znaleziono specyficznej roli dla frakcji I [2]. Badania te wykazały, że w Hc Limulus występuje wysoki stopień specyficzności podjednostek. Ta specyficzność jest obecna również w hemocyjaninach innych gatunków Chelicerata [45, 69].

W badaniach nad rolą poszczególnych podjednostek w budowie większych składników Hc można było zauważyć następującą prawidłowość. Podczas gdy pewne podjednostki mogą same asocjować do formy heksameru ("heksamer formers") inne tej zdolności nie posiadały. Budowa struktur większych niż heksamer wymaga obecności specyficznych komponentów zwanych podjednostkami wiążącymi (linkers), np. frakcji V Hc Limulus, I Hc Androctonus i 4D Hc Eurypelma. Mają one tę wspólną własność, że są izolowane w formie dimetu.

Badano także czy rola, jaką pełni podjednostka w Hc jednego gatunku będzie też spełniała w hemocyjaninie innego [109]. Wykazano, że hybrydowe czteroheksamery mogą być budowane przy użyciu następujących mieszanin podjednostek: Limulus + Androctonus, Limulus + Eurypelma, Androctonus + Eurypelma. We wszystkich przypadkach formowanie hybrydów wymaga kombinacji podjednostek budujących heksamery (heksamer Formers) jednego gatunku z podjednostkami wiążącymi (linkers) drugiego. Otrzymano również hybrydową strukturę ośmioheksameryczną zbudowaną z frakcji Limulus II, III i IV oraz frakcji 1 (linkers) Androctonus. Powstały produkt jest nieodróżnialny w mikroskopie elektronowym od natywnej Hc Limulus. Formowanie czteroheksamerów nie wymaga obecności dwuwartościowych

kationów. Można więc przypuszczać, że hemocyjaniny tych 3 gatunków Chelicerata reprezentują wspólny typ budowy i że pewne podjednostki różnych gatunków hemocyjanin spełniają tę samą rolę w budowie jej określonych struktur.

Na podstawie badań funkcji strukturalnych poszczególnych podjednostek w budowie składników hemocyjaniny oraz mikroskopii elektronowej podjęto próbę przedstawienia modelu natywnej cząsteczki Hc.

BUDOWA SKŁADNIKÓW HEMOCYJANINY

Heksamer (16 S)

Składnik 16 S jest najmniejszym funkcjonalnym oligomerem hemocyjaniny. Liczba podjednostek wchodzących w skład tej cząsteczki próbowano określić metodami mikroskopii elektronowej, dyfrakcji promieni X, a także metodami chemicznymi. Pierwsze obserwacje Hc Arthropoda w mikroskopie elektronowym nie dostarczyły przekonywających dowodów zwolennikom heksamerycznej struktury tego składnika. Fotografie z mikroskopu elektronowego struktury 16 S pokazują profile kwadratów, prostokątów i sześciokątów [110, 111]. Dla wyjaśnienia tych kształtów zaproponowano szereg różnych modeli. Van Bruggen [111] umieścił 8 podjedno-[57, 58] stek w 8 rogach sześcianu, Levin sugerował kształt zbliżony do prostokątnej, trygonalnej pryzmy podobnej do ośmiościanu. W modelu tym składnik 16 S zawierałby 12 podjednostek i na każdej powierzchni ośmiościanu umieszczone byłyby 3 podjednostki.

Strukturę heksameryczną składnika zaproponowali W i b o [117] i S c h e p m a n [92]. W modelu Wibo 6 podjednostek jest wbudowanych w trójkątną antypryzmę. Niedawno L o n t i e i W i t t e r s [65] zaadoptowali 12 jednostek modelu Levina, wbudowując 6 par podjednostek w coś co określili jako zniekształcony ośmiościan (distorted octahedron).

S c h e p m a n [92] na podstawie dyfrakcji promieni X zaproponował model o kształcie pomiędzy trygonalną pryzmą a trygonalną antypryzmą. Według tego autora 6 podjednostek byłoby ułożonych w 2 trójkątne warstwy leżące na wspólnej, trzykrotnej osi i obrócone względem siebie o kąt 25°.

Liczbę podjednostek wbudowanych w składnik 16 S próbowano ustalić badając masy otrzymanych w wyniku dysocjacji cząsteczki podjednostek. Na tej podstawie większość badaczy przyjęła, że oligomer ten buduje 6 podjednostek. Od reguły tej zdarzały się wyjątki. S a 1 v a t o I R i c h e 1 1 i [91] wyliczyli, że masa cząsteczkowa pojedynczego łańcucha była zbliżona do 50 000. Zaproponowali oni model Hc 16 S, w którym cząsteczka była zbudowana z 9 podjednostek. Według wymienionych autorów 3 łańcuchy, umieszczone wewnątrz cząsteczki nie posiadałyby miedzi, natomiast 6 zewnętrznych zawierałoby miedź. J o h n s o n i Y p h a nt i s [34] metodą równowagi sedymentacyjnej określili z dużą dokładnością masy cząsteczkowe składników hemocyjaniny Limulus polyphemus. Wynosiły one odpowiednio 69 400, 856 000, 1 690 000 i 3 160 000.

Wspólną cechą wszystkich modeli jest fakt, iż składnik 16 S posiada 6 miejsc wiążących tlen. Dlatego nazwa heksamer jest obecnie powszechnie przyjęta dla określenia tego składnika.

Stwierdzono, że dysocjacja i asocjacja heksameru jest funkcją pH [32, 40, 112]. W środowisku silnie alkalicznym cząsteczka 16 S dysocjuje do mieszaniny monomerów (5 S). Obniżenie pH powoduje ich asocjację.

Interesujące zjawisko zaobserwowali Jeffrey i wsp. [32]. Mianowicie stwierdzili oni, że mieszanina monomerów M_1 i M_2 Hc Cherax destructor może tworzyć różne heksamery, tzn. (M1)6, $(M_1)_5(M_2)_1$, $(M_1)_4(M_2)_2$, $(M_2)_6$, ponieważ w rozdziałach elektroforetycznych frakcji heksameru stwierdzono obecność 4-7 pasm. Nawet podczas elektroforezy hemocyjaniny, pochodzącej z pojedynczego osobnika, obserwowano najmniej 4 frakcje heksameru. Wynik ten świadczyłby o tym, że w przypadku niektórych hemocyjanin może istnieć heterogenność składnika heksamerycznego. Fakt ten posiada istotne znaczenie, gdyż dotychczasowe przestrzenne modele heksameru oparto na identyczności wszystkich podjednostek wchodzących w jego skład. Przy założeniu, że podjednostki posiadają kształt sferyczny udowodniono identyczność modelów trygonalnej antypryzmy i regularnego ośmiościanu [19]. Tymczasem heterogenność podjednostek, a także fakt, iż niektóre podjednostki mogą posiadać kształty odbiegające od sferycznego powoduje możliwość istnienia (obok siebie) zarówno formy trygonalnej antypryzmy, jak i ośmiościanu.

Określenie kształtu heksamerycznej cząsteczki Hc komplikuje fakt, iż niektóre podjednostki (łańcuchy) są funkcjonalnie zróż-

nicowane i mogą zajmować jedynie ściśle określoną pozycję w heksamerze. Ma to istotne znaczenie przy budowie większych składników hemocyjaniny.

Dodekam: r (24 S)

W hemolimfie niektórych gatunków Arthropoda składnik 16 S jest jedynym oligomerem [^A, 8, 114]. Tednakże u w kszości przebadanych gatunków stawonogów heksamer występuje w hemolimfie w niewielkich ilościach, a dominującymi okazały się być składniki 24 S 36 S i 60 S.

Poprzednio omówiono udział dwuwartościowych kationów (Ca²⁺ i Mg²⁺) w tworzeniu większych struktur hemocyjaniny. W kilku wypadkach składnik 24 S można było odtworzyć z mniejszych komponentów dodając jonów wapnia lub magnezu do stężenia 20-50 mM w pH 7,5. Doświadczenia takie wykonano z hemocyjaninami Homarus americanus. Eriphia spiniphrons, Cancer magister i Carcinus mediterra.eus [11 12, 16, 55, 83]. K e g e l e s i T a i [36, 103] badając mechanizm reakcji heksamer - dodekamer Hc Homarus americanus, doszli do wniosku, że jest on oparty na włączeniu w cząsteczkę jonów wapnia. Do utworzenia dodekameru z 2 heksamerów niezbędne były 4 jony wapnia.

Inny mechanizm tworzenia dodekameru zaproponowali J e ff r e y i wsp. [33] dla Hc Cherax destructor. Na podstawie wyników rozdziałów elektroforetycznych i badań reasocjacji wykazali oni, że składnik 24 S jest zbudowany z 10 jednostek monomerycznych (M_1 i M_2) oraz l dimerycznej (M_3). Podobnie jak w przypadku heksameru również tutaj są możliwe kombinacje 3 podjednostek. Liczba tych kombinacji wynosi 11, a mianowicie: (M_3)₁(M_1)₁₀, (M_3)₁(M_1)₉(M_2)₁..... (M_3)₁(M_2)₁₀. Biorąc pod uwagę zawartość procentową poszczególnych podjednostek w Hc autorzy wyliczyli, że jedynie 4 kombinacje mogą występować w ilościach pozwalających na wykrycie metodami elektroforetycznymi.

Podjednostka dimeryczna jest też niezbędna do utworzenia składnika 24 S w Hc pająka Cupiennius salei - rys. 1 [68].

Składnik ten posiadał w swoim składzie 5 różniących się elektroforetycznie, ale immunologicznie identycznych, podjednostek 5 S oraz podjednostkę dimeryczną 7 S. Proponowany model tej hemocyjaniny przedstawiono na rys. 1. Monomer 5 S posiada 4 międzypodjednostkowe miejsca wiążące. Piąte miejsce (rys. lb), zazna-

czone czarnym punktem, posiada tylko łańcuch polipeptydowy wchodzący w skład dimeru. Dimer (rys. lc) tworzą 2 łańcuchy polipeptydowe związane mostkiem dwusiarczkowym. Rys. ld obrazuje strukturę natywnego heksameru 16 S zawierającego 6 identycznych monomerów (projekcja heksagonu). W wyniku działania na dodekamer (24 S) środkami redukującymi powstaje krótkotrwałe stadium heptameru (rys. lf), a następnie tzw. artefaktowy heksamer (rys. le) o składzie podjednostkowym różnym od składu natywnego heksameru. Rysunek 1g przedstawia natywny dodekamer utworzony, podobnie jak w Hc Cherax destructor, z 10 monomerów i 1 dimeru.



Rys. 1. Model czwartorzędowej struktury Hc Cupienius salei a - monomer, b - pojedynczy łańcuch polipeptydowy wchodzący w skład dimeru, c - dimer 7 S, d - natywny heksamer 16 S, e - artefaktowy heksamer, f - heptamer 18 S, g - natywny dodekamer 24 S [68]

Fig. 1. Quaternary structure model of Cupiennius salei Hc a - mononmer, b - single polypeptide chain building the dimer, c - dimer 7 S, d - native hexamer 16 S, e - artefact hexamer, f - heptamer 18 S, f - native dodecamer 24 S [68]

Na podstawie zaproponowanej struktury czwartorzędowej Hc Cherax destructor i Cupiennius salei można przypuszczać, że:

 w dodekamerze podjednostka dimeryczna pełni rolę łącznika pomiedzy 2 heksamerami;

 utworzenie dodekameru w tym przypadku nie jest prostym połączeniem 2 jednostek heksamerycznych (tzn. skład podjednostkowy heksameru i połowy dodekameru jest różny).

Na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego J e f f r e y i wsp. [31] zaproponowali nieco odmienny model budowy dodekameru Cherax destructor. Składnik 24 S tej hemocyjaniny składać się ma z 2 struktur heksamerycznych, obróconych o 90° względem siebie. Wyliczone wymiary tej cząsteczki były następujące: długość 230 Å, szerokość 110-135 Å. Opierając się na mikroskopii elektronowej i ugięciu promieni X, podobny model dla dodekamerów Hc Astacus leptodactylus, Homarus vulgaris i Cancer pagurus zaproponowali P i 1 z i wsp. [1, 84] (rys. 3-A, B). Rozpatrywano 2 modele A



Rys. 2. Teoretyczny udział heksamerów w budowie dodekameru Hc Astacus leptodactylus [84]







a-d - 4 rzuty jednostki oktahedrycznej (heksameru) przedstawiające romb, kwadrat, prostokąt i sześciokąt; e - typ C 24 S - 2 jednostki oktahedryczne obrócone o 90° względem siebie; f-h - typ S 24 S - 2 jednostki oktahedryczne w tym samym ułożeniu; i-j - struktura Hc 36 S skorpiona

Fig. 3. Combination of basic octahedral subunits of Hc Arthropoda acc. Klarman [37]

a-d - 4 projection of octahedral subunit (hexamer) showing rhomb, square, rectagon and hexagon; e - type C 24 S - 2 octahedral subunits rotated 90° towards each other; f-h - type S 24 S - 2 octahedral subunits in the same configuration; i-j - 36 S Hc structure of scorpion

i B, będące wynikiem kombinacji 2 heksamerów. Lepszą zgodność z danymi eksperymentalnymi odnotowano dla modelu A, w którym to składnik 24 S wykazywał bardziej zwartą strukturę niż wynikałoby to z obecności pojedynczego, kowalentnego wiązania -S-S- podjednostki dimerycznej. Identyczny model strukturalny cząsteczki

24 S zaproponował Lamy dla dodekameru skorpiona Androctonus australis [41, 98]. Należy jednak zauważyć, że dodekamer nie występuje w hemolimfie Chelicerata, a jest jedynie produktem dysocjacji cząsteczki 36 S. W 1979 r. Klarman [37] opisał model budowy Hc skorpiona Leirus quinquestriatus. Zaproponował on nieco inne zaaranżowanie 2 oktahedrycznych jednostek heksameru w budowie dodekameru - rys. 3. Składnik 24 S skorpiona (nie występujący w hemolimfie) posiadałby budowę typu S (skorpion), gdzie 2 heksamery mają tę samą orientację względem siebie, w przeciwieństwie do typu C (Crustacea), w którym heksamery obrócone są względem siebie o 90°. Kolejne stopnie agregacji hemocyjanin Arthropoda miałyby przebiegać dwiema różnymi drogami:

C (24 S) 0 łańcuch (5 S) (16 S) > (S2)2 S S2 (36 S) (24 S)

gdzie C jest stanem agregacji Hc 24 S Crustracea, S - skorpiona. Hipoteza ta wyjaśniałaby fakt zatrzymania agregacji hemocyjanin. Crustacea na poziomie dodekameru (24 S).

Eikosotetramer (36 S)

Agregat ten jest charakterystyczny dla wszystkich dotychczas przebadanych hemocyjanin Merostomata i Arachnida (z wyjątkiem pająka Cupiennius salei) oraz u 2 gatunków Crustacea - Callianasa californiensis i Cancer pagurus (tab. 3). W dalszej części artykułu zostanie szczegółowo omówiona budowa składnika 36 S Hc Androctonus australis i Eurypelma californicum.

Cząsteczkę 36 S Hc Androctonus australis tworzą 24 łańcuchy polipeptydowe 8 typów: 2, 3A, 3B, 3C, 4, 5A, 5B i 6. Metodami immunologicznymi i elektroforetycznymi ustalono liczbę poszczególnych podjednostek w natywnej cząsteczce Hc [44]. Łańcuchy typu 2, 4, 5A i 6 występują w liczbie 4 każdy, natomiast pozostałe w liczbie 2. Wykazano, że podjednostki 2, 4, 5A i 6 są usytuowane na powierzchni cząsteczki, podczas gdy pozostałe (3A, 3B, 3C i 5B są w jej wnętrzu [44]. Inaczej mówiąc podjednostki obecne tylko w 2 kopiach są umieszczone we wnętrzu cząsteczki.

165

(60 S)

W. Michalak, R. Gondko.

W mikroskopie elektronowym Hc 36 S tworzą 2 typy profili: kwadrat z bokami 230 Å, zbudowany z 2 sąsiadujących prostokątów połączonych mostkami oraz 2 kwadraty połączone rogami [41]. Cząsteczka 36 S skorpiona byłaby więc zbudowana z 2 prostopadłościanów z kwadratowymi podstawami związanych wzdłuż jednego, długiego końca.

Używając do znakowania poszczególnych podjednostek fragmentów FAB (antygeny podjednostek trawione papainą) i identyfikując je za pomocą mikroskopu elektronowego zlokalizowano poszczególne podjednostki w natywnej strukturze cząsteczki Hc (rys. 4) [41].



Rys. 4. Model budowy struktury 35 S Hc Androctonus australis [41] a-b - 2 profile obserwowane w mikroskopie elektronowym, c - widok z boku nigdy nie obserwowany w mikroskopie

Fig. 4. Model structure of Androctonus australis 35 S Hc [41] a,b - 2 profiles observed in electron microscope; c - side view never observed in the microscope

Na rys. 4 można zauważyć, że podjednostki 3C i 5B będące dimerami są umieszczone wewnątrz natywnej cząsteczki Hc. W nieco późniejszych badaniach wykazano, że podjednostki 3A i 5B występują w tym samym heksamerze, podczas gdy podjednostki 3B i 3C zlokalizowano w drugiej połowie dodekameru [46].

Równolegle prowadzono prace z Hc pająka Eurypelma californicum, której cząsteczka o masie 1,7 x 10^6 jest również strukturą czteroheksameryczną [61, 62, 75]. Zawiera ona 7 typów łańcuchów polipeptydowych [49, 78, 93] w następujących proporcjach: 4a, 2b, 2c, 4d, 4e, 4f i 4g [75, 76]. W douskamerycznej półcząsteczce (24 S) występuje bardzo stabilny heterodimer bc i niestabilny homodimer ff [93]. Analiza składu aminokwasowego intermediatów, powsta-

łych w wyniku dysocjacji cząsteczki, wykazała, że występują tu 2 typy heksamerów: "abdefg" oraz "acdefg" [76].

Identyfikując w mikroskopie elektronowym podjednostki znakowane fragmentami FAB i porównując je ze zdjęciami z mikroskopu elektronowego natywnych cząsteczek Hc, Markl [73] zaproponował model Hc 36 S Eurypelma. Model ten jest w zasadzie zgodny z opisanym poprzednio dla Hc Androctonus i przedstawia się następująco. Wzdłuż dużej szczeliny, rozdzielającej 2 dodekameryczne składniki, ulokowano podjednostki f, b i c, tworzące dimery. Podjednostki e znajdują się w 4 narożach cząsteczki, zaś podjednostki a mają być usytuowane po obu stronach tzw. małej szczeliny rozdzielającej 2 heksamery w każdym dodekamerze. Podjednostka d została umieszczona na zewnątrz, wzdłuż długiego boku cząsteczki Hc, a g połączono z f. Model ten znalazł potwierdzenie w badaniach empirycznych prowadzonych z hemocyjaniną tego gatunku i wyjaśnia dostatecznie dobrze rolę dimerów bc i ff. Możliwe są 2 enencjomery tego modelu. Na podstawie obecnych badań nie można ustalić, który z enancjomerów odpowiada strukturze czwartorzędowej, natywnej cząsteczki Hc.

Z zamieszczonych rysunków i opisów wynika, że struktury cząsteczki 36 S Androctonus i Eurypelma są bardzo podobne. Na tej podstawie ustalono wzajemne strukturalne odpowiedniki podjednostek wymienionych hemocyjanin (tab. 10) [73]. Wykazano też podobieństwa w budowie 4 x 6-meru opisanych już hemocyjanin Eurypelma i Androctonus z połową cząsteczki 36 S Hc Limulus polyphemus [42]. Hemocyjaniny te porównywano wielowariantową metodą analizy statystycznej komputerowych obrazów z mikroskopu elektronowego [3]. Stwierdzono, że budowa przestrzenna Hc wymienionych 3 gatunków odpowiada modelowi 4 x 6-meru Lamy [46] z 1981 r. Można więc przyjąć, że czwartorzędowa struktura cząsteczki 36 S została względnie dobrze poznana. Wydaje się, że model Eurypelma/Androctonus nie jest jednak jedynym modelem składnika 36 S Hc Arthropoda. Na rys. 3 zaprezentowano model cząsteczki 36 S skorpiona Leirus quinquestriatus [37]. Jak już wspomniano różni się on od modelu Eurypelma/Androctonus odmiennym połączeniem heksamerów w dodekamerycznej połowie cząsteczki. Model ten zawiera 24 identyczne podjednostki, zajmujące rogi 4 jednostek oktahedrycznych (heksamerów), umiejscowionych w kwadratowym, planarnym układzie. Tak więc sposób wbudowania heksamerów w cząsteczkę 36 S wymaga dalszych badań.

W. Michalak, R. Gondko

SKŁADNIKI HC ARTHROPODA O WYŻSZYCH STAŁYCH SEDYMENTACJI

Hemocyjaniny Crustacea i Arachnida nie występują w formie ośmioheksamerycznej (składnik 60 S), którą wykryto jedynie w hemolimfie Limulus polyphemus i Tachypleus tridentatus [20, 99]. Składnik ten jest jeszcze mało poznany. W mikroskopie elektronowym jest obserwowany jako kształt pentagonalny ze średnicą ok. 250 Å, bądź też kwadrat z widoczną podstrukturą 4 mniejszych kwadratów [95]. Cząsteczka 60 S prawdopodobnie jest zbudowana z 2 warstw struktur czteroheksamerycznych. Po usunięciu jonów wapnia dysocjuje ona na połowę (37 S) [7]. Ostatnio stwierdzono, że składnik 37 S jest zbudowany z 2 lewych dodękamerycznych enancjomerów [51]. Struktura cząsteczki 60 S nadal jest przedmiotem badań wielu autorów.

Jak wiemy u Crustacea agregacja Hc zatrzymała się na poziomie dodekameru. Jednak Rochu [88], badając masy cząsteczkowe Hc kilku Decapoda metodą elektroforezy, stwierdził, że u niektórych gatunków tworzyły się agregaty 24, 48, a nawet 72 monomerycznych podjednostek.

Poza powszechnie występującymi formami agregacji hemocyjanin Arthropoda spotykano też inne struktury. W Hc raka Cherax destructor wykryto składnik o stałej sedymentacji 29 S [80]. Podobną formę obserwowano w Hc Eurypelma californicum podczas inkubacji w alkalicznym pH, gdzie pojawiała się ona jako niestabilny intermediat [14]. W hemocyjaninie Cherax destructor zidentyfikowano agregat 29 S jako formę trójheksameryczną [33]. Składnik 29--30 S występuje jednak niezmiernie rzadko i być może jest artefaktem.

Z przedstawionego przeglądu wynika, że hemocyjaniny Arthropoda posiadają wysoce skomplikowaną strukturę czwartorzędową. Wiele pytań dotyczących architektury cząsteczki Hc pozostaje nadal bez odpowiedzi i wymaga dalszych badań.

LITERATURA

[1] Bernhard H., Pilz I., Meisenberger O., Witters R., Lontie R. (1983), BEA, <u>748</u>, 28-33.
[2] Bijlholt M. M. C., Van Bruggen E. F. J., Bonoventura J., (1979), J. Biochem., <u>95</u>, 399-405.

1	Hemocyjaniny stawonogów 169
31	Biilbolt M.M.C., Van Heel M.G., Van Brue
[]]	gen E.F.I. (1982). I. Mol. Riol., 161, 139-153.
[4]	Bonaventura J., Brunori M., Wilson M.T.
	Martin J. P., Garlick R. L., Davis B. J. (1978).
	Comp. Biochem. Physiol., 62A 251-256.
[5]	Bonner A. G., Laursen R. A. (1977), FEBS Lett., <u>73</u> 201-203.
[6]	Brenowitz M., Bonaventura J., Bonaven-
	tura C., Gianaza E. (1981), Arch. Biochem., Biophys. 210, 748-761.
[7]	Brenowitz M., Van Holde K.E., Bonaventu-
	ra C., Bonaventura J. (1980), Fed. Proceed., <u>39</u> , 1768
[8]	Brouver M., Bonaventura C., Bonaventu-
	r a J. (1978), Biochemistry, <u>17</u> , 2148-2154.
[9]	B-rown J.M., Powers L., Kincaid B., La-
	rabee J.A., Spiro T.G. (1980), J.Am. Chem. Soc., <u>102</u> , 4210-4216.
[10]	Busselen P. (1970), Arch. Biochem. Biophys., <u>137</u> , 415-420.
[11]	Carpenter D. E., Van Holde K. E. (1973), Bioche- mistry, <u>12</u> , 2231-2238.
[12]	Chantler E. N., Harris R. R., Bannister W. H. (1973), Comp. Biochem. Physiol., <u>46A</u> , 333-343.
[13]	Ching Ming Chung M., Ellerton D. (1979), Prog. Biophys. Molec. Biol., <u>35</u> , 53-102.
[14]	Decker H., Schmid R., Markl J., Lin- zen B. (1980), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>361</u> , 1707-1717.
[15]	Dhere Ch. (1928), Rev. Suisse Zool., <u>35</u> , 277-288.
[16]	Di Giamberardino L. (1967), Arch. Biochem. Biophys., 118, 273-278.
[17]	Eickman N. C., Himmelwright R. S., Solo mon E. I. (1979), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 2094-2098.
[18]	Ellerton H.D., Carpenter D.E., Van Holde K.E. (1970), Biochemistry, 9, 2225-2232.
[19]	Ellerton N.F., Ellerton H.D. (1982), BBRC, <u>108</u> , 1383-1387.
[20]	Ericksson-Quensel I.B., Svedberg T. (1936), Biol. Bull. 71, 498-547.
[21]	Ghiretti-Magaldi A., Nuzollo C., Ghiretti F. (1966), Biochemistry, <u>5</u> , 1943-1951.
[22]	Ghiretti-Magaldi A., Tamino G., Salva to B. (1975), Boll. Zool., <u>42</u> , 167-179.
	to B. (1975), Boll. Zool., <u>42</u> , 167-179.

[23]	Ghiretti-Magaldi A., Tamino G. (1977), [in:]
	Structure and function of haemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-
1.101	-veriag, Barlin-heidelberg-New fork, 2/1-2/6.
[24]	Gielens C., Verschueren E. J., rieaux C.,
	tebrate oxygen carriers, eds J. Lamy, J. Lamy, M. Decker, New York.
[25]	Gondko R., Michalak W. (1981), Invertebrate oxygen - binding proteins. Structure, active site and function, eds. J. Lamy,
[36]	Charpetters D. Bereact M.I. Brunori M.
[20]	Antonini E., Wyman J., Rossi-Fanelli A.
	(1965), J. Mol. Biol., <u>13</u> , 234-237.
[27]	Hamlin M.L., Wayne W.P. (1977), BBA, <u>491</u> , 46-52.
[28]	Hendrickson W. H. (1977), Trends Biochem. Sci., <u>2</u> , 108-109.
[29]	Herskovits T.T., Russel M.W.'Carberry S.
	E. (1984), BBA, <u>667</u> , 44-58.
[30]	Hoylaerts M., Preaux G., Witters R.,
- 1	Lontie R. (1979), Arch. Int. Phys. Biochim., <u>87</u> , 412-418.
[31]	Jeffrey P. D. (1979), Biochemistry, <u>18</u> , 2508-2513.
[32]	Jeffrey P. D., Shaw D. C., Treacy G. B. (1976), Biochemistry 15, 5529-5533.
[33]	Jeffrey P.D., Shaw D.C., Treacy G.B. (1978),
	Biochemistry 17, 3078-3083.
[34]	Johnson M. L., Yphantis D. A. (1978), Biochemistry,
[25]	17, 1446-1455.
[35]	(1979), FEBS Lett. <u>106</u> , 281-291.
[36]	Kegeles G., Tai M.S. (1973), Biophys. Chem., <u>1</u> , 46-50.
[37]	Klarman A., Gottlieb J., Daniel E. (1979), Biochemistry, 18, 2239-2244.
[38]	Klotz I.M., Klippenstein G.L., Hendri-
[30]	ckson W. A. (1976). Science, 192, 335-344.
[39]	Konings W. N. (1969), Structure and function of hemocyanin, Ph.
	D. Thesis, Rijksuniwersitait te Groningen.
[40]	Kuiper H.A., Gaastra W., Beintema J.J.
	Van Bruggen E.F.J., Schepman A.M.H.,
	Drenth J. (1975), J. Mol. Biol., <u>99</u> , 619-629.
[41]	Lamy J., Bijlholt M. M. C., Sizaret P-Y.,
	Lamy J., Van Bruggen E. F. J. (1981), Biochemistry 20, 1849-1856.
[42]	Lamy J. Compin S., Lamy J. N. (1983), Arch.
1423	

.....

nemocy lantiny scawonogow	N
---------------------------	---

- [43] Lamy J., Lamy J., Baglin M-C., Weill J. (1977), [in:] Structure and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 37-49.
- [44] Lamy J., Lamy J., Leclerc M., Sizaret P-Y., Weill J. (1980), FEBS Lett., <u>112</u>, 45-47.
- [45] Lamy J., Lamy J., Sizaret P-Y., Maillet M., Weill J. (1977), J. Mol. Biol., <u>117</u>, 869-875.
- [46] Lamy J., Lamy J., Sizaret P-Y., Weill J. (1981), [in:] Invertebrate oxygen carriers. Structure, active site and function, eds J. Lamy, J. Lamy, M. Decker, New York, 425-443.
- [47] Lamy J., Lamy J., Weill J. (1979), Arch. Biochem. Biophys., <u>193</u>, 140-149.
- [48] Lamy J., Lamy J., Weill J., Bonaventura J., Bonaventura C. (1979), Arch. Biochem. Biophys., <u>196</u>, 324-339.
- [49] Lamy J., Lamy J., Weill J., Schneider H-J., Linzen B. (1979), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>360</u>, 889-895.
- [50] Lamy J., Richard M., Goyffon M. (1970), C.
 R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat., <u>270</u>, 1617-1630.
- [51] Lamy J., Sizaret P-Y., Frank J., Verschoor A., Feldman R., Bonaventura J. (1982), Biochemistry, <u>21</u>, 6825-6833.
- [52] Lamy J., Weill J. Pensec J-P. (1976), C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat., <u>282</u>, 1995-1998.
- [53] Larabee J. A., Spiro T. G. (1980), J. Am. Chem. Soc., 102, 4217-4223.
- [54] Larabee J. A., Spiro T. G., Ferris N. S.,
 Wood W. H., Maltese W. A., Kerr M. S. (1977),
 J. Am. Chem. Soc., 99, 1979-1980.
- [55] Larson B. A., Terwilliger N. B., Terwilliger N. C. (1981), BBA, <u>667</u>, 294-302.
- [56] Lee D. L., Smith M. H. (1956), Exp. Parasit., 16, 392-424.
- [57] Levin O. (1963), Arkiv. Kemi., 21, 1-13.
- [58] Levin O. (1963), Arkiv. Kemi., <u>21</u>, 29-35.
- [59] Linzen B., Angersbach D., Loewe R., Markl J., Schmid R. (1977), [in:] Structure and function of hemocyjanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 31-36.
- [60] Loehr J.S., Mason H.S. (1973), BBRC, <u>51</u>, 741-745.
- [61] Loewe R., Linzen B. (1973), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>354</u>, 182-188.

172	W. Michalak, R. Gondko
[62]	Loewe R., Schmid R., Linzen B. (1977), [in:]
	Structure and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Ver-
	lag, Berlin-neidelberg-New fork, 50-54.
[03]	Lontie R. (1977), [in:] Structure and function of nemocyanin,
[64]	Lantia P. De Lev M. Robberecht A.
[04]	U = 1 + 1 + 2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 2 +
651	Lontin P. Witters R. (1973), [in:] Inorganic bio-
[02]	charietry ed G I Fichern Elsevier, Amsterdam, 344-358.
1441	March Biochem
[00]	Mariborough D. J. Jeffrey P.D. Treacy
[0/]	Mariborough D. J., Sellicy L.D., Iteacy (1091) Discharge ten 20 (916-(921)
	G. B. (1981), Biochemistry, 20, 4810-4821.
[08]	Marki J. (1980), J. Comp. Physiol., <u>140</u> , 199-207.
[09]	Marki J., Decker n., Einzen B., Schut
	ter W.G., Van Bruggen E.T.J. (1962), hoppe Se
	yler's Z. Physiol. Chem., <u>302</u> , 73-97.
[70]	Marki J., Decker H., Stocker W., Saver
1	A., Linzen B., Schutter W.G., Van Brug
	gen E. F. J. (1981), Hoppe Seyler's 2. Physiol. Chem., <u>302</u> , 183-186.
[71]	Markl J., Hofer A., Bauer G., Marki A.
	Kempter B., Brenzinger M., Dinzen B.
	(1979), J. Comp. Physiol., <u>133</u> , 167-175.
[72]	Markl J., Kempter B. (1960), J. Comp. Physiol., <u>141</u> ,
	495-502.
[73]	Markl J., Kempter B., Linzen B., Biji
	holt M., Van Bruggen E.F. J., (1981), hoppe se
	yler's Z. Physiol. Chem., <u>362</u> , 1631-1641.
[74]	Markl J., Markl A., Schartau W., Lin-
1	zen B. (1979), J. Comp. Physiol., <u>130</u> , 283-292.
[75]	Markl J., Savel A., Decker H., Linzen f
	(1980), Hoppe Seyler s Z. Physiol. Chem., <u>301</u> , 649-660.
[76]	Markl J., Savel A., Linzen B. (1981), Hoppe
	Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>362</u> , 1255-1262.
[77]	Markl J., Schmid R., Czichos-Tiedt S.,
	Linzen B. (1976), Hoppe Seyler s Z. Physiol. Chem. <u>357</u> , 1/13-1/2
[78]	Markl J., Strych W., Schartau W., Schne
	ider H-J., Schorberl P., Linzen B. (1979).
1. 3	Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>360</u> , 639-650.
[79]	Morimoto K., Kegeles G. (1971), Arch. Biochem. Bio
	phys., <u>142</u> , 247-257.
	· · · /

_	-	Hemocyjaniny stawonogów 173
1	80]	Murray A.C., Jeffrey P.D. (1974), Biochemistry, <u>13</u> , 3667-3671
r	811	Nemoto T. Takagi T. (1981), BBA 670, 79-83
r	821	Pandolfello Ocoppor ER Harrington L
L	021	P., Herskovits T. T. (1980), BBA 624, 346-362.
r	831	Picket S. M., Riggs A. F., Larimer J. L.
	051	(1966). Science 151, 1005-1007
1	841	Pilz J., Goral K., Hoylaerts M., Wit-
	041	ters R., Lontie R. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 539-553.
1	851	Redfield A C. Incells E N (1933). J. Cell.
	051	Comp. Physical 3 189-202
ŕ.	861	Robinson HA, Ellerton HD (1977), [in:] Stru-
	001	cture and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag.
		Berlin-Heidelberg-New York 55-70.
1	871	Rochu D., Fine J. M. (1980). Comp. Biochem. Physiol. 66.
•	0,1	273-278.
ſ	881	Rochu D., Lambin P., Ghidalia W., Fi-
-	001	ne J. M. (1978). Comp. Biochem. Physiol. 59B, 117-122.
Fr.	891	Rogala A., Gondko R. (1981), Comp. Biochem, Physiol.
1		68B, 603-606.
[90]	Roxby R., Miller K., Blair D.P., Van
		Holde K.E. (1974), Biochemistry, 13, 1662-1667.
[91]	Salvato B., Richelli F., (1977), [in:] Structure
1		and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin-
		-Heidelberg-New York, 113-121.
[92]	Schepman A. M. H. (1975), Ph. D. Thesis, Rijksuniversitait te
		Groningen.
1	93]	Schneider H.J., Markl J., Schartau W.,
		Linzen B. (1977), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1133-
		-1141.
1	94]	Schneider H.J., Schartau W., Linzen B.,
		Lottspeich F., Henschen A. (1980), Hoppe Se-
		yler's Z. Physiol. Chem., <u>361</u> , 1211- 1216.
I	95]	Schutter W.G., Van Bruggen E.F.J., Bo-
		naventura J., Bonaventura C., Sulli-
		van B. (1977), [in:] Structure and function of hemocyanin. ed. J.
		V. Bannister, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 13-21.
[96]	Sevilla C. (1978), Comp. Biochem. Physiol., <u>60B</u> , 467-472.
1	97.].	Sevilla C., Lagarique J.G. (1976), C.R. Hebd.
		· · · · · · · · · · · · · · · · · ·

174	W. Michalak, R. Gondko
[98]	Sizaret P-Y., Frank J., Lamy J., Weill
	J., Lamy J. N. (1982), Eur. J. Biochem., <u>127</u> , 501-506.
[99]	Sugita H., Sekiguchi K. (1975), J. Biochem (Tokio),
	<u>78</u> , 713-718.
[100]	Sugita H., Sekiguchi K. (1980), Experientia, <u>36</u> ,
11.2	1027-1028.
[101]	Sullivan B., Bonaventura J., Bonaven-
	tura C. (1974), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, <u>71</u> , 2558-2562.
[102]	Sullivan B., Bonaventura J., Bonaven-
	tura C. (1976), J. Biol. Chem., <u>251</u> , 7644-7648.
[103]	Tai M.S., Kegeles J. (1975), Biophys. Chem. <u>3</u> , 307-315.
[104]	Takagi T., Nemoto T. (1980), J. Biochem. (Tokio) <u>87</u> ,
	1785-1794.
[105]	Terwilliger N. B. (1982), Biochemistry, <u>21</u> , 2578-2586.
[106]	Terwilliger N.B., Terwill'iger R.C., Ap-
	plestein M., Bonaventura C., Bonaven-
	tura J. (1979), Biochemistry, <u>18</u> , 102-108.
[107]	Thomson L.C.G., Hines M., Mason H.S. (1959),
	Arch. Biochem. Biophys., 83, 88-95.
[108]	Torensma R. (1981), Ph. D. Thesis, Rijksuniversitait te Gro-
	ningen, 9-10.
[109]	Van Bruggen E.F.J., Bijlholt M.M.C.,
	Schutter W.G., Wicherties T., Bonaven-
1.11	tura J., Bonaventura C., Lamy J., La-
	my J., Leclerc M., Schneider H-J Markl
	J., Linzen B. (1980), FEBS Lett., <u>116</u> , 207-210.
[110]	Van Bruggen E.F.J., Schuiten N., Wie-
	benga E. H. (1963), J. Mol. Biol., 7, 249-253.
[111]	Van Bruggen E.F. J., Wiebenga E.H. (1962),
	J. Mol. Biol., <u>4</u> , 8-9.
[112]	Van den Berg A.A., Gaastra W., Kuiper
	H. A. (1977), [in:] Structure and function of hemocyanin, ed J. V. Ban-
	nister, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 6-12.
[113]	Van Der Deen H.W., Van Driel R., Jonk-
	man-Benker A. H., Sawatsky G. A., Wever R.
	(1977). [in:] Structure and function of hemocyanin, ed. J. V. Bannister
	Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 172-179.
[114]	Van Holde K.E., Brenowitz M. (1981), Bioche-
	mistry, 20, 5232-5239.
[115]	Van Holde K. B., Miller K. T. (1982), Quart, Rev.
	Biophys. 15, 1-129.
	biophyses, 19, 1 122.

[116] Waxman L. (1975), J. Biol. Chem., 250, 3796-3806.

[117] W i b o M. (1966), Ph. D. Thesis, Universite Catolique de Louvain.

[118] Witters R., Lontie R. (1968), Physiology and biochemistry of haemocyanin, ed. F. Ghiretti, Academic Press, New York-London, 61.

[119] Wood E. J. (1980), Assays Biochem., 16, 1-47.

Laboratorium Nauk Biologicznych Uniwersytet Łódzki

Włodzimierz Michalak, Roman Gondko

HEMOCYANINS OF ARTHROPODS

In this paper the news hypothesis of structure of arthropod's hemocyanin were presented. One also particulary discussed the constitution of this proteins components. The heterogeneity Hc on the level of polypeptide chains was considerated. The function performed by respective subunits (chains) in the constitution of bigger hemocyanins' aggregates was attempted.