

**Ca²⁺, Mg²⁺ und Urat:
Modulatoren des Hämocyanins
der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*)**

**Charakterisierung ihrer Bindung an das Hämocyanin und
ihres Effekts auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Astrid Wänke
aus Wuppertal

Düsseldorf, 2008

Aus dem Institut für Zoophysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. em. Dr. Manfred K. Grieshaber

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Gewinnung von Hämocyanin	11
2.3 Aggregationszustand des Hämocyanins	12
2.4 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	13
2.5 Sauerstoffbindungsstudien	14
2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie	15
2.7 Analyse der Bindungskurven	18
2.7.1 Sauerstoffbindung	18
2.7.2 Kalorimetrische Bindungskurven	23
2.8 Chemikalien	26
2.9 Statistische Auswertung	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Aggregation und elektrophoretische Trennung	27
3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie	30
3.2.1 Bindung von Urat und Koffein unter normoxischen Bedingungen	31
3.2.2 Bindung von Urat und Koffein unter hypoxischen Bedingungen	36

3.2.3	Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen unter normoxischen Bedingungen	38
3.2.4	Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin unter normoxischen Bedingungen	42
3.2.5	Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin unter hypoxischen Bedingungen	45
3.3	Sauerstoffbindungsstudien	47
3.3.1	Urat und Koffein als Liganden	47
3.3.2	Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^{+} -Ionen als Liganden	48
3.3.3	Sauerstoffbindung an monomeres und reaggregiertes Hämocyanin	51
3.3.4	Analyse der Sauerstoffbindungskurven	52
4	Diskussion	65
4.1	Bindung von Urat und Koffein	66
4.2	Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen	69
4.2.1	Hexameres Hämocyanin	70
4.2.2	Monomeres Hämocyanin	74
4.3	Einfluss der Liganden auf die Sauerstoffbindung	76
4.3.1	Affinität und Kooperativität	76
4.3.2	MWC-Modell und Three-State-MWC-Modell	81
4.4	Allosterische Modellvorstellungen	88
4.5	Thermodynamische Analyse der Ligandenbindungen	92
4.6	Physiologische Betrachtungen	95
5	Zusammenfassung	103
	Summary	105
	Literaturverzeichnis	106
A	Anhang	119

Abkürzungsverzeichnis

\AA	Angström
χ^2	Güte der Regression
Ca^{2+}	Calciumionen
Cl^-	Chloridionen
Da	Dalton
ΔG^0	Änderung der freien Enthalpie (freie Bindungsenthalpie)
ΔH^0	Änderung der Enthalpie (Bindungsenthalpie)
ΔS^0	Änderung der Entropie (Bindungsentropie)
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F_{an}	anfängliche Sättigung
F_{fin}	endgültige Sättigung
FG	Freiheitsgrad
$f_{R_{\text{mwc}}}, f_{T_{\text{mwc}}}$	Konformationsverteilungen nach dem MWC-Modell
$f_{R_3}, f_{S_3}, f_{T_3}$	Konformationsverteilungen nach dem Three-State-MWC-Modell
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K	stöchiometrische Bindungskonstante
k	mikroskopische Bindungskonstante
k_{hyp}	mikroskopische Bindungskonstante des jeweiligen Effektors an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
k_n	mikroskopische Bindungskonstante des n -ten Bindungsschrittes
$k_{R_{\text{mwc}}}, k_{T_{\text{mwc}}}$	Sauerstoffbindungskonstanten der unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem MWC-Modell
$k_{R_{\text{mwc}}}^{1-\text{VI}}, k_{T_{\text{mwc}}}^{1-\text{VI}}$	Sauerstoffbindungskonstanten der verschiedenen Analysegruppen I bis VI für die unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem MWC-Modell
$k_{R_3}, k_{S_3}, k_{T_3}$	Sauerstoffbindungskonstanten der unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
$k_{R_3}^{1-\text{VI}}, k_{S_3}^{1-\text{VI}}, k_{T_3}^{1-\text{VI}}$	Sauerstoffbindungskonstanten der verschiedenen Analysegruppen I bis VI für die unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
$k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{eff}}, k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}}$	mikroskopische Bindungskonstanten des jeweiligen Effektors an die unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem MWC-Modell

