

DE INTRACELLULAIRE COELOOM HAEMOGLOBINE VAN DE
ANNELIDE HETEROMASTUS FILIFORMIS

GERARD PALS

Interne Verslagen
Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee
Texel
1978-6

All rights reserved

Internal reports are not to be reprinted or cited, it is only allowed by consent of the Netherlands Institute For Sea Research.

printed by  *texel*

DE INTRACELLULAIRE COELOOM HAEMOGLOBINE VAN DE
ANNELIDE HETEROMASTUS FILIFORMIS*

door

GERARD PALS

INHOUDSOPGAVE

I. Samenvatting en Summary	2
II. Inleiding	3
III. Materiaal en methoden	9
IV. Resultaten	14
1. Waarnemingen	14
2. Milieu	14
3. Zuurstofbindingseigenschappen	18
3.1. P ₅₀ en Hill-coëfficiënt	20
3.2. Invloed van pH op de O ₂ -binding	24
3.3. Invloed van temperatuur op de O ₂ -binding	26
3.4. Invloed van organische fosfaten op de O ₂ -binding	28
4. Absorptiespektra, molecuulgewicht en iso-elek- trisch punt van de haemoglobine	30
V. Discussie	35
VI. Lijst van afkortingen	39
VII. Referenties	41

*Onderzoek in het kader van een doktoraalonderwerp scheikundige
dierfysiologie voor Prof. dr. J.H.F.M. Zandee, (Rijksuniver-
siteit, Utrecht). Op het NIOZ te Texel begeleid door Dr.
P.A.W.J. de Wilde en E. Pauptit.

I. SAMENVATTING

De intracellulaire coeloom haemoglobine van *Heteromastus filiformis* werd onderzocht. De haemoglobine is heterogeen wat iso-elektrisch punt betreft. De vier belangrijkste componenten hebben i.e.p. 5,86; 6,13; 6,95; 7,15.

Het molecuulgewicht ligt tussen 6.000 en 10.000 Daltons. De O₂ affiniteit is hoog ($P_{50} \approx 9 \text{ N.m}^{-2}$ voor hele en gehaemolyseerde coeloomvloeistof en $\approx 3,3 \text{ N.m}^{-2}$ voor gestripte haemoglobine; 15°C, pH 7,4). De Bohr factor is -0,34. Er is een duidelijk Root-effekt bij pH < 6. De Hill-plots vertonen een neerwaartse knik bij 50 % verzadiging, met redelijke tot sterke cooperativiteit beneden 50 % en geen tot zwakke boven 50 %. Er wordt een associatie- dissociatie evenwicht van de haemoglobine voorgesteld. ATP heeft invloed op de O₂-binding, maar er zijn waarschijnlijk nog andere modifikators. De resultaten worden besproken met betrekking tot de gemeten milieu parameters.

SUMMARY

The intracellular coelomic haemoglobin of *Heteromastus filiformis* was studied. The haemoglobin is heterogeneous on the basis of isoelectric point. The four main components have i.e.p. 5,86; 6,13; 6,95; 7,15. The molecular weight is between 6.000 and 10.000 Daltons. The O₂ affinity is high ($P_{50} \approx 9 \text{ N.m}^{-2}$ for whole and haemolysed coelomic fluid and $\approx 3,3 \text{ N.m}^{-2}$ for stripped haemoglobin; 15°C, pH 7,4). The Bohr factor is - 0,34. There is a distinct Root-effect at pH < 6. The Hill-plots show a downward crack near 50 % saturation, with slight to marked cooperativity below 50 % saturation and none to slight cooperativity above 50 %. An association - dissociation equili-

brium is suggested. ATP has an effect on O₂-binding, but there probably are other modifiers. The results are discussed in relation to the measured environmental parameters.

II. INLEIDING

De leden van het phylum Annelida leven in milieus die, wat zuurstofconcentratie betreft, zeer sterk uiteenlopen. De anneliden vertonen dan ook een grote variatie in adaptaties van de ademhaling. Uit fysiologisch oogpunt zijn de verschillende ademhalingspigmenten het interessantst. Deze variëren bij anneliden van cellulaire haemoglobinen met lage molecuulgewichten (1,5-6,0 · 10⁴ Daltons) in de coeloomvloeistof, tot extracellulaire, meestal intravasculaire haemoglobine-polymeren (erythrocrurinen) met extreem hoge molecuulgewichten (2,4 - 3,4 · 10⁶ Daltons), terwijl ook chlorocrurinen en haemerythrinen voorkomen. Het hieronder beschreven onderzoek betreft het ademhalingspigment van *Heteromastus filiformis*, en de omstandigheden waaronder deze annelide leeft.

Heteromastus filiformis is de enige soort van het genus *Heteromastus*; familie Capitellidae; orde Sedentaria; klasse Polychaeta; phylum Annelida. Deze soort werd gekozen, omdat de omstandigheden in het milieu waarin hij aangetroffen wordt zeer lage zuurstofconcentraties deden vermoeden.

Heteromastus heeft, zoals alle Capitellidae, als ademhalingspigment haemoglobine in coelomocyten. *H. filiformis* komt in de zee - en wadbodem voor, op plaatsen waar deze uit zandig slik bestaat, en nooit in schoon zand (HARTMANN-SCHRÖDER, 1971). Ook in het slik van mossel - en oesterbanken, waar H₂S - vorming voorkomt. Op slikwadden en in dichtgeslibde prielen komen concentraties van *H. filiformis* tot 7000 per m² voor. *H. fili-*

formis verdraagt zoutconcentratie - verlaging tot 8-5 ‰ en komt ook in brak water voor. De verticale verspreiding gaat van het bovenste Littoraal tot in het Bathyaal tot ongeveer 3000 m. diepte. De horizontale verspreiding omvat. Noordelijke ijszee, noordelijke Stille oceaan, noordelijke Atlantische oceaan tot Middellandse zee en Zwarte zee, de hele Noordzee, Skagerak, Kattegat tot noordelijke Öresund, Zuid Afrika en de Perzische golf.

H. filiformis is rood van kleur, wordt 10 tot 30 cm lang en 1 mm dik, en leeft met de kop naar beneden in een meestal verticale gang, die zich op 10-20 cm diepte vertakt in zg. vreetgangen. (zie Fig. 1.). De gangen vertonen geen lichtgekleurde oxidatiemantel, zoals bijvoorbeeld bij *Arenicola* wordt waargenomen. Dit wijst erop dat de gangen niet worden geventileerd. De uitwerpselen worden aan de oppervlakte gedeponeerd en zijn daar waarneembaar als zwarte hoopjes van enige milimeters doorsnede, die bestaan uit langwerpige "pilletjes" van 0,5-0,6 mm lang (zie Fig. 1.). *H. filiformis* is zeer belangrijk voor de bioturbatie in de wadbodem (CADÉE 1977).

Bij het onderzoek van de zuurstofbindingseigenschappen van ademhalingspigmenten wordt gebruik gemaakt van de zuurstof-evenwichtscurven (verder O₂-curven genoemd). Deze curven geven het verband tussen de partiële zuurstofspanning (pO₂) in bloed, coeloomvloeistof of pigmentoplossing, en het percentage van het pigment dat geassocieerd is met zuurstof. (Voor bepaling van de curven zie hoofdstuk III). De zuurstofspanning waarbij 50 % van het pigment geassocieerd is met O₂ wordt P₅₀ genoemd, en is een maat voor de affiniteit van het pigment voor O₂.

Als men log pO₂ uitzet tegen log y/100-y (y = % pigment geassocieerd met O₂), dan ontstaat een rechte lijn, waarvan de helling een aanduiding is voor de mate waarin de verschillende haem-groepen in het pigment elkaar coöperatief beïnvloeden.

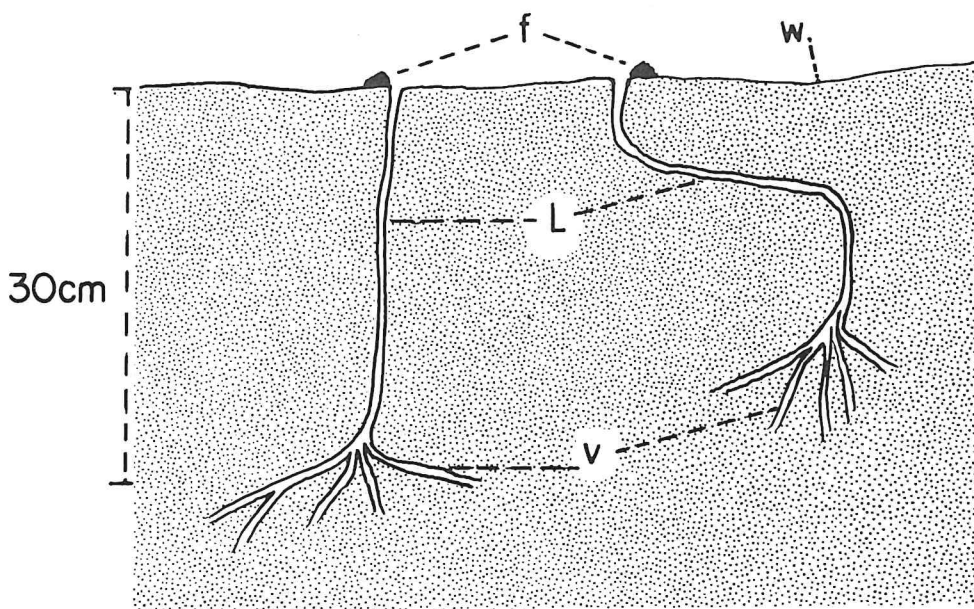
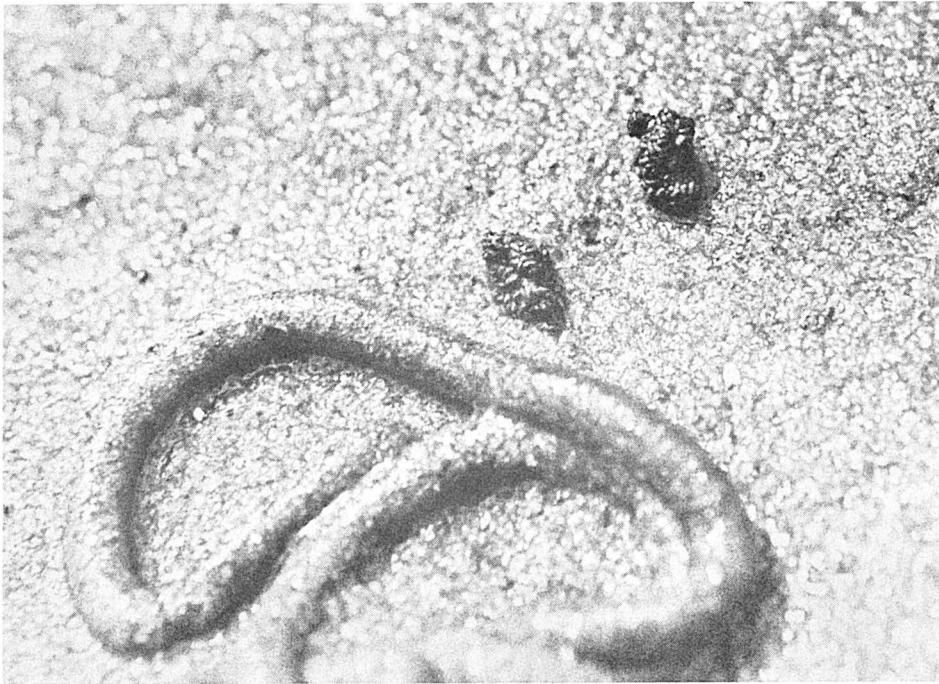


Fig. 1. Leefwijze *H. filiiformis*; onder: vertikale doorsnede van de gangen, l: leefgangen, v: vreetgangen, w: wadbodem, f: faecaliënhoopjes. boven: faecaliënhoopjes van *H. filiiformis* op het wad, naast die van een jonge *Arenicola* (circa 5x ware grootte).

Een dergelijke grafiek wordt Hill-plot genoemd, en de helling de Hill-coëfficiënt : n (PROSSER, 1973). Als er geen interactie is tussen de haem-groepen dan is de O_2 -curve hyperbolisch, en de Hill-coëfficiënt $n=1$. Bij positieve interactie is de O_2 -curven sigmoidaal, en $n > 1$.

Bij een sigmoidale O_2 -curve is een grotere afgifte van O_2 aan de weefsels mogelijk dan bij een hyperbolische curve. Dit effect wordt voor *H. filiformis* beschreven in hoofdstuk V fig. 18. Een betere O_2 -afgifte in de weefsels wordt ook mogelijk gemaakt door de invloed van pH en organische fosfaten op het zuurstofbindingsevenwicht. Wat de invloed van de pH betreft worden twee effecten onderscheiden. Het Bohr effect is het effect van de pH op de affiniteit van het pigment voor zuurstof; $\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$. Bij een normaal (negatief) Bohr effect, wordt de affiniteit lager bij lagere pH. Het Root-effect is de verlaging van de maximale hoeveelheid O_2 die gebonden kan worden bij verlaging van de pH.

Evenals bij vertebraten hebben bij anneliden sommige organische fosfaten een verlagend effect op de affiniteit van het ademhalingspigment voor O_2 . Bij verschillende anneliden is dit effect aangetoond voor ATP, 2-3 DPG en IHP (WEBER, 1977), terwijl er mogelijk nog andere modifiers bestaan (WEBER, persoonlijke mededeling).

In de weefsels, waar de zuurstof afgestaan moet worden zullen de concentraties van CO_2 en organische fosfaten hoger zijn dan op de plaats van O_2 -opname. De hierboven beschreven effecten zullen dus alle een grotere O_2 -afgifte mogelijk maken. Volgens ROOT (1943) geven andere organische zuren (bijv. melkzuur) hetzelfde effect als CO_2 . We kunnen dus aannemen, dat niet CO_2 , maar H^+ de modifier is.

De invloed van de temperatuur op de O_2 -binding kan worden

gekaracteriseerd door de enthalpie-verandering ΔH , die kan worden berekend uit de geïntegreerde VAN'T HOFF vergelijking :

$$\Delta H = -2,303 R \frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta (1/T)} \quad (T = \text{absolute temperatuur; } R \text{ is de gas-konstante}).$$

De zuurstofbindings-eigenschappen van de pigmenten zijn bij ongeveer 40 anneliden onderzocht (reviews van WELLS & DALES, 1976 en van WEBER, 1978). Deze eigenschappen variëren sterk van soort tot soort. Voor de P_{50} worden waarden gevonden van 3,4 N/m² bij *Cirraformia grandis* (SWANEY & KLOTZ, 1971) tot 490 N/m² bij *Eupolyornia crescentis* (MANWELL, 1959). De Hill-constante (n) is voor de meeste haemerythrines en cellulaire haemoglobines ongeveer 1, terwijl voor sommige erythrocruorinen waarden van bijna 6 gevonden worden (bijvoorbeeld *Arenicola cristata*; $n = 5-6$. WAXMAN, 1971). Bij de intracellulaire haemoglobine van *Amphitrite ornata* vertoont de Hill-plot een knik: n neemt toe van ongeveer 1,5 (bij 50 % O₂-verzadiging) tot 2 (bij 75 % O₂-verzadiging) (MANGUM et al., 1975).

De affiniteit voor zuurstof van de meeste coeloom-pigmenten ondervindt weinig of geen invloed van de pH; de Bohr-faktor is zeer klein of nul. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de afwezigheid van significante pH-gradiënten in het coeloom (WEBER, 1978). Ook bij vasculaire pigmenten is het Bohr-effekt soms afwezig of gering, er komen echter vaker hoge waarden voor dan bij coeloom-pigmenten. De hoogste waarde die bij anneliden werd gevonden is -1,5, bij *Cirraformia grandis* erythrocruorine (SWANEY & KLOTZ, 1971). Over de invloed van de pH op de totale hoeveelheid O₂ die kan worden gebonden (Root-effekt) bestaan voor de anneliden vrijwel geen gegevens.

Het zou te ver voeren om hier in te gaan op de eigenschappen van alle tot nu toe onderzochte pigmenten van anneliden. We beperken ons daarom tot de groep anneliden, die beschikt over

Tabel I

Zuurstofbinding en moleculaire eigenschappen van intracellulaire coeloomhaemoglobinen van anneliden. C=coeloomvloeistof; S=celsuspensie; P=fosfaatbuffer; T=trisbuffer. Gegevens van Capitellidae ontleend aan WELLS & WARREN (1975); van *G. americana* aan WEBER et al. (1977b); van *G. dibranchiata* aan MANGUM & CARHART (1972), HOFFMAN & MANGUM (1970), SEAMONDS & FORESTER (1972), WEBER et al. (1977b), IMAMURA et al. (1972), VINOGRADOV et al. (1976) en MIZUKAMI & VINOGRADOV (1972); van *G. gigantea* aan WEBER (1973) en WEBER & BOL (1976); van *G. Rouxii* aan WEBER & HEIDEMANN (1977); van *Travisia pupa* aan MANWELL (1960); van *Amphitrite ornata* aan respectievelijk MANGUM et al. (1975) en WEBER et al. (1977a); van *Enoplobranchus sanguineus* aan respectievelijk MANGUM et al. (1975) en WEBER et al. (1977a); van *Pista pacifica* aan TERWILLIGER (1974); van *Terebella lapidaria* aan WELLS & DULES (1975) en van *Thelepus crispus* aan GARLICK & TERWILLIGER (1974) (vergelijk ook het overzicht van WEBER (1978).

Soort	mol gew. (10 ³ Dalton)	p50 (N.m ⁻²)	n	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	φ	Omstandigheden °C pH		
Capitellidae:								
<i>Capitella capitata</i>	-	41	1,1	-	0	15	6,7	-7,4 C
<i>Notomastus latericeus</i>	36	41	1,0	-	0	15	6,7	-7,4 C
Glyceridae:								
<i>G. americana</i>	-	98	1,4	-47,0	-0,11	20	7,4	T
<i>G. dibranchiata</i>								
celsuspensie	-	102	0,82	-	-	21	7,1	S
haemolysaat	-	95-100	1,0-1,1	-47,0	-0,10	20	7,0	-7,2 P
monomere fraktie	15,9	68	1,0	-	0	20	7,0	-7,3 P,T
polymere fraktie	-	160	1,2-1,3	-	±-0,23	20	7,3	P
<i>G. gigantea</i>								
cel suspensie	-	100	-	-	-	20	7,4	-7,5 S
haemolysaat	-	190	1,8	-55,0	-	20	7,4	T
monomere fraktie	18	-	-	-	-			
polymere fraktie	60,5	-	-	-	-			
afz. Hb componenten	-	54-230	-	-	-	20	7,17	P
<i>G. Rouxii</i>								
haemolysaat	-	109	1,5	-55,9	-0,4	15	7,3	C
lichte fraktie	20	-	-	-	-			
zware fraktie	49	-	-	-	-			
Opheliidae:								
<i>Travisia pupa</i>	-	4,8	-	-	0	22	7,08-7,86	P
Terebellidae:								
<i>Amphitrite ornata</i>	17,4	22-35	0,91	-	0	20	6,6	-7,9 S
	-	38	-	-	-	20	6,3	-9,0 T
<i>Enoplobr. sanguineus</i>	-	18	-	-	0	20	6,8	-7,8 S
	16,4	19	1,0	-68,9	0	20	6,3	-9,0 T
<i>Pista pacifica</i>								
	16-17	60	1,55	-43,7	-	20	6,7	-9,0 P
<i>Terebella lapidaria</i>	-	27	1,3-1,5	-54,6	0	15	6,50-7,28	C
<i>Thelepus crispus</i>	16-17	43	1,54	-35,3	0	20	7,0	P

intracellulaire haemoglobinen in de coeloomvloeistof, waartoe ook *Heteromastus* behoort. In Tabel I wordt een overzicht gegeven van deze groep. WELLS & DALES (1976) kwamen, op grond van de tot dan toe bekende resultaten voor haemoglobinen in coelomo-

cyten, tot de conclusie dat er bij deze haemoglobinen waarschijnlijk geen haem - haem - interakties optreden. Voorzover er wel interactie gevonden werd (Hill-constante $n > 1$) schreven zij dit toe aan de gebruikte methode, waarbij men uitging van de (foute) veronderstelling, dat in lucht 100 % O₂-verzadiging van het pigment zou optreden. Dit argument gaat niet op indien er zuivere zuurstof werd gebruikt om 100 % verzadiging te bereiken. Deze methode werd gebruikt bij de in Tabel I vermelde resultaten van *Glycera americana* en *G. Gigantea*, die beide een zwakke, maar significante, haem - haem - interactie vertonen.

De in de literatuur gegeven resultaten zijn vaak moeilijk vergelijkbaar, omdat de metingen onder verschillende omstandigheden werden verricht (zie Tabel I; kolom 7). Vooral verschillen in de gebruikte buffers zijn belangrijk, omdat volgens BENESCH et al. (1971) alleen Tris buffers geen meetbaar effect hebben op de zuurstof dissociatie-curve.

III MATERIAAL EN METHODEN

De in dit onderzoek gebruikte dieren werden verzameld op het wad bij de NIOZ haven. De coeloomvloeistof werd verzameld door insnijden van de proboscis. Voor de bepaling van een O₂-curve werd ongeveer 3 microliter coeloomvloeistof gebruik. Hiervoor waren een tot drie dieren per bepaling nodig. Elke bepaling werd in drievoud uitgevoerd.

De hoeveelheden coeloomvloeistof die per dier werden verkregen waren te klein, en de houdbaarheid ervan te kort, om het mogelijk te maken hieruit haemoglobine te zuiveren. Daarom werden, ter verkrijging van haemoglobine-oplossingen, telkens 150-200 gewassen en gedroogde dieren gehomogeniseerd in 3-5 ml

tris HCl buffer (pH 7,1 ionsterkte 0,1, waarna direkt werd gecentrifugeerd, onmiddellijk gevolg door gelchromatografie van de verkregen helderrode vloeistof. De gelchromatografie werd uitgevoerd met een kolom van 1,5 x 95 cm, gevuld met Sephadex G75, geëluëerd met tris-HCl buffer (pH 7,1 ionsterkte 0,1) met een elutiesnelheid van 27 ml/h en een fraktie volume van 2,4 ml. Het elutiepatroon werd vastgelegd door een LKB Uvicord II (afgesteld op een gloflengte van 280 nm) gekoppeld aan een recorder. Alle bewerkingen werden bij 4 °C uitgevoerd.

Alle zuurstof-evenwichten werden bepaald in 0,1 N tris-HCl en bistris-HCl buffers, waarvan de ionsterkte op 0,7 werd gebracht met NaCl omdat bij lagere ionsterkte lyse van de coelomocyten optrad. De O₂-curven werden bepaald met de diffusiekamer methode volgens NIESEL & THEWS (1961), modificatie volgens SICK & GERSONDE (1969) (zie fig. 2). Hierbij werd gebruik gemaakt van een Eppendorf fotometer (model 1101 M), voor continue registratie gekoppeld aan een Servegor kompensatierecorder RE5a met transformatietrap E1853 voor linearisatie van de extinktie. Deze methode maakt gebruik van de spektroskopische verschillen tussen geoxygeneerde en gedeoxygeneerde haemoglobine bij een golflengte van 436 nm. Uitgaande van de extinktie van volledig gedeoxygeneerde haemoglobine is de afname van de extinktie recht evenredig met de hoeveelheid geoxygeneerd haemoglobine. Een pigmentmonster wordt in een zeer dunne laag (maximale laagdikte 0,05 mm) op een glasplaatje in een afgesloten kamertje, de zogenaamde diffusiekamer, in de lichtbundel van een spektrofotometer gebracht. Door de diffusiekamer wordt nu zuivere zuurstof geleid totdat de recorder een stabiele lijn aangeeft, die overeenkomt met 100% oxygenatie. Vervolgens wordt zuivere stikstof doorgeleid, wat een lijn oplevert die overeenkomt met 0% oxygenatie. Nu wordt de gastoevoer afgesloten, zodat een "diffusie-

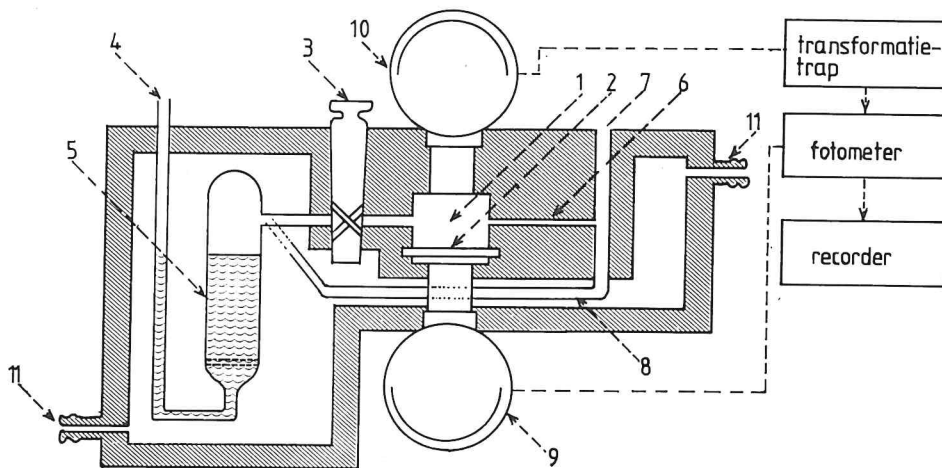


Fig. 2. Diffusiekamerapparaat. 1. diffusiekamer; 2. glasplaatje met pigment-monster; 3. vierwegkraan; 4. toevoer van de gassen (N_2 , O_2 , ijkassen, diffusiegas); 5. vier bubbelflesjes (slechts één getekend), waarin de gassen op de juiste temperatuur en vochtigheid worden gebracht; 6. diffusiecapillair; 7. gas-uitlaat; 8. toevoer diffusiegas; 9 en 10. lamp en fotocel van de fotometer; 11. toevoer en afvoer van de thermostaat.

gas" (een mengsel van O_2 en N_2) via een capillair in de kamer kan diffunderen. De pO_2 in de kamer neemt dan vrijwel lineair met de tijd toe (hierop wordt nog nader ingegaan) zodat de O_2 -evenwichtscurve kan worden geregistreerd. De curve wordt geïjkt met de lijnen die geregistreerd worden na het doorleiden van "ijkgas"-mengsels met bekende samenstelling. De curve kan nu worden uitgewerkt (zie fig. 3.), waarbij op de tijd-as de pO_2 wordt uitgezet (door de constante papiersnelheid is dit een lineaire schaal) en de recorder-as wordt verdeel in 0-100 % oxygenatie. Eventuele afwijkingen die ontstaan door het verlopen van de apparatuur worden grafisch gecorrigeerd.

Een te grote laagdikte van het monster werkt storend, doordat er een pO_2 -gradiënt binnen de laag ontstaat. Bij een laagdikte kleiner dan 0,05 mm is dit effect verwaarloosbaar.

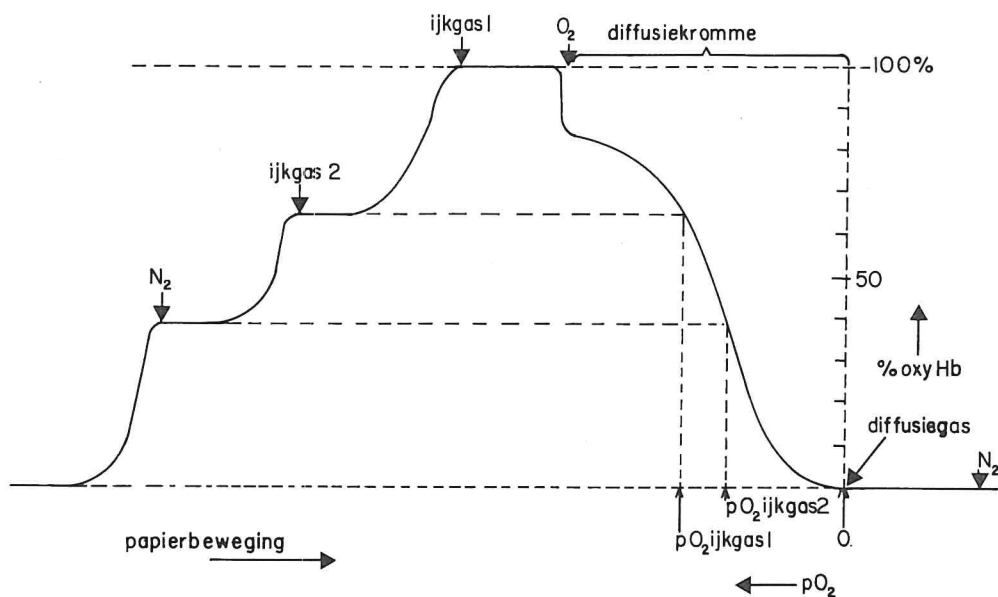


Fig. 3. Uitwerking van een O_2 -curve. De getrokken lijn is de geregistreerde curve, de stippellijnen zijn hulplijnen. De pijltjes geven aan waar op een ander gas(-mengsel) werd overgegaan. Na het trekken van de horizontale hulplijnen ($N_2 = 0\%$ en $O_2 = 100\%$ oxygenatie), kan vertikaal een schaalverdeling worden gemaakt van 0 - 100% oxy-Hb. De verticale hulplijnen worden getrokken vanaf de snijpunten van de ijklijnen met de diffusiekromme. Nu kan m.b.v. deze lijnen horizontaal een schaalverdeling voor pO_2 gemaakt worden, zodat voor elke pO_2 het percentage oxy-Hb kan worden afgelezen, en andersom.

De diffusiekamer-methode kan volgens SICK & GERSONDE (1969) foutieve resultaten geven als het diffusiegas een te hoge of te lage O_2 -druk heeft, of als het pigment-monster in een te dikke laag wordt opgebracht. De diffusie vindt bolvormig vanuit het capillair (zie fig.2) plaats, zodat een pO_2 -gradiënt over het oppervlak van het monster ontstaat. Bij een te hoge pO_2 van het diffusiegas wordt het effect van deze gradiënt storend voor de meting. Dit effect is verwaarloosbaar als tenminste 1,5 minuut verloopt voordat de P_{50} is bereikt. Een te lage pO_2 van het diffusiegas heeft tot gevolg dat het quasilineaire bereik van de pO_2 te kort wordt. Dit quasilineaire bereik gaat tot ongeveer 11 % van de evenwichtsdruk (= pO_2 diffusiegas).

Binnen dit bereik is de afwijking van zuiver linear kleiner dan 1 %.

"Het Bohr effect ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$) werd bepaald door $\log P_{50}$ uit te zetten tegen pH".

Het Root-effekt (invloed van de pH op de maximale hoeveelheid O_2 die kan worden gebonden) werd bepaald door bij verschillende pH 's (tris-HCl en bistris-HCl buffers) de extinkties bij 540 en 560 nm van geoxygeneerde haemoglobine te vergelijken met die van gedeoxygeneerde (na toevoeging van dithioniet).

Isoëlektrofocusing van de haemoglobine werd uitgevoerd met een LKB multiphor op PAG-gels. Een schatting van het molgewicht werd gemaakt door m.b.v. S.D.S. disc-gel elektroforese.

Voor metingen van de O_2 -concentratie in het wad werden op verschillende dieptes rubber gasslangen ingebracht, die aan het uiteinde waren voorzien van een "aquarium-bruissteentje". Na enige dagen (voor stabilisatie van de bodem) werd hierdoor interstitieel water opgezogen, waarin ter plaatse de pH en de O_2 -spanning werden gemeten met een IL 213 Bloodgas analyzer met een IL 227 meetkamer, voorzien van een Clark zuurstof membraan-elektrode met een zeer laag eigen verbruik (Instrumentation Laboratory, U.S.A.). Om de in de slangen aanwezige zuurstof te verwijderen werd er water aangezogen tot de gemeten waarden van de pO_2 stabiel werden (30-50 ml). Op het wad werd ook, direkt na vangst, de pH gemeten in kop en staart van *H. filiformis*. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een capillaire calomelektrode met micro-junction-tube en een antimoonelektrode (Activion Glass Ltd.) volgens Beeley (1971).

IV RESULTATEN

1. Waarnemingen

Zoals in hoofdstuk I werd vermeld geschiedt het zuurstoftransport bij *H. filiiformis* door haemoglobine, dat zich in cellen, de zg. coelomocyten (fig. 4), in de coeloomvloeistof bevindt. Bij waarneming van levende *H. filiiformis* onder een binoculair valt op dat deze coelomocyten zich in clusters door het lichaam bewegen, en wel in gescheiden stromen; van kop naar staart en terug. Deze gescheiden stromen zijn mogelijk door tussenwanden in het coeloom (A. Dral, ongepubliceerd). Bij de staart is het lichaamoppervlak vergroot door uitstulpingen waar de coelomocyten doorgeleid worden. Ongeprepareerd zijn de coelomocyten onder de microscoop zichtbaar als een soort afgeplatte aardappels met zwarte puntjes. Na lyse van een cel blijven deze zwarte puntjes vrij in de vloeistof zichtbaar, zodat met een microscoop kan worden gecontroleerd of er lyse is opgetreden in een monster coeloomvloeistof.

Bij waarnemingen op het wad, bij laagwater, bleek *H. filiiformis* zich meestal op een diepte van 10 tot 40 cm op te houden, terwijl uit het toenemen van grootte en aantal van de fecaliën hoopjes gekoncludeerd kan worden dat de dieren tijdens het droogvallen van het wad af en toe met hun staartpunt naar de oppervlakte komen.

2. Milieu

Op de plaats waar de *H. filiiformis* werden verzameld voor het onderzoek, werden metingen in de wadbodem uitgevoerd van pH, temperatuur en zuurstofdruk in het interstitiële zeewater (zie fig. 5 en Hoofdstuk III). De metingen werden overdag bij

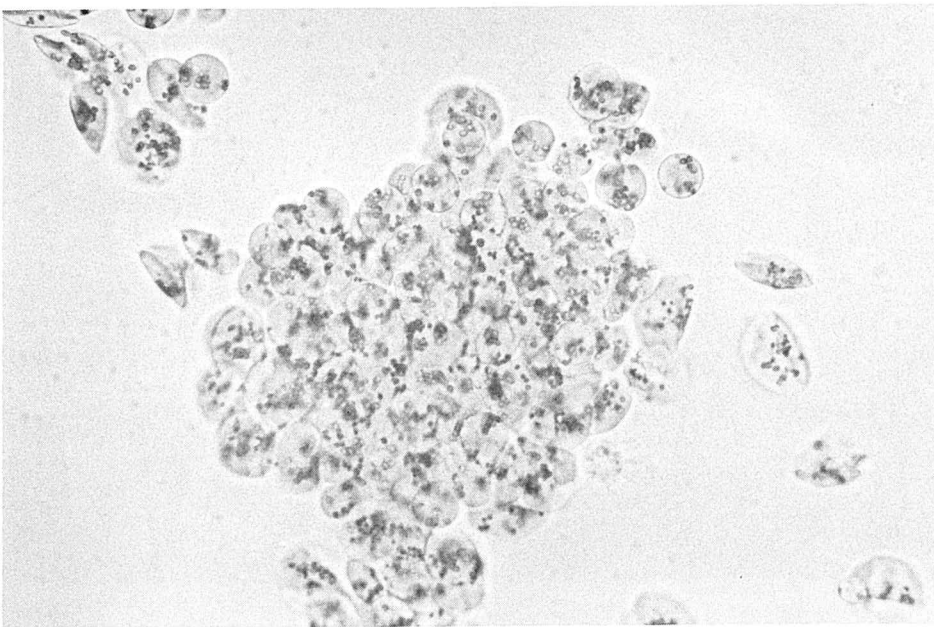


Fig. 4. Coelomocyten van *H. filiformis*; ongeprepareerd; 400 x vergroot; opname met groenfilter. De doorsnede is 13-18 μm . Clusters als op deze foto worden ook in vivo waargenomen (foto A. Dral).



Fig. 5. Apparatuur voor de meting van pO₂, pH en temperatuur in het interstitiële water van de wadbodem.

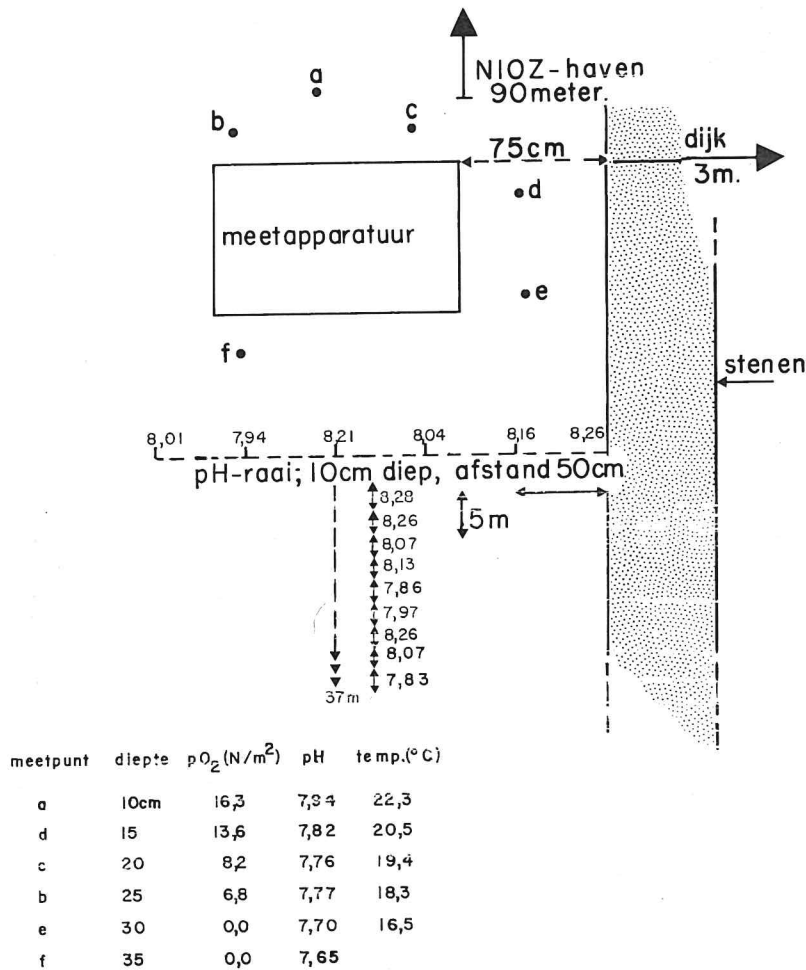


Fig. 6. Situatieschets en resultaten van metingen in het interstitiële water van de wadbodem, op een plaats waar *H. filiformis* voorkomt. a t/m f: Meetpunten voor pO_2 -meting, bestaande uit een slang met een aquarium-"bruissteentje", waardoor interstitieel water wordt opgezogen. De metingen (pO_2 , pH en temperatuur) werden uitgevoerd tijdens het droogliggen van het wad. Temperatuur van de lucht: $20,2^\circ C$ (in de schaduw).

laagwater en overwegend droog weer uitgevoerd op 15-6, 13-7, en 15-7'77. In fig. 6 wordt een situatieschets van de metingen en gegeven, waarin de resultaten van de zuurstof-, pH- en temperatuur-metingen verwerkt zijn. Door de gebruikte methode

(zie hoofdstuk III) was het onmogelijk de pO_2 te meten op minder dan 10 cm diepte, omdat bij geringere diepte oppervlaktewater aangezogen zou worden.

3. Zuurstofbindingseigenschappen van *H. filiformis* haemoglobine

Doordat slechts een zeer geringe hoeveelheid coeloomvloeistof per individu kon worden afgetapt, waren er vaak 2 of 3 dieren nodig om voldoende materiaal (3 microliter) voor een O_2 -meting te verzamelen. In deze kleine hoeveelheden was het onmogelijk de pH te meten zonder de cellen te vernielen. De O_2 -metingen met coeloomvloeistof als zodanig (d.w.z. zonder toevoegingen) werden bemoeilijkt doordat vaak haemolyse optrad tijdens de meting, zodat t.g.v. de veranderende lichtverstrooiing de resultaten niet meer geïnterpreteerd konden worden. De cellen bleken beter heel te blijven als een 0,1 M. tris-HCl buffer werd toegevoegd, die met NaCl op een ionsterkte van 0,7 was gebracht. Door het kleine volume van de monsters was het niet mogelijk de haemoglobine-concentratie met enige nauwkeurigheid te bepalen. Metingen onder gelijke omstandigheden met sterk verschillende Hb-concentraties bleken echter identieke resultaten op te leveren (tabel VI nr 6-8; lage conc. en 7-9 hoge conc.), zodat geen rekening gehouden hoeft te worden met een concentratie-effect. De O_2 -dissociatiecurves werden op de in hoofdstuk II beschreven wijze geregistreerd met coeloomvloeistof als zodanig met en zonder buffer, en met gehaemolyseerde coeloomvloeistof, gehaemolyseerde gewassen cellen, en oplossingen van ge-"stripte" (dat is d.m.v. gelchromatografie gezuiverde) haemoglobine, alle met verschillende buffers.

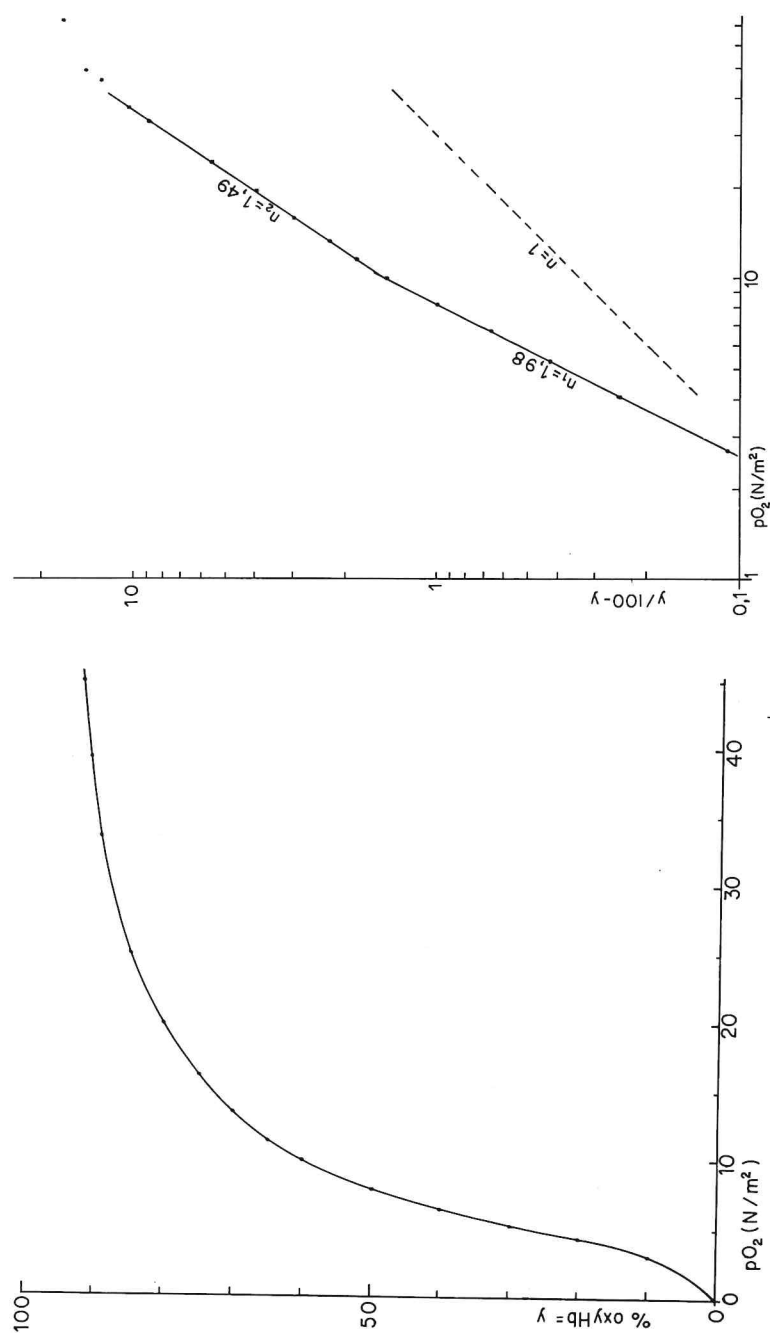


Fig. 7. O_2 -curve van *H. filiformis* (links), met de bijbehorende Hill-plot (rechts). Coeloomvloeistof (niet gehaemolyseerd) met Tris-HCl buffer (pH 7,82; $\mu = 0,7$) bij $15^\circ C$. De in de O_2 -curve aangegeven punten werden gebruikt voor de berekening van de Hill-plot. Ter vergelijking werd een (gestippelde) lijn met $n = 1$ getekend. De Hill-plot vertoont een neerwaartse knik, die meestal in de buurt van de P_{50} ligt.

3.1. P_{50} en Hill-coëfficiënt

Na uitwerking van de curves (vgl. fig. 3) werden Hill-plots gemaakt, waarna uit minimaal drie curves per monster de P_{50} en de Hill coëfficiënt n werden gemiddeld. In fig. 7 wordt een voorbeeld van een dergelijke curve met de bijhorende Hill-plot gegeven. De gevonden waarden voor P_{50} en n worden gegeven in Tabel II t/m VI. De meeste Hill-plots bleken in de buurt van de P_{50} een neerwaartse knik te vertonen (vgl. fig. 7). In de tabellen worden daarvan twee n -waarden gegeven: n_1 is de waarde voor het stuk onder de knik en n_2 voor het stuk erboven. In sommige gevallen wordt er geen n_2 gegeven. Dit betekent niet dat er geen knik aanwezig was, maar dat het pseudolineair bereik (zie hoofdstuk III) te kort was om een eventuele knik te vinden. Voor het geval dat bij een voldoende groot pseudolineair bereik geen knik werd gevonden wordt in de tabel $n_2 = n_1$ gegeven (Tabel III nr 14). Er werd nagegaan of de gevonden knik een gevolg zou kunnen zijn van een te grote laagdikte of een te hoge pO_2 van het diffusiegas (zie hoofdstuk III). Het bleek echter, dat, ook bij een laagdikte van 0,02 mm en een diffusiegas waarbij de P_{50} na 3 min bereikt werd, de knik aanwezig bleef (Tabel III nr 4 en 9). Een zeer dikte laag (0,1 mm) of een diffusiegas, waarbij de P_{50} na 0,5 min werd bereikt veroorzaakten een s-vormige Hill-plot (zie fig. 8), terwijl de normaal gevonden Hill-plots uit twee zuiver rechte lijnen bestonden. We menen daarom te mogen concluderen dat de gevonden neerwaartse knik in de Hill-plots een reële eigenschap is van de onderzochte haemoglobine.

De knik in de Hill-plot werd gevonden in alle soorten monsters (coeloomvloeistof met en zonder buffer; gehaemolyseerde coeloomvloeistof en gewassen cellen; gestripte haemoglobine). Slechts in één geval werd geen knik gevonden (Tabel III nr 14).

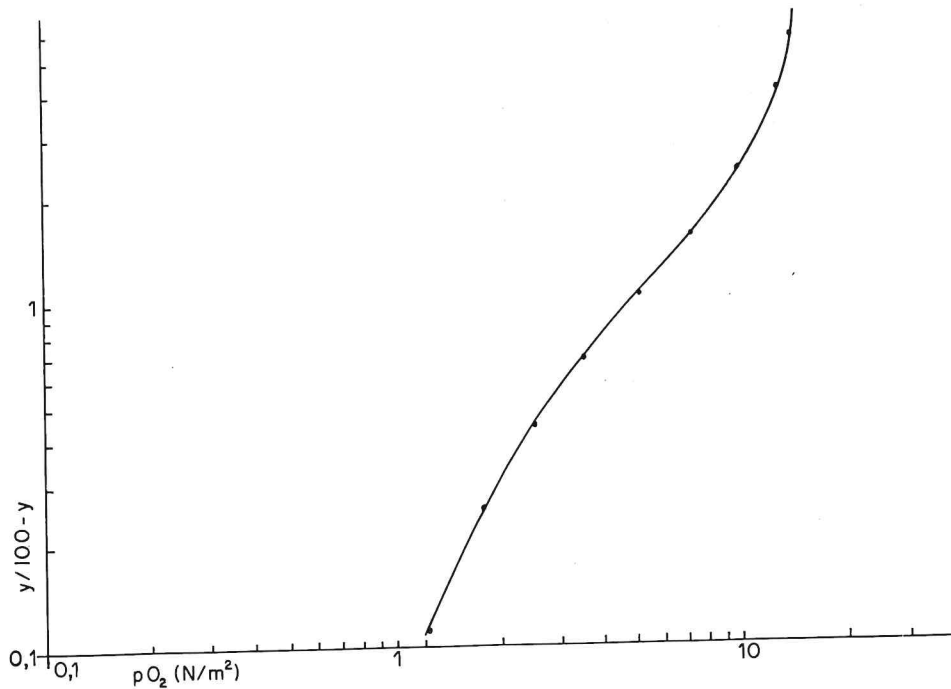


Fig. 8. Hill-plot van een monster met te grote laagdikte. De lijn vertoont geen knik en is enigszins s-vormig. Monster: coeloomvloei-stof van *H. filiformis* met Tris-HCl buffer (pH 7,82; $\mu = 0,7$) bij 15°C.

De waarden van n_1 en n_2 bleken sterk te variëren (Tabel II t/m VI). Deze variatie kan waarschijnlijk voor een deel worden toegeschreven aan verschillen in de haemoglobineconcentratie. Dit is voor meeste monsters moeilijk na te gaan, omdat de concentratie niet gemeten kon worden. De in Tabel VI gegeven monsters nr 6 t/m 13 hebben echter alle dezelfde Hb-concentratie, omdat deze monsters genomen werden uit hetzelfde buisje Hb-oplossing. De waarden van n_2 voor deze monsters zijn vrijwel gelijk. Hetzelfde geldt voor nr 1 t/m 5 van Tabel VI. De Hb-concentratie in 1 t/m 5 was iets hoger dan in 6 t/m 13 (afgaande op de donkerdere rode kleur) en ook n_2 is gemiddeld iets hoger. In de genoemde monsters blijkt n_1 nog wel te

Tabel II

Resultaten van O₂-curven van niet gehaemolyseerde coeloomvloeistof zonder buffer. (pH niet meetbaar).

Nr.	Temp. (°C)	P50 (N.m ⁻²)	n ₁	n ₂
1	15	32,6	1,63	1,15
2	15	36,5	1,48	
3	15	32,9	1,78	1,25
4	15	10,5	1,41	
5	20	38,5	1,67	

Tabel III

Resultaten van O₂-curven van niet gehaemolyseerde coeloomvloeistof met Tris-HCl buffers. (13a is hetzelfde monster als 13, na totale haemolyse).

Nr.	Temp. (°C)	pH	P50 (N.m ⁻²)	n ₁	n ₂
1	15	7,46	9,5	1,59	1,00
2	15	7,46	10,1	2,23	
3	15	7,46	9,4	1,66	0,92
4	15	7,82	8,3	1,98	1,49
5	15	7,82	6,3	1,60	1,15
6	15	7,82	6,1	1,73	1,26
7	15	8,24	5,2	1,60	
8	15	8,24	4,8	1,44	1,13
9	15	8,67	4,2	1,99	1,38
10	15	8,67	4,2	2,22	1,47
11	15	8,67	3,4	1,28	
12	15	8,67	3,5	1,53	
13	15	6,55	10,9	1,55	1,22
13a	15	6,55	10,9	1,45	1,16
14	15	5,86	27,3	1,27	= n ₁
15	10	7,66	4,5	1,70	1,28
16	15	7,50	6,7	1,55	1,29
17	20	7,35	7,8	1,38	1,06

variëren. Blijkbaar is n₁ niet alleen van de Hb-concentratie afhankelijk, maar ook van pH en temperatuur. De invloed van pH, temperatuur en organisch fosfaat op n wordt behandeld in 3.2 ; 3.3 en 3.4. De waarden van n₁ en n₂ die voor gestripte haemoglobine gevonden worden (Tabel VI) zijn gemiddeld lager dan voor niet gestripte (Tabel II t/m V). Dit is waarschijnlijk een gevolg van de lagere Hb-concentratie van de gestripte monsters.

Tabel IV

Resultaten van O₂-curven van gehaemolyseerde coeloomvloeistof met Tris-HCl buffers.

Nr.	Temp. (°C)	pH	P50 (N.m ⁻²)	n ₁	n ₂
1	15	6,55	10,8	1,45	1,16
2	15	7,46	8,4	1,96	1,50
3	15	7,46	6,8	1,97	1,48
4	10	8,84	5,0	2,02	
5	15	8,69	6,5	2,21	1,30
6	20	8,55	7,3	1,95	1,20

Tabel V

Resultaten van O₂-curven van haemolysaten van gewassen cellen met Tris-HCl buffers.

Nr.	Temp. (°C)	pH	P50 (N.m ⁻²)	n ₁	n ₂
1	15	7,46	14,4	1,5	
2	15	7,82	9,9	1,23	
3	15	7,82	8,3	1,59	1,10
4	15	8,67	9,5	1,51	1,27
5	5	7,80	6,5	1,99	1,33
6	10	7,66	7,6	1,58	1,13
7	15	7,46	9,5	1,51	1,27
8	20	7,35	15,9	1,25	1,04
9	25	7,20	18,8	1,23	
10	25	7,20	21,9	1,27	

Als men de Tabellen III en IV vergelijkt, dan blijken, bij gelijke temperatuur en pH, de P₅₀-waarden van wel en niet gehaemolyseerde coeloomvloeistof weinig te verschillen. Dat er in gebufferde coeloomvloeistof weinig verschil is in de P₅₀ van wel en niet gelyseerde cellen blijkt vooral duidelijk uit Tabel III nr 13 en 13a. Dit zijn de resultaten van metingen aan hetzelfde monster vóór (13) en na (13a) haemolyse. De P₅₀-waarden van haemolysaten van gewassen cellen (Tabel V) blijken echter iets hoger te liggen dan bij hele coeloomvloestof, terwijl die van gestripte haemoglobine (Tabel VI) beduidend lager liggen. Bij

Tabel VI

Resultaten van O₂-curven van gestripte haemoglobine met Tris-HCl buffers.

Nr.	Temp. (°C)	pH	P50 (N.m. ⁻²)	n ₁	n ₂
1	15	7,30	2,9	1,34	0,94
2	15	7,30	3,5	1,45	0,89
3	15	7,30	3,5	1,26	0,95
4	15	7,30	3,4	1,27	1,13
5	15	7,50	3,7	1,18	0,91
6	15	7,50	3,7	1,28	0,89
7	15	8,24	2,9	1,22	0,83
8	15	8,67	3,0	1,11	0,84
9	5	7,65	1,9	1,42	0,88
10	10	7,48	2,2	1,22	0,85
11	15	7,32	5,3	1,12	0,88
12	20	7,12	6,5	1,04	0,86
13	25	7,01	8,6	1,00	0,85

de interpretatie hiervan dient er rekening mee te worden gehouden, dat de coeloomvloeistof, die gebruikt werd voor Tabel II t/m V, uit de kop werd afgetapt, terwijl in de kop juist zuurstof afgestaan moet worden. Als er dus een faktor is die de affiniteit van de haemoglobine voor O₂ verlaagt (zie hoofdstuk II), dan is deze in de uit de kop afgelapte coeloomvloeistof zeker aanwezig. (zie verder hoofdstuk V).

3.2. Invloed van pH op de O₂-binding

Het Root effect (de invloed van pH op de maximale hoeveelheid O₂ die kan worden gebonden) kon slechts zeer onnauwkeurig bepaald worden, omdat voor een nauwkeurige bepaling enige milliliters bloed of coeloomvloeistof nodig zijn. De metingen werden slechts tweemaal uitgevoerd met zeer geringe hoeveelheden Hb-oplossing. Uit de in Tabel VII gegeven resultaten kan dan ook slechts gekonstateerd worden, dat er alleen bij pH 5,86 een

Tabel VII

Root-effekt bij gestripte haemoglobine (= % Hb die deelneemt aan het O₂-evenwicht, uitgaande van 100 % bij pH 8).

pH	8,10	7,17	6,86	6,72	6,21	5,86
% Hb	100	96	94	92	99	55

duidelijk waarneembaar Root-effekt is (ongeveer 45 % van de haemoglobine bindt geen O₂ neer), terwijl er bij pH 6-8 waarschijnlijk geen of een gering effect is.

Uit fig. 9 blijkt, dat de hele O₂-curve naar rechts (hogere pO₂) verschuift, bij verlaging van de pH. De hellingen van de lijnen in fig. 9, en dus n₁ en n₂, variëren met de pH, maar er is geen duidelijk trend. Bij pH 5,86 verdwijnt de knik in de Hill-plot. Bij monsters met gelijke Hb-concentratie en verschillende pH (Tabel VI nr 6, 7 en 8) neemt n₁ af bij toenemende pH.

De invloed van de pH op de affiniteit van de haemoglobine voor O₂ wordt gegeven in fig. 10. Een maat voor deze invloed is de Bohr-faktor Φ (zie hoofdstuk II). Voor hele coeloomvloei-stof blijkt uit fig. 10 dat $\Phi = -0,34$. De meetpunten voor gehaemolyseerde coeloomvloei-stof vallen samen met die voor hele coeloomvloei-stof. Voor gestripte haemoglobine en voor haemolysaten van gewassen cellen zijn er te weinig meetpunten en is de spreiding te groot om een exacte helling te kunnen bepalen, maar de in fig. 10 gegeven punten wijzen niet op een sterk afwijkend Bohr effect voor deze gevallen.

Met speciale elektrodes (zie hoofdstuk III) kon op het wad, direkt na de vangst, de pH in kop en staart van *H. filiformis* bepaald worden. De pH in de kop varieerde van 6,3 tot 6,6 en in de staart van 6,7 tot 7,0. Tussen kop en staart werd een pH-verschil van gemiddeld 0,45 gevonden (8 metingen), waarbij de pH in de kop het laagst was.

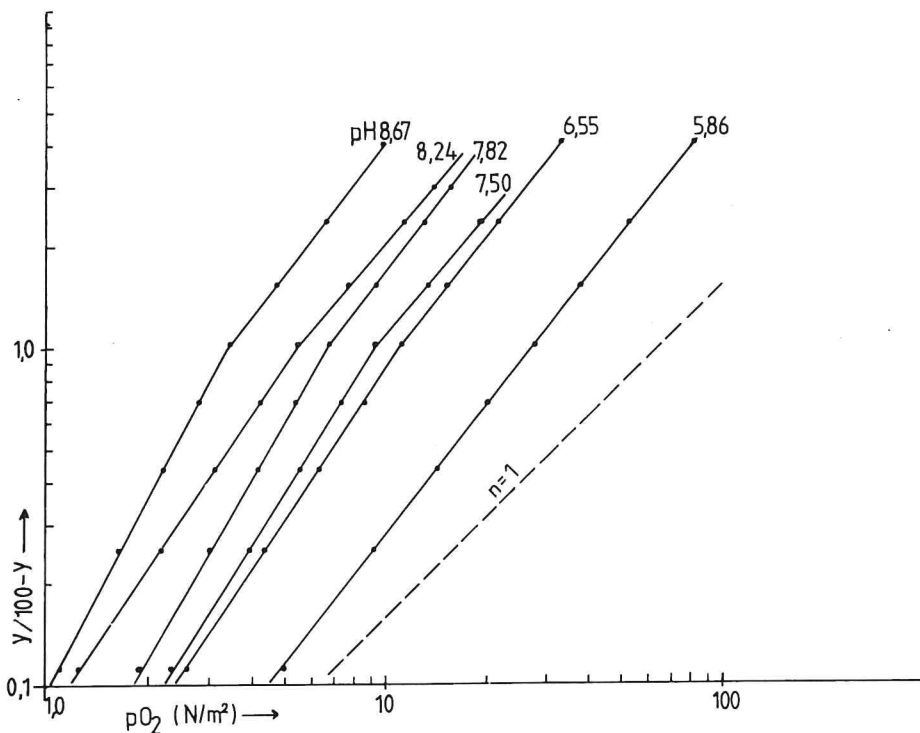


Fig. 9. Hill-plots van *H. filiformis*: coeloomvloeistof bij verschillende pH's; Tris HCl buffers; $\mu = 0,7$; 15°C . Bij pH 5,68 is er geen knik. De waarden van n_1 en n_2 variëren, maar er is geen regelmatig verloop met de pH.

3.3. Invloed van de temperatuur op de O_2 -binding

Als men de Hill-plots van monsters met gelijke concentratie en verschillende temperatuur (fig. 11) vergelijkt, dan blijkt dat n_2 vrijwel niet verandert, maar dat n_1 afneemt bij toenemende temperatuur (van $n_1 = 1,42$ bij 5° tot $1,00$ bij 25°C).

Uit de helling van de grafiek van $\log P_{50}$ tegen de temperatuur (fig. 12) kan, m.b.v. de geïntegreerde Van't Hoff vergelijking (zie hoofdstuk II), ΔH voor het Hb- O_2 -evenwicht worden berekend. De berekende waarden van ΔH , gecorrigeerd voor de op-

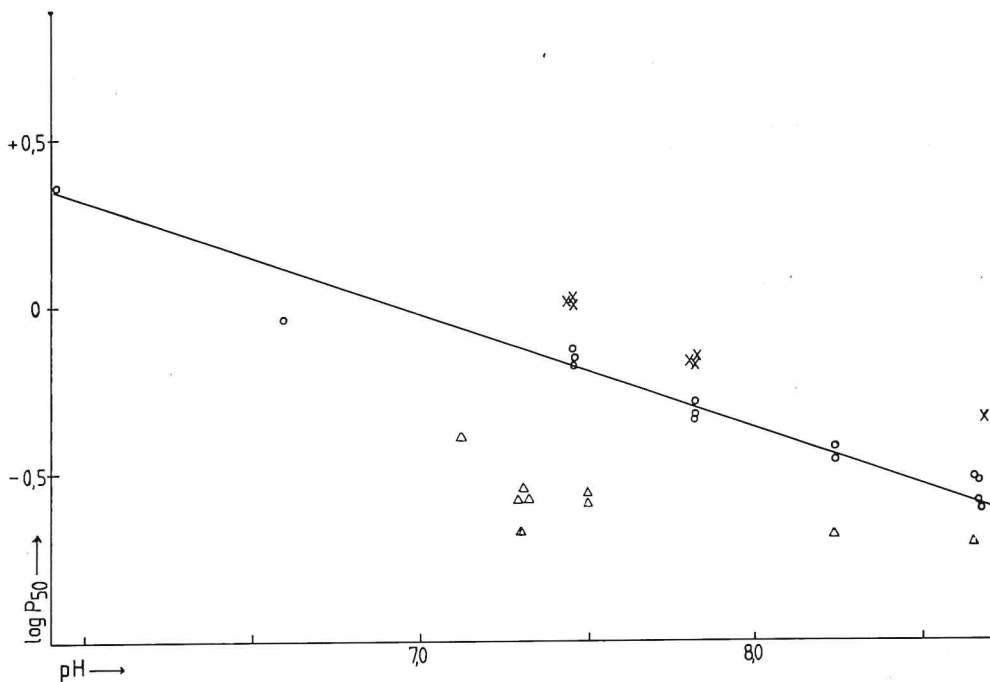


Fig. 10. Bohr effekt ($\emptyset = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) bij *H. filiformis* haemoglobine. Tris-HCl buffers; $\mu = 0,7$; 15°C ; pH 5,86 tot 8,67. 0 = coeloomvloeistof (wel en niet gehaemolyseerd geeft dezelfde waarden voor P_{50}) $\emptyset = -0,34$. x = haemolysaat van gewassen cellen, Δ = "gestripte" haemoglobine.

loswarmte van O_2 , zijn: voor wel- en niet- gehaemolyseerde coeloomvloeistof $-54,4 \text{ k j.mol}^{-1}$, voor haemolysaat van gewassen cellen $-16,3 \text{ k j.mol}^{-1}$ en voor gestripte haemoglobine $-30,5 \text{ k j.mol}^{-1}$. Alle metingen werden uitgevoerd in $0,1 \text{ m}$ Tris-HCl buffer, pH 7,50 (15°C), waarvan de ionsterkte met Na Cl op 0,7 was gebracht. De resultaten werden gecorrigeerd voor de invloed van het Bohr effekt, veroorzaakt door pH-veranderingen onder invloed van de temperatuur.

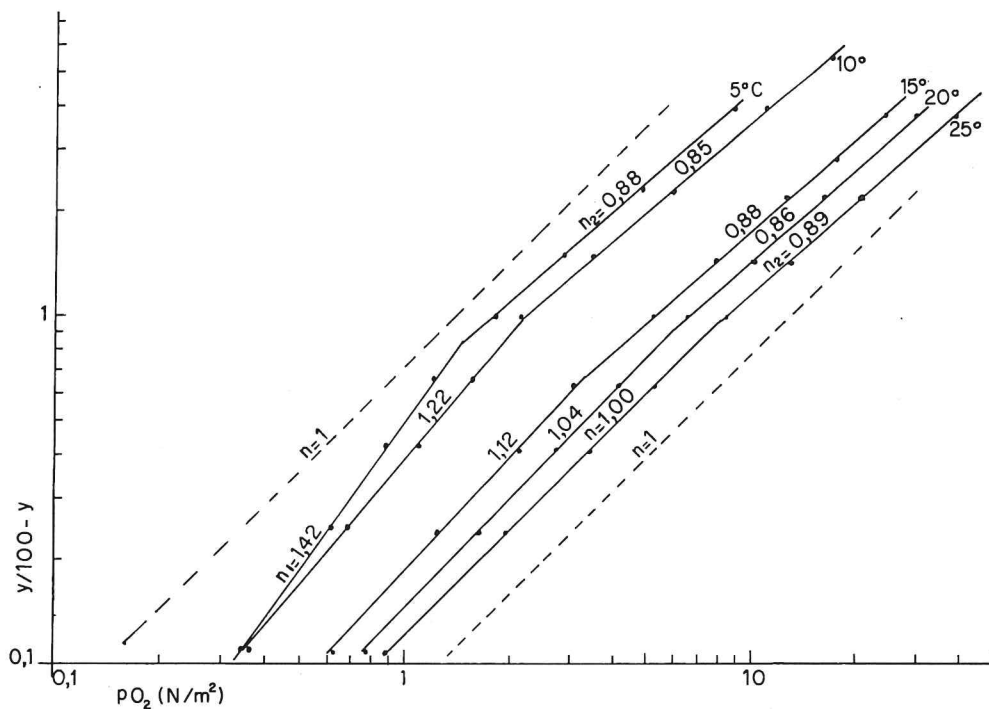


Fig. 11. Hill-plots van "gestripte" haemoglobine van *H. filiformis* bij verschillende temperaturen. Bij hogere temperatuur blijft n_2 vrijwel constant, terwijl n_1 afneemt. De hele curve verschuift naar rechts. Alle monsters hadden dezelfde Hb-concentratie (Tris-HCl buffer, pH 7,50 (bij 15°C), $\mu = 0,7$).

3.4. Invloed van organische fosfaten op de O_2 binding

De invloed van 2-3 DPG en ATP (andere fosfaten waren niet beschikbaar) werd nagegaan door een kristal van een van deze stoffen op te lossen in een monster, waarvan eerst de O_2 -curve was bepaald (zie hoofdstuk III). Dit werd gedaan, omdat het toevoegen van de fosfaten in oplossing een te grote verdunning of een te grote laagdikte van het monster zou veroorzaken. De concentraties van de fosfaten waren hierdoor onbekend, maar vrij hoog. Volgens BENESCH (1969) vormt Hb met fosfaten een 1 : 1 complex, zodat, als de fosfaatconcentratie hoger is dan

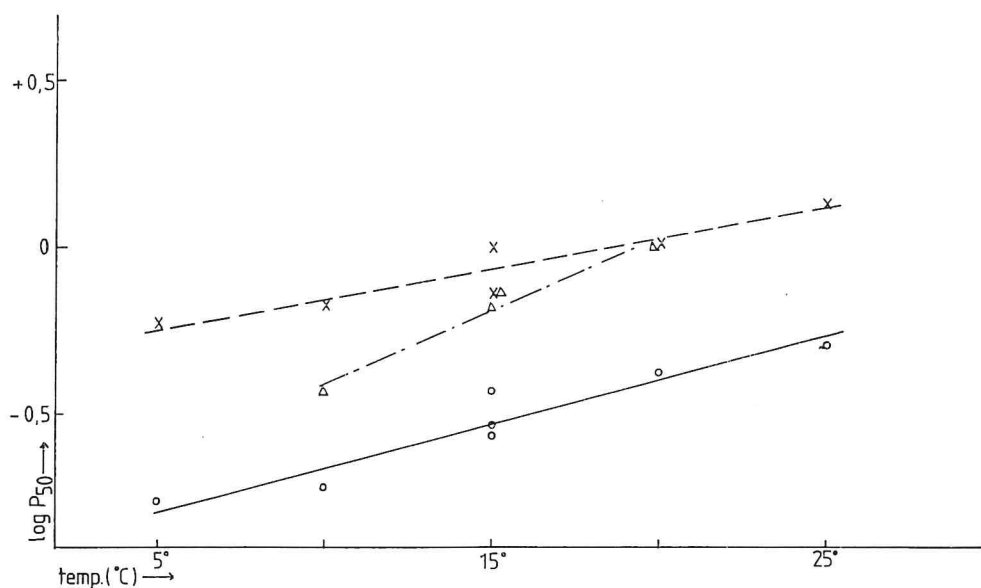


Fig. 12. Effekt van de temperatuur op de P_{50} van *H. filiformis* haemoglobine. Δ = coeloomvloeistof met buffer; $\Delta H = -54,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$. X = haemolysaat van gewassen cellen; $\Delta H = -16,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$. o = "gestripte" haemoglobine; $\Delta H = -30,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Alle P_{50} -waarden werden gecorrigeerd voor de invloed van het Bohr effect, veroorzaakt door pH veranderingen o.i.v. de temperatuur. ΔH werd gecorrigeerd voor de oploswarmte van O_2 .

de Hb-concentratie, het eventuele effect maximaal is. De invloed van 2-3 DPG op n_1 en n_2 is zeer gering (zie fig. 13). De affiniteit voor O_2 neemt iets af na toevoeging van DPG: de P_{50} wordt verhoogd van 3,2 tot 3,7 N.m^{-2} . Het extinktie verschil tussen oxy-Hb en deoxy-Hb bij 436 nm blijft onveranderd. De invloed van ATP is vooral op het onderste deel van de dissociatie-curve vrij groot, zodat n_1 verhoogd wordt (zie fig. 14). De P_{50} blijft constant na toevoeging van ATP, maar het extinktie-verschil tussen oxy-Hb en deoxy-Hb neemt met ongeveer 80 % af. Dit laatste wijst erop, dat onder invloed van ATP, een groot deel van de haemoglobine niet meer deelneemt aan het Hb- O_2 evenwicht.

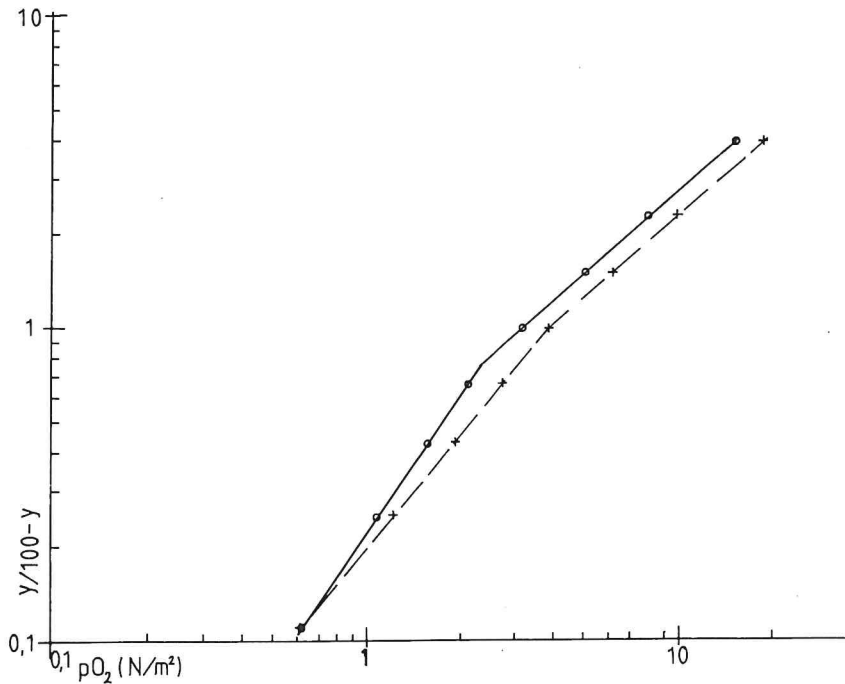


Fig. 13. Invloed van 2-3 DPG op de O_2 -binding. Hill-plots van één monster gestripte haemoglobine van *H. filiformis*, vóór (getrokken lijn) en ná (gestippelde lijn) het oplossen van een kristalletje 2-3 DPG. De hele curve verschuift een beetje naar rechts. (Tris HCl-buffer; pH = 7,50; μ = 0,7; 15°C).

4. Absorptiespektra, molecuulgewicht en isoelektrisch punt van *H. filiformis* haemoglobine

Het absorptiespektrum van geoxygeneerde *H. filiformis* haemoglobine (fig. 15) vertoont de voor haemoglobinen karakteristieke vorm, met de α - band bij 575 nm en de β - band bij 540 nm. De β - band is hoger dan de α - band, wat bij de meeste haemoglobinen andersom is (PROSSER, 1973). Het spektrum van gedeoxygeneerde haemoglobine vertoont een maximum bij 560 nm en, vooral bij hogere pH (zie fig 15), schouders bij 540 en 575 nm. Dat laatste wijst op een gedeeltelijke oxidatie van de haemoglobine.

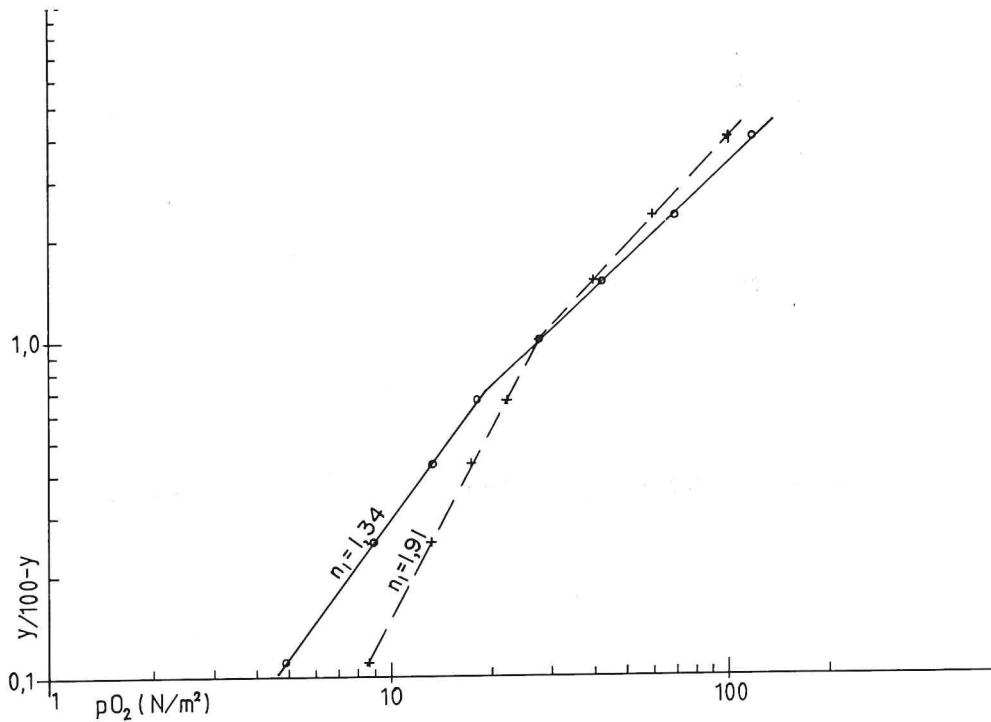


Fig. 14. Invloed van ATP op de O_2 -binding. Hill-plots van gestripte haemoglobine van *H. filiformis*, vóór (getrokken lijn) en ná (stippellijn) het oplossen van een kristalletje ATP. Het onderste deel van de curve verschuift naar rechts, zodat n , groter wordt. (Tris HCl-buffer; pH = 7,50, μ = 0,7; 15°C).

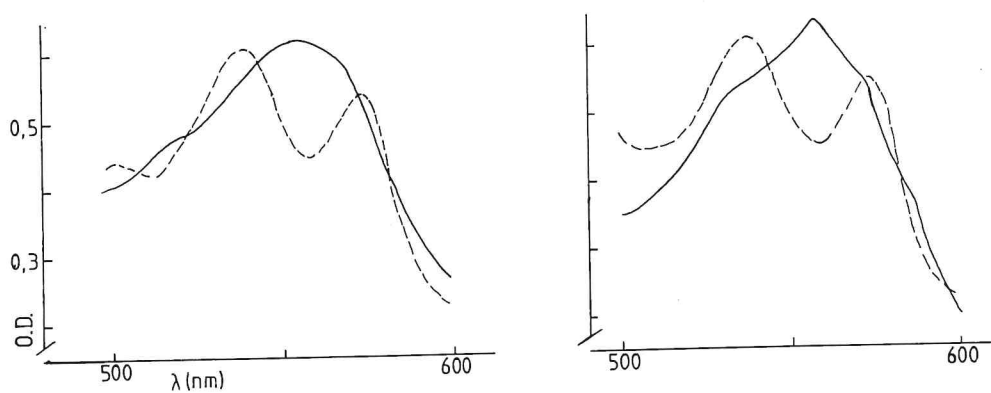


Fig. 15. Absorptiespectrum van *H. filiformis* haemoglobine in geoxygeneerde (stippellijn) en gedeoxygeneerde (getrokken lijn) vorm bij pH 6,21 (links) en pH 8,10 (rechts). α en β pieken bij 540 en 574 nm.

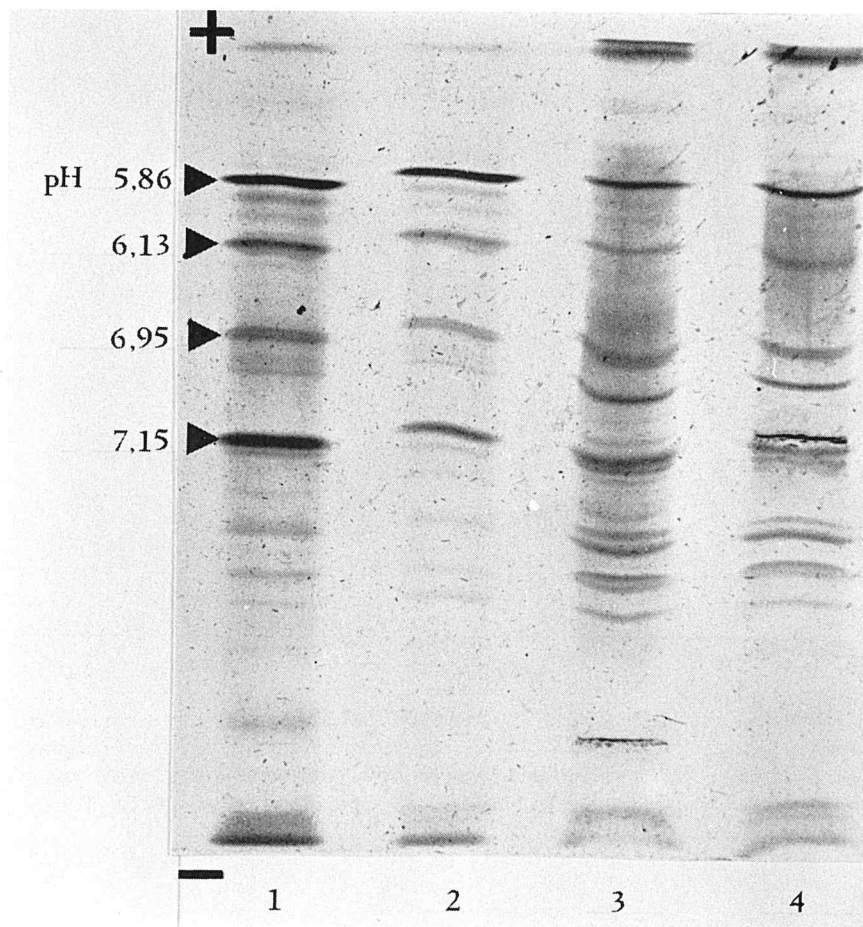


Fig. 16. Iso-elektro-focusing slab-gel. pH 3,5 - 10. 1 en 2: gestrip- te haemoglobine. 3 en 4: homogenisaat van *H. filiformis*. De vier ster- ke banden in 1 en 2 waren zonder kleuring waarneembaar als rode streep- jes.

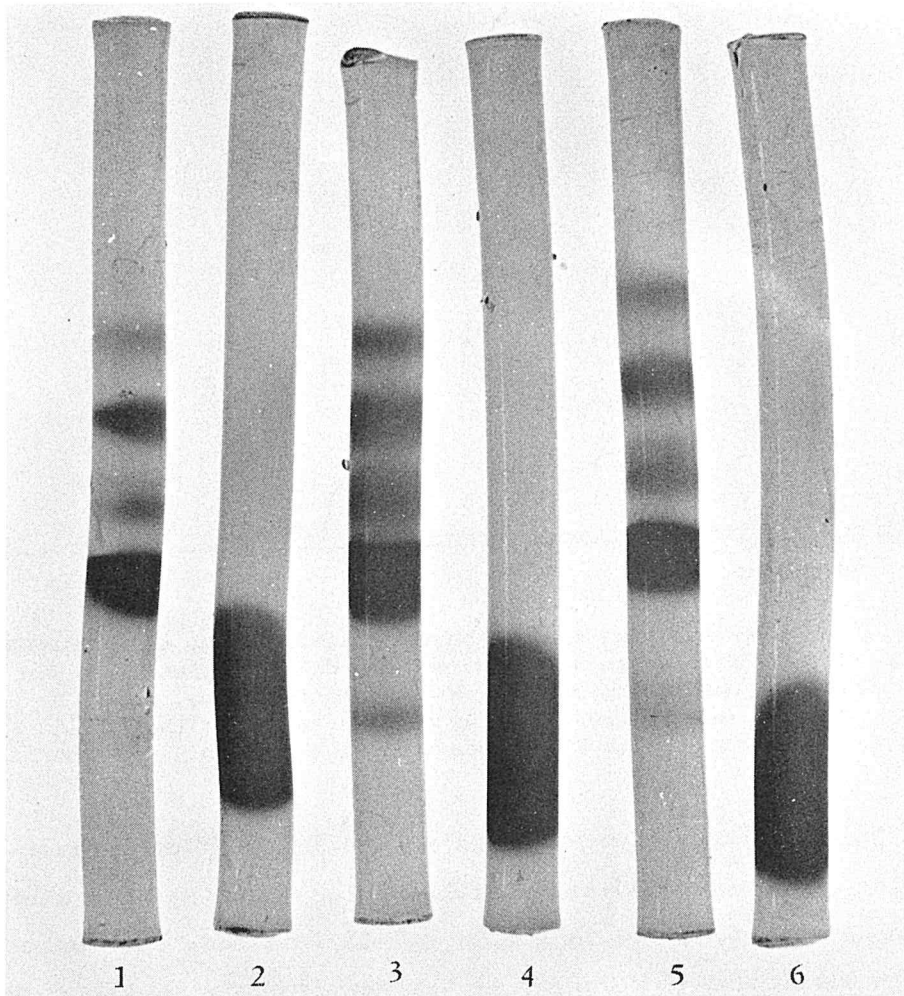


Fig. 17. S.D.S. disc-gel elektroforese van gestripte haemoglobine van *H. filiformis*. 2, 4 en 6: haemoglobine. 1, 3 en 5: ijkmengsel: van boven naar beneden: mens-Hb (m.w. 67.500); runder albumine (m.w. 45.000); ovalbumine (m.w. 25.000); cytochroom C (m.w. 12.000).

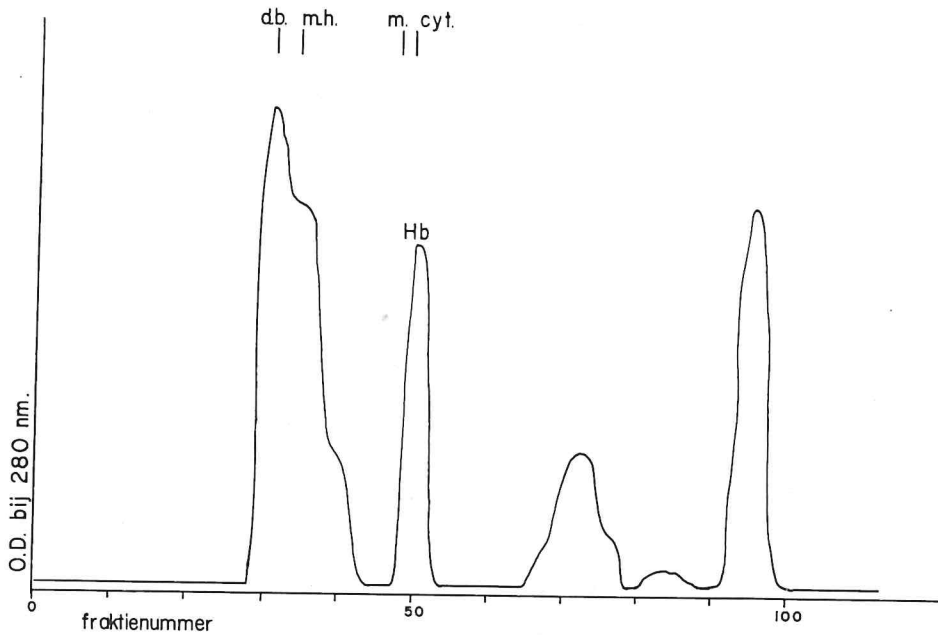


Fig. 18. Elutieschema van *H. filiformis* homogenisaat op een Sephadex-kolom. De streepjes geven de plaats aan van de elutiepieken van een ijkmengsel op dezelfde kolom: d.b. = dextraanblauw (m.w. = $3 \cdot 10^6$); m.h. = mens Hb (m.w. 67.500); m = myoglobine (m.w. = 17.500); cyt. = cytochroom C (m.w. = 12.000). Hb geeft de piek aan van *H. filiformis* - Hb.

Dunnelaag iso-elektro-focusing van *H. filiformis* haemoglobine geeft met Coomassie-brillant-blue kleuring vier sterke banden bij pH 5,86 - 6,13 - 6,95 - 7,15 (zie fig. 16). Deze banden waren zonder kleuring al waarneembaar als zwakke rode banden.

Met behulp van SDS-disc-gel elektroforese (fig. 17) en het elutiepatroon van een sephadex G75 kolom (fig. 18) kan een schatting gemaakt worden van het molekuulgewicht van *H. filiformis* haemoglobine. Dit molekuulgewicht bleek beneden het bereik van de calibratie-eiwitten te liggen (kleinere calibratie-eiwitten waren niet beschikbaar), zodat een redelijk nauwkeurige bepaling niet mogelijk was. Waarschijnlijk ligt het molekuulgewicht tussen 6000 en 10.000 Daltons.

V. DISCUSSIE

Vergelijking van de in IV vermelde resultaten met de eigenschappen van andere intracellulaire coeloom-haemoglobinen bij anneliden (zie Tabel I) leidt tot de conclusie, dat de haemoglobine van *H. filiiformis* uitzonderlijke eigenschappen heeft. De P_{50} , vooral van gestripte haemoglobine, is zeer laag. De Bohr-faktor is hoog. De Hill-plot vertoont een neerwaartse knik, met vooral beneden de 50 % verzadiging, een zeer hoge n . Het molecuulgewicht is extreem laag, zelfs als aangenomen wordt, dat het om een monomeer gaat.

De ΔH -waarden (IV-3-3) zijn echter niet afwijkend van die van andere cellulaire haemoglobinen. Vooral de Hill-plots zijn zeer opvallend. Een neerwaartse knik in de Hill-plot werd tot nu toe nog bij geen enkel ademhalingspigment gevonden. Er werd wel af en toe een opwaartse knik gevonden, o.a. bij de annelide *Amphitrite ornata* (MANGUM et al., 1975) en bij de lamprei, *Entosphenus japonicus* (DOHI et al., 1973). DOHI et al. schrijven deze opwaartse knik toe aan een monomeer-dimeer evenwicht van de haemoglobine, waarbij de geoxygeneerde vorm beter dimeren vormt en dus meer haem-haem-interactie vertoont. Indien we aannemen dat de neerwaartse knik in de Hill-plot van *H. filiiformis* haemoglobine door een monomeer-dimeer evenwicht veroorzaakt wordt, dan zou dit betekenen dat juist de gedeoxygeneerde vorm van de haemoglobine meer als dimeer voorkomt. De hoge waarden (2,0 - 2,2) van n_1 die soms gevonden werden (zie Tabel II t/m VI) zouden er zelfs op kunnen wijzen dat de haemoglobine gedeeltelijk als tetrameer voorkomt. Voor zoogdier haemoglobinen, die geheel als tetrameren voorkomen, worden n -waarden van 2,4-

2,9 gevonden (PROSSER, 1973). Het extreem lage molecuulgewicht (6-10.00) dat werd gevonden sluit een associatie-dissociatie evenwicht niet uit. Het molecuulgewicht werd namelijk bepaald in aanwezigheid van O_2 , zodat de geoxygeneerde vorm, die volgens de theorie als monomeer voorkomt, werd bepaald. Bepaling van de sedimentatie coëfficiënt met en zonder O_2 zou hierover uitsluitsel kunnen geven. Vóór de theorie, dat de knik in de Hill-plot veroorzaakt wordt door een associatie-dissociatie evenwicht van de haemoglobine, kunnen nog enige argumenten aangevoerd worden. De waarden van n nemen toe bij toenemende haemoglobine-concentratie (zie IV. 3.1.), en n_1 neemt af bij toenemende temperatuur (zie IV. 3.3). Dit is in overeenstemming met een evenwicht, waarbij de associatie toeneemt met de concentratie, en afneemt bij toenemende temperatuur. Het sterke Root-effekt bij $pH < 6$ (zie IV. 3.2) wijst op een conformatieverandering van de haemoglobine. Als hierdoor de associatie onmogelijk zou worden, is daarmee het verdwijnen van de knik in de Hill-plot bij $pH 5,86$ verklaard.

Het effect van de knik in de Hill-plot en de hoge waarde van n_1 op het O_2 -transport wordt in fig. 19 duidelijk gemaakt. Volgens de werkelijke O_2 -curve kan 1,6 x zoveel O_2 worden getransporteerd als volgens de theoretische hyperbolische ($n=1$) curve.

Onder gelijke omstandigheden is er bijna geen verschil tussen de P_{50} -waarden van wel en niet gehaemolyseerde gebufferde coeloomvloeistof van *H. filiformis* (zie Tabel III en IV). De hoge waarden die voor niet gebufferde coeloomvloeistof worden gevonden (Tabel I) moeten waarschijnlijk aan lagere pH worden toegeschreven. De extreem lage waarden van de P_{50} van gestripte (= d.m.v. gelchromatografie gezuiverde) haemoglobine (Tabel VI) en de hoge waarden voor haemolysaten van gewassen cellen wijzen er op, dat

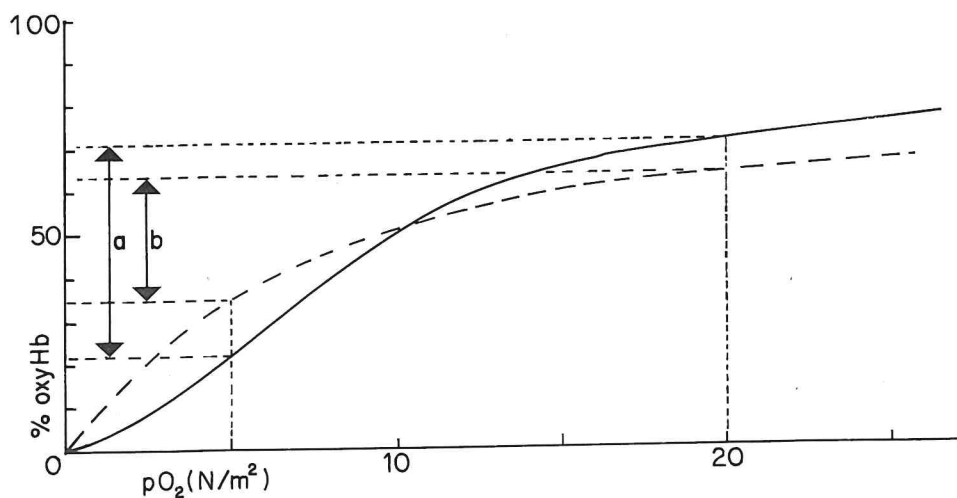


Fig. 19. Vergelijking van een werkelijk geregistreeerde sigmoïdale O₂-curve van *H. filiformis* coeloomvloeistof (getrokken lijn), met een voor dezelfde P₅₀ berekende hyperbolische curve met $n = 1$ (stippellijn). De pijl a geeft aan hoeveel O₂ kan worden afgestaan volgens de werkelijke curve en b volgens de berekende curve, bij verlaging van de pO₂ van 20 naar 5 N/m². De werkelijke curve zou 1,8 x zoveel O₂ transport geven als de berekende.

er in de coelomocyten een factor aanwezig is, die de P₅₀ verhoogt. De coeloomvloeistof werd steeds uit de kop afgetapt, en, zoals reeds in IV. 3.1. werd gezegd, zal een eventuele modificerende factor juist in de kop de hoogste concentratie hebben. Aangezien haemolyse geen invloed heeft op de P₅₀ lijkt het aannemelijk, dat het grote verschil tussen gestripte haemoglobine en coeloomvloeistof uitsluitend wordt veroorzaakt door één of meer modificerende factoren. De aard van deze factoren is nog onbekend. Het organische fosfaat 2-3 DPG heeft bijna geen effect op de zuurstofbinding, terwijl ATP vooral invloed heeft op de totale hoeveelheid O₂ die kan worden gebonden (vergelijkbaar met het Root effect o.i.v. H⁺) en op de n₁ (zie IV. 3.4.). Indien we aannemen, dat de concentratie van de modificerende factoren in de staart van *H. filiformis* zeer laag is, dan geeft

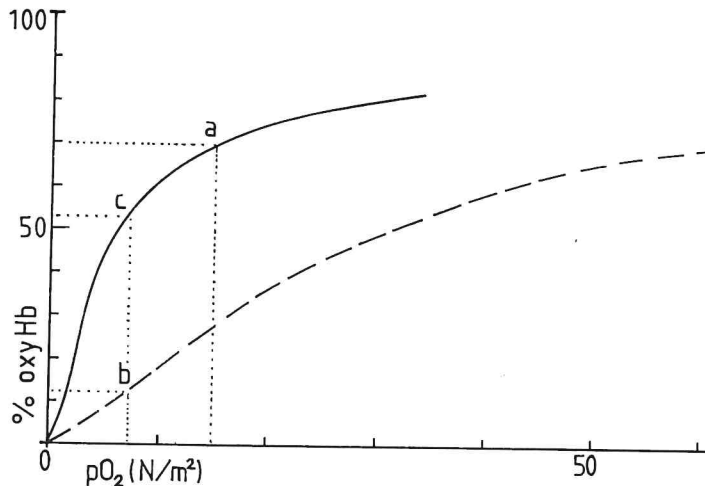


Fig. 20. Zuurstof-opname en -afgifte bij *H. filiformis*. De gestippelde lijn is de O_2 -curve van coeloomvloeistof (uit de kop) bij pH 6,55; de getrokken lijn die van gestripte Hb bij pH 6,94 (komt overeen met de omstandigheden in de staart). Bij de op het wad gemeten pO_2 op 10 cm ($16,3 \text{ N/m}^2$) zou de gestripte Hb voor 70% geoxygeneerd worden (a), en bij halvering van deze pO_2 voor 52% (c). Bij halvering van de pO_2 en overgang naar de omstandigheden in de kop (a naar b), daalt de oxygenatie tot 12%, zodat 83% van de bij a opgenomen O_2 kan worden afgestaan.

de O_2 -curve van gestripte haemoglobine een indruk van het Hb- O_2 -evenwicht in de staart, en dus op de plaats waar de zuurstof opgenomen moet worden. Op grond van deze veronderstelling geeft fig. 20 een indruk van het zuurstoftransport bij *H. filiformis*, rekening houdend met het gemeten pH-verschil tussen kop en staart met de gemeten O_2 -concentraties in het wad.

The leefwijze van *H. filiformis* (fig. 1), de oppervlaktevergroting van de staart, de stroming van de coeloomvloeistof (zie IV. 1.) en de O_2 -concentraties in de wadbodem (zie fig. 6) wijzen er op, dat de zuurstof in de staart wordt opgenomen. Uit fig. 20 blijkt, dat, ook bij de zeer lage zuurstofspanning in het wad ($16,3 \text{ N.m}^{-2}$ op 10 cm diepte), voldoende zuurstof getransporteerd kan worden. Het afstaan van de zuurstof wordt

mogelijk gemaakt door (onbekende) modificerende factoren, een sterk Bohr effect gecombineerd met een pH gradiënt, en een s-vormige O₂-curve, waarvan het sigmoïde karakter bij lage pO₂ versterkt wordt door associatie van de haemoglobine. *H. filiformis* heeft dus onder de door ons gemeten omstandigheden (zie IV. 2.) geen anaërobe stofwisseling nodig. De extreme eigenschappen van de haemoglobine blijken in overeenstemming te zijn met de extreme omstandigheden waaronder de soort leeft.

Door de geringe afmetingen van *H. filiformis* stuitte het onderzoek soms op problemen. Enige zaken die niet konden worden bepaald zijn: haematocritwaarden; concentraties van organische fosfaten in de coeloomvloeistof; concentratie en transport van O₂ ; haemoglobineconcentraties; eigenschappen van de afzonderlijke componenten bij iso-electrofocusing. Door de moeilijkheden bij het bepalen van concentraties zijn er weinig gegevens over de kinetiek van het zuurstof-evenwicht. Voor enkele van bovenstaande problemen zou misschien een oplossing gevonden kunnen worden, terwijl, vooral gezien de uitzonderlijke eigenschappen van de haemoglobine, een onderzoek van de structuur en aminozuursamenstelling zeer interessant lijkt. Tenslotte zou nog kunnen worden onderzocht welke modificerende factoren van de haemoglobine er zijn, en of deze inderdaad in *H. filiformis* voorkomen.

VI. LIJST VAN AFKORTINGEN

ATP	- adenosine trifosfaat
2-3 DPG	- 2-3 difosfoglyceraat
(oxy-) (deoxy-) Hb	- (geoxygeneerde) (gedeoxygeneerde) haemoglobine
IHP	- inositol hexafosfaat

40

O.D.

- optical density

n

- Hill-coëfficiënt ($= \Delta \log \frac{(\text{Hb}-\text{O}_2)}{(\text{Hb})} / \Delta \log p\text{O}_2$)

SDS

- natrium dodecylsulfaat

Φ

- Bohr faktor ($= \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$).

VII REFERENCES

- BENESCH, R. & R.E. BENESCH, 1969. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature*. 221: 618-621.
- BENESCH, R., R.E. BENESCH & R. RENTHAL, 1971. Cofactor binding and oxygen equilibria in haemoglobin. *Nature new Biol.* 234: 174-175.
- DOHI, Y., Y. SUGITA, & Y. YONEYAMA, 1973. The self-association and oxygen equilibrium of hemoglobin from the Lamprey. *Entosphenus Japonicus*. *J. Biol. Chem.* 248: 2354-2363.
- GARLICK, R.L. & R.C. TERWILLIGER, 1974. Coelomic cell haemoglobin of the terebellid polychaete, *Thelepus crispus* Johnson. Structure and oxygen equilibrium. *Comp. Biochem. Phys.* 47B: 543-553.
- HARTMANN-SCHRÖDER, G., 1971. Die Tierwelt Deutschlands, 58. Teil: Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. Fischer Verlag, Jena.
- HILL, A.V., 1910. The possible effects of aggregation of haemoglobin on its dissociation curves. *J. of Physiol.* 40: IV-VII.
- HOFFMAN, R.J. & C.P. MANGUM, 1970. The function of coelomic cell hemoglobin in the polychaete *Glycera dibranchiata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 36: 211-228.
- IMAMURA, R., T.O. BALDWIN & A. RIGGS, 1972. The amino acid sequence of monomeric hemoglobin component from the bloodworm, *Glycera dibranchiata*. *J. Biol. chem.* 247: 2785-2797.
- MANGUM, C.P., 1970. Respiratory mechanisms. Ch. 7. in *Biology of intertidal animals*. ed. Newell, R.C.
- , 1973. Evaluation of the functional properties of invertebrate hemoglobins. *Neth. J. Sea Res.* 7: 303-315.
- MANGUM, C.P. & J.A. CARHART, 1972. Oxygen equilibrium of the coelomic cell hemoglobin from the bloodworm *Glycera dibranchiata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A: 949-958.
- MANGUM, C.P., B.R. WOODIN, C. BONAVENTURA, B. SULLIVAN & J. BONAVENTURA. 1975. The role of coelomic and vascular hemoglobin in the annelid family Terebellidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51A: 281-294.
- MANWELL, C., 1959. Alkaline denaturation and oxygen equilibrium of annelid hemoglobins. *J. of cell and comp. Physiol* 53: 61-74.
- , 1960. Histological specificity of respiratory pigments. I. Comparisons of the coelome and muscle hemoglobins of the polychaete worm *Travisia pupa* and the Echiurid worm *Archynchite pugettensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1: 267-276.
- MIZUKAMI, H. & S.N. VINOGRADOV, 1972. Oxygen dissociation equilibria of *Glycera* hemoglobins. *Bioch. et Biophys. Acta*, 285: 314-319.
- NIESEL, W. & G. THEWS, 1961. Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlösungen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 273: 380-395.
- PROSSER, C.L., 1973. *Comparative animal physiology*. 3rd. ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia; London; Toronto.
- ROOT, R.W. & L. IRVING, 1943. The effect of carbon dioxide and lactic acid on the oxygen combining power of whole and hemolysed blood of the marine fish *Tautoga onitis* (Linn.). *Biol. Bull.* 84: 209-212.
- SEAMONDS, B., R.E. FORSTER & P. GEORGE, 1971. Physicochemical properties of the hemoglobins from the common bloodworm *Glycera dibranchiata*. *J. Biol. Chem.* 246: 5391-5397.

- SICK, H., & K. GERSONDE, 1969. Method for continuous registration of O₂-binding curves of hemoproteins by means of a diffusion chamber. *Anal. Biochem.* 32: 362-376.
- SWANEY, J.B. & I.M. KLOTZ, 1971. Properties of erythrocrucorin from *Cirratiformia grandis*. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 147: 475-486.
- TERWILLIGER, R.C., 1974. Oxygen equilibria of the vascular and coelomic haemoglobins of the terebellid polychaete, *Pista pacifica*. Evidence for an oxygen transfer system. *Comp. Biochem. Physiol.* 48A: 745-755.
- VINOGRADOV, S.N., B.C. HALL & J.M. SHLOM, 1976. Subunit homology in invertebrate hemoglobins. A primitive heme binding chain? *Comp. Biochem. Physiol.* 53B: 89-92.
- WAXMAN, L., 1971. The hemoglobin of *Arenicola cristata*. *J. Biol. Chem.* 246: 7318-7327.
- WEBER, R.E., 1973. Functional and molecular properties of corpuscular haemoglobin from the bloodworm *Glycera gigantea*. *Neth. J. Sea Res.* 7: 316-327.
- WEBER, R.E. & J.F. BOL, 1976. Heterogeneity and oxygen equilibria of haemoglobin from the bloodworm *Glycera gigantea*. *Comp. biochem. Physiol.* 53B: 23-30.
- WEBER, R.E. & W. HEIDEMANN, 1977. The coelomic haemoglobin from the bloodworm *Glycera rouxii*. Molecular and oxygenational properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 57A: 151-155.
- WEBER, R.E., C.P. MANGUM, H. STEINMAN, C. BONAVENTURA, B. SULLIVAN & J. BONAVENTURA, 1977a. Hemoglobins of two terebellid polychaetes. *Enoplobranchus sanguineus* and *Amphitrite ornata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A: 179-187.
- WEBER, R.E., B. SULLIVAN, J. BONAVENTURA & C. BONAVENTURA, 1977b. The haemoglobin systems of the bloodworms *Glycera dibranchiata* and *G. americana*. Oxygen binding properties of haemolysates and component haemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 183-187.
- WEBER, R.E., 1978. Respiratory pigments. In: *Physiology of annelids*. Ed. Mill, P.J. Academic Press, New York (In press).
- WELLS, R.M.G. & L.M. WARREN, 1975. The function of the cellular haemoglobins in *Capitella capitata* (Fabricius) and *Notomastus latericeus* Sars (*Capitellidae: polychaeta*). (1975). *Comp. Biochem. Physiol.* 51A: 737-740.
- WELLS, R.M.G. & R.P. DALZ, 1975. Haemoglobin function in *Terebella lapidaria* L. an intertidal terebellid polychaete. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 55: 211-220.
- WELLS, R.M.G. & R.P. DALZ, 1976. Review: Submit organization in the respiratory proteins of the polychaeta. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A: 387-394.