$k_{R_3}^{\text{eff}}, k_{S_3}^{\text{eff}}, k_{T_3}^{\text{eff}}$	mikroskopische Bindungskonstanten des jeweiligen Effektors an die unterschiedlichen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
k_{trans}	mikroskopische Bindungskonstante des jeweiligen Effektors an die weder unter normoxischen Bedingungen noch unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
$[L_f]$	freie Ligandenkonzentration
$[L_g]$	gebundene Ligandenkonzentration
L_{mwc}^0	Gleichgewichtskonstante für den ungebundenen Zustand nach dem MWC-Modell
$L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$	allosterische Gleichgewichtskonstante nach dem MWC-Modell
$L_{S_3}^0, L_{T_3}^0$	Gleichgewichtskonstanten für den ungebundenen Zustand nach dem Three-State-MWC-Modell
$L_{S_3}^{\text{eff}}, L_{T_3}^{\text{eff}}$	allosterische Gleichgewichtskonstanten nach dem Three-State-MWC-Modell
$[M]$	freie Makromolekülkonzentration
Mg^{2+}	Magnesiumionen
M_r	relatives Molekulargewicht
$[M_t]$	Makromolekülgesamtkonzentration
MWC	<u>M</u> onod <u>W</u> yman <u>C</u> hangeux
n	Anzahl an Bindungsplätzen
Na^+	Natriumionen
$[n_b]$	Konzentration an besetzten Bindungsstellen
$[n_f]$	Konzentration an freien Bindungsstellen
n_H	Hill-Koeffizient
$[n_t]$	Gesamtkonzentration an Bindungsstellen
Θ	Sättigung des Makromoleküls
P	Bindungspolynom
P_{50}	Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Sättigung
Pa_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck nach der Kiemenpassage
P_c	kritischer Sauerstoffpartialdruck
PO_2	Sauerstoffpartialdruck
Pv_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck vor der Kiemenpassage
P_{all}^M	allgemeines Bindungspolynom des MWC-Modells
P_{all}^T	allgemeines Bindungspolynom des Three-State-MWC-Modells
P_{mwc}	vereinfachtes Bindungspolynom des MWC-Modells
P_3	vereinfachtes Bindungspolynom des Three-State-MWC-Modells
q	Wärmefreisetzung im kalorimetrischen Experiment
R	Gaskonstante

$R_{\text{mwc}}, T_{\text{mwc}}$	Bezeichnung der einzelnen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem MWC-Modell
R_3, S_3, T_3	Bezeichnung der einzelnen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem Three-State-MWC-Modell
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
$S_{20, \text{w}}$	Sedimentationskoeffizient bei 20 °C in Wasser, angegeben in Svedberg (S)
T	absolute Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volumen der ITC-Messzelle
v/v	Volumen pro Volumen
$W_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}}$	Einflussfaktor nach dem MWC-Modell
$W_{T_3}^{\text{eff}}, W_{S_3}^{\text{eff}}$	Einflussfaktoren nach dem Three-State-MWC-Modell
w/v	Gewicht pro Volumen
\bar{X}	absolute Sättigung des Makromoleküls
x	Ligandenkonzentration
\bar{X}_{gem}	gemessene Sättigung des Makromoleküls
\bar{X}_r	relative Sättigung des Makromoleküls
\bar{X}_{reg}	Sättigung des Makromoleküls unter Berücksichtigung einer 3%igen Abweichung

1

Einleitung

Vor 3,7 Milliarden Jahren traten erste lokale Sauerstoffquellen an der Sediment/Wasser-Grenze auf. Es waren vermutlich Cyanobakterien, die freien Sauerstoff als Abfallprodukt produzierten (Schopf et al., 1983). Für die meisten Lebewesen jedoch war der über die einsetzende Photosynthese produzierte Sauerstoff toxisch. Um den Sauerstoff und seine reaktiven Derivate, die Superoxidanionen, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale zu neutralisieren, wurden primitive Metall/Protein-Komplexe entwickelt, die in der Lage waren, den Sauerstoff zu binden. Für das aktive Zentrum dieser Enzyme kamen die Metallionen Eisen und Kupfer zum Einsatz. Diverse Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidase entwickelten sich (Decker und Terwilliger, 2000).

Seit 2 Milliarden Jahren ist freier Sauerstoff in der Atmosphäre reichlich vorhanden (Schopf et al., 1983). Für die Ozeane trifft das hingegen nur auf den euphotischen Bereich zu. Parallel zur Sauerstoffanreicherung in der Atmosphäre begann auch die Oxidation von Sulfidvorkommen, die als Sulfate in die Ozeane gelangten, um dort durch sulfatreduzierenden Prokaryoten wieder zu Sulfiden zu werden (Canfield et al., 2000). So herrschten in den tieferen Regionen der Ozeane sulfidische und anaerobe Bedingungen vor (Logan et al., 1995; Hurtgen, 2003; Shen et al., 2003). Der heutige Sauerstoffpartialdruck wurde unterhalb des euphotischen Bereiches erst vor ca. 600 Millionen Jahren erreicht (Dietrich et al., 2006).

In der sauerstoffreichen Atmosphäre konnte sich u.a. der aerobe Stoffwechsel etablieren. Da molekularer Sauerstoff in wässrigen Lösungen sehr langsam diffundiert, der Diffusionskoeffizient beträgt bei 20 °C in destilliertem Wasser lediglich $2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Altmann und Dittmer, 1971), ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung aller Gewebe über Diffusion nur bei Lebewesen mit einer Größe bis zu 1 mm gewährleistet (Krogh, 1941; Mangum, 1985). So entwickelten sich bei der einsetzenden Komplexität der Lebewesen und dem gleichzeitigen Auftreten von undurchlässigen Integumenten u.a. Zirkulationssysteme, die den Sauerstoff mit Hilfe von Transportproteinen von den respiratorischen Epithelien zu den inneren Geweben bringen und im Gegenzug Abfallprodukte entfernen

konnten (van Holde und Miller, 1995). Heute sind mit Hämoglobin, Hämerythrin und Hämocyanin, drei verschiedene Klassen von Sauerstofftransportproteinen bekannt, deren Entwicklung vor 600 - 800 Millionen Jahren unabhängig voneinander begann (van Holde und Miller, 1995).

Das Hämoglobin, ein Eisen-Porphyrin-Protein, kommt in speziellen Transportzellen, den Erythrocyten, bei Vertebraten und in Coelomocyten bei einigen Invertebraten, so den Nemertini und den zum Stamm der Echinodermata gehörenden Cucumaria vor. Bei vielen Invertebraten ist das Hämoglobin auch gelöst in der Transportflüssigkeit zu finden. Als Beispiele hierfür sind die zum Stamm der Annelida gehörenden Lumbricus und Arenicola, Planorbis im Stamm der Mollusca und Daphnia und Chironomus im Stamm der Arthropoda zu nennen. Das Hämoglobin ist oxygeniert hellrot, desoxygeniert scheint es dunkelrot. Als weiteres respiratorisches Eisenprotein tritt das Hämerythrin in den Coelomocyten einiger Brachiopoda, Priapulida, Sipunculida und Annelida auf. Im oxygenierten Zustand ist es violett, desoxygeniert ist es farblos.

Im Stamm der Arthropoda bei Malacostraca und bei einigen Chelicerata (Mangum, 1983) und im Stamm der Mollusca, bei Prosobranchia und Cephalopoda entwickelte sich als Sauerstofftransportprotein ein Typ-3-Kupferprotein, das Hämocyanin. Es kommt gelöst in der Hämolymphe vor (van Holde und Miller, 1995; Decker und Terwilliger, 2000) und bindet den Sauerstoff über zwei Kupferionen reversibel als Peroxid (Magnus et al., 1994; Cuff et al., 1998). Schon 1669 beschrieb der niederländische Naturforscher Swammerdam die blaue Färbung des Schneckenblutes. Der Begriff Hämocyanin und Oxyhämocyanin wurde jedoch erst durch den in Roscoff/Frankreich arbeitenden Fredericq 1878 geprägt. Mollusken- und Arthropodenhämocyanin entwickelte sich aus Enzymen mit Phenoloxidaseaktivität, wobei die Evolution unabhängig voneinander erfolgte. So zeigten Sequenzanalysen, dass das Arthropoden- und das Molluskenhämocyanin signifikant verschieden sind (Burmester, 2001). Der Grad der Identität in der primären Struktur zwischen Arthropodenhämocyanin und Arthropodenphenoloxidase läßt hingegen einen gemeinsamen Vorläufer bestehend aus drei Untereinheiten mit je einer Kupfer/Sauerstoffbindungsstelle vermuten (Terwilliger, 1998).

Phenoloxidasen sind kupferenthaltende Tyrosinasen, die eine Schlüsselrolle in der Sklerotisierung der Arthropodenkutikula, in der Wundheilung und in der humoralen Immunabwehr spielen (Burmester, 2001). Ursprünglich bestand die Aufgabe der Phenoloxidasen darin, ein Sauerstoffatom in ein Phenol zu integrieren und das andere als Wasser zu entlassen. Als die Organismen komplexer wurden, schützten sie sich vor dem sehr reaktiven Sauerstoff und nutzten gleichzeitig dessen Energie, indem er gebunden, an Orte niedriger Sauerstoffkonzentration transportiert wurde (Decker und Terwilliger, 2000). Phenoloxidasen und Hämocyanine sind in der Struktur ihrer aktiven Seite mit zwei Kupferatomen identisch (Solomon et al., 1996). Jedoch transportiert das Hämocyanin den Sauerstoff

ohne ihn zu verändern, die Phenoloxidase hingegen geht, wie zuvor erwähnt, mit dem Sauerstoffmolekül eine chemische Reaktion ein (Decker und Terwilliger, 2000).

Um einen effizienten Sauerstofftransport zu gewährleisten, hätte die Konzentration an Polypeptidketten, die jeweils ein O₂-Molekül binden, so gesteigert werden müssen, dass ein extrem hoher osmotischer Druck die Folge gewesen wäre. Dieses Problem wurde durch die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten zu hexameren Komplexen oder einem Vielfachen davon gemeistert (van Holde et al., 2001). An diese Zusammenschlüsse bindet Sauerstoff, als zusätzlich positiver Effekt, kooperativ. So nimmt bei Erhöhung des Aggregationszustandes auch die Kooperativität zu (van Holde und Miller, 1995). Es entwickelten sich Hämocyaninaggregate, die Hill-Koeffizienten von mehr als 9 aufweisen und als die höchsten in der Natur gefundenen gelten (van Holde et al., 2001). In den rezenten Arthropoden- und Molluskenarten ist Hämocyanin in Konzentrationen von bis zu 100 mg/ml in der Hämolymphe zu finden. Es bildet mit einem Anteil von bis zu 95 % den Hauptbestandteil der Hämolympheproteine (van Holde und Miller, 1995). In geringen Konzentrationen sind noch Gerinnungsfaktoren, Metallothioneine, proteinerge Hormone und antiseptische Proteine vorhanden (Markl et al., 1979; Depledge und Bjerregaard, 1989).

Das Hämocyanin der Mollusken und Arthropoden weist grundlegende Unterschiede in der Struktur auf. Das Molluskenhämocyanin besteht aus großen zylindrischen Molekülen mit 10 bis 20 Untereinheiten und einem apparenten Molekulargewicht von bis zu 9.000 Kilodalton (kDa). Die Zylinder weisen einen Durchmesser von ca. 350 Angström (Å) und eine Länge von 380 Å auf. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheiten liegt zwischen 350 bis 450 kDa (van Holde und Miller, 1995). Das Arthropodenhämocyanin hingegen weist nur ein Molekulargewicht von 500 bis zu 3500 kDa auf. Es setzt sich aus Polypeptidketten mit einem jeweiligen apparenten Molekulargewicht von ca. 75 kDa, die zu Hexameren oder Aggregate von 2 x 6-mere, 4 x 6-mere, 6 x 6-mere und 8 x 6-mere assoziiert sind, zusammen (Mangum, 1983). In der Hämolymphe der Arthropoden findet sich das Hämocyanin hauptsächlich in einem für die jeweilige Art typischen Assoziationszustand. So besteht das Hämocyanin der Palinuridae ausschließlich aus hexameren Aggregaten (Ellerton et al., 1977), als dodekames Protein liegt es bei *Cancer pagurus* aus der Familie der Cancridae vor und als Eikositetramer kann es bei den Araneae und Scorpiones vorkommen. 36-mere konnten nur bei Scutigera, aus der Klasse der Myriapoda (Mangum, 1985), und 48-mere bei Limulus und Tachypleus nachgewiesen werden. Auch existieren Arten, deren Hämocyanin einen Mix aus verschiedenen Assoziationsgraden aufweist, so bei *Homarus americanus*, der Hexamere und Dodekamere besitzt (Morimoto und Kegeles, 1971).

Die Untereinheiten des Decapodenhämocyanins werden gemäß ihrer immunologischen Eigenschaften drei verschiedenen Typen zugerechnet, die sich vor mehr als 200 Millionen

Jahren aus einem gemeinsamen Vorläufer getrennt weiterentwickelten (Burmester, 2002). Sie werden als α -, β - und γ -Typ bezeichnet (Stöcker et al., 1988; Burmester, 2001).

Die erste dreidimensionale Struktur eines Arthropodenhämocyanins wurde von Gaykema et al. (1984, 1986) anhand einer Röntgenstrukturanalyse des Hämocyanins der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus*) bestimmt. Volbeda und Hol (1988) beschrieben hieraus verallgemeinernd die Struktur des Arthropodenhämocyanins. Jede Untereinheit ist in drei Domänen gefaltet, wobei die zweite Domäne das aktive Zentrum beherbergt. Dieses besteht aus zwei Kupferionen, die von jeweils drei Histidinen umlagert werden (Linzen et al., 1985). Das Hexamer kann anschaulich als Trimer von Dimeren beschrieben werden (Volbeda und Hol, 1989). Das Hämocyanin zählt aufgrund seiner Struktur zu den Typ-3-Kupferproteinen. Das Charakteristikum dieser Proteinklasse ist die Existenz von einer oder mehreren Bindungsstellen mit jeweils zwei Kupferionen, die reduziert bzw. oxidiert vorliegen. Der molekulare Sauerstoff wird im oxygenierten Zustand, durch einen Zweielektronentransfer vom Kupfer zum Sauerstoff, zwischen den Kupferionen gebunden. Hierdurch entsteht ein Komplex, der als $\mu : \eta^2\text{-}\eta^2$ Cu(II)-Peroxid-Komplex bezeichnet wird (Kitajima et al., 1992) und dessen spezifische Lichtabsorption für die typische Blaufärbung des Pigments verantwortlich ist. Desoxygeniert ist es farblos.

Das Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*, Fabricius 1787; Synonym *Palinurus vulgaris*, Latreille 1804) liegt als hexamerer Komplex vor, der sich aus vier verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt (Jekel et al., 1996). Entsprechend ihrer immunologischen Eigenschaften gehören sie ausschließlich zum α -Typ (Markl, 1986). Die Sequenz der vier Untereinheiten wurde 2003 von Kusche et al. ermittelt. Es wurden 2275 - 2298 Basenpaare entdeckt, die 656 und 657 Aminosäuren entsprechen. Kusche et al. (2003) nahmen eine konstante Evolutionsrate an und konnten so zurückrechnen, dass die vier Hämocyaninuntereinheiten vor rund 25 Millionen Jahren aus einem Gen entstanden. Ihren weiteren Berechnungen zufolge trennten sich das α -Typ Hämocyanin von *Palinurus elephas* und *Panulirus interruptus* vor ca. 100 Millionen Jahren (Kusche et al., 2003). Dem widersprechen frühere Schätzungen aufgrund fossiler Funde. So nahmen Phillips et al. (1980) eine getrennte Weiterentwicklung der beiden Gattungen vor ca. 20 Millionen Jahren an.

Das Hämocyanin als Sauerstofftransportpigment dient in erster Linie dazu, die ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe zu gewährleisten. Bei erhöhter Stoffwechselaktivität der Gewebe kann der Sauerstoffbedarf kurzfristig gesteigert sein. Biotopbedingte Veränderungen können zudem zu Sauerstoffmangelsituationen führen. Die ausreichende Sauerstoffversorgung kann durch Erhöhung der Hämocyaninkonzentration in der Hämolymphe, durch Auftreten von Iso-Formen mit anderen Sauerstoffbindungseigenschaften und durch Anlagerung allosterischer Effektoren, die die Sauerstoffaffinität beeinflussen, reguliert werden. So erhöhen L-Laktat (Truchot, 1980), Urat (Morris et al., 1985), Mg^{2+} ,-

Ca²⁺- und Cl⁻-Ionen (Bonaventura und Bonaventura, 1980) die Sauerstoffaffinität des Hämocyans, Protonen hingegen verringern sie (Mangum, 1983). Letzteres ist beim Hämoglobin als Bohr-Effekt beschrieben worden (Bohr, 1904a,b). In 1926 wurde erstmals der Einfluss von Ionen auf die Sauerstoffaffinität des Crustaceenhämocyans durch Hogben beobachtet. Er bestätigte den Bohr-Effekt auch für das Crustaceenhämocyanin (Hogben, 1926). Larimer und Riggs (1964) griffen den Ioneneinfluss auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyans wieder auf und zeigten am Flusskreb *Procambarus simulans*, dass die Erhöhung der Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ionenkonzentration die Verminderung des Halbsättigungsdrucks (P₅₀) zur Folge hat. Truchot (1975) untermauerte mit seinen Versuchen dieses Ergebnis. Er zeigte zudem, dass mit Erhöhung der Mg²⁺-Ionenkonzentration gleichzeitig der Bohr-Effekt beim Hämocyanin der Strandkrabbe *Carcinus maenas* erhöht wurde. Der für die Sauerstoffaffinität des Hämocyans positive Ca²⁺-Ioneneffekt wurde in den folgenden Jahren bei diversen Crustaceenarten bestätigt (Brouwer et al., 1978; Bonaventura und Bonaventura, 1980). Beim Dohlenkreb *Austropotamobius pallipes* wurde festgestellt, dass bei Erhöhung der Ca²⁺-Ionenkonzentration die durch Urat induzierte Affinitätserhöhung vermindert wurde (Morris und Bridges, 1986). Gleiches wurde für den Laktateffekt bei *Austropotamobius pallipes* festgestellt (Bridges und Morris, 1986). Dieser Effekt konnte jedoch nicht verallgemeinert werden, so hatte eine Veränderung der Ca²⁺-Ionenkonzentration im Hämocyanin der kleinen Felsengarnele *Palaemon elegans* keine Auswirkungen auf die durch Laktat induzierte Affinitätserhöhung. Kuiper et al. (1979) beobachteten am Hämocyanin der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus*), dass die Ca²⁺-Ionen zwei verschiedene Bindungsplatztypen einnehmen. Dies wurde von Andersson et al. (1982) bestätigt. Zudem folgerten Andersson et al. (1982) aus ihren Versuchen mit dem Hämocyanin von *Panulirus interruptus*, dass die divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ um dieselben Bindungsplätze konkurrieren.

Als ein weiterer affinitätssteigernder Faktor des Hämocyans wurde Urat, das Anion der Harnsäure und Metabolit des Purinstoffwechsels, erstmals von Morris et al. (1985) beim Dohlenkreb *Austropotamobius pallipes* beschrieben. Studien mit dem Hämocyanin weiterer Crustaceenarten verallgemeinerten die Rolle des Urats als Modulator der Sauerstoffaffinität (Morris und Bridges, 1986; Lallier et al., 1987; Bridges, 1990). So wird beim Abbau von Purinbasen im katabolen Stoffwechsel dekapoder Krebse das heterocyclische Ringsystem zunehmend oxidiert. Hierbei entsteht Urat durch Oxidation von Xanthin durch die Xanthinoxidase. Die anschließende Oxidation des Urats durch die Uricase führt zur Öffnung des Purinringes wobei Allantoin entsteht. Die Uricase ist jedoch nur aktiv, wenn ausreichend molekularer Sauerstoff zur Verfügung steht, den sie als Co-Substrat benötigt. In Sauerstoffmangelsituationen kann demgemäß eine Akkumulation von Urat in der Hämolymphe beobachtet werden (Dykens, 1991). Zeis et al. (1992) untersuchten die spezifischen Effekte von L-Laktat und Urat mittels Gleichgewichtsdialyse am Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*). Auch sie beobachteten einen

Anstieg der Sauerstoffaffinität bei Erhöhung der L-Laktat- oder Uratkonzentration, wobei gleichzeitig die Kooperativität der Sauerstoffbindung vermindert wurde. Die spezifischen Bindungsstellen für Urat und für L-Laktat am Hämocyanin von *Homarus vulgaris* wurden von Nies et al. (1992) charakterisiert. Die allosterischen Effektoren nehmen unterschiedliche Bindungsplätze ein und weisen beide eine Stöchiometrie von zwei auf. Anhand von Verdrängungsexperimenten mit Allantoin, Koffein und Hypoxanthin konnte festgestellt werden, dass das Purinringsystem für die Uratbindung an das Hämocyanin essentiell ist. Bindungsstudien, die bei unterschiedlichen Temperaturen mit dem Hämocyanin des Europäischen Hummers durchgeführt wurden, ergaben, dass die Sauerstoffaffinität und der Urateffekt bei erhöhter Temperatur abnehmen (Zeis, 1994). In 2000 wurde die Stöchiometrie der Uratbindung bei *Homarus vulgaris* von Menze et al. (2000) über kalorimetrische Experimente bestätigt. Hierauf basierend wurde 2005 ein erweitertes Bindungsmodell mit zwei unterschiedlichen Bindungsplatztypen für die Bindung des Urats an das Hämocyanin des Europäischen Hummers erarbeitet (Menze et al., 2005). Pott (2006) betrachtete den Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoff- und Effektorbindung an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* und beschrieb die Bindungsstelle des Urats über Sauerstoffbindungs- und thermodynamische Studien anhand von artifiziellen Effektoren. Sie zeigte, dass der Urateffekt nur bei hohen Temperaturen für die Sauerstoffversorgung der Gewebe von Bedeutung ist.

Generell kann zwischen homotroper und heterotroper Interaktion von Liganden unterschieden werden. Beeinflussen sich die gleichen Effektoren in der Besetzung ihrer Bindungsstellen am Makromolekül, wird dies als homotrop bezeichnet. Ein heterotroper Effekt liegt vor, wenn unterschiedliche Liganden bei Besetzung ihrer Bindungsstellen am Makromolekül interagieren. Die Auswirkung, welche die Bindung eines Liganden auf die Bindung eines weiteren Liganden an ein Makromolekül hat, wurde erstmals bei Studien mit Sauerstoff und Hämoglobin beschrieben. Bohr et al. (1904) untersuchten die Sauerstoffbindung am Hundeblood. Sie erhielten eine *S*-förmige Sättigungskurve, die als Hinweis auf eine Bindung mit positiver Kooperativität interpretiert wurde. Adair (1925) beschrieb die Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin über vier sukzessive Reaktionsschritte anhand der "Adair-Gleichung". Die molekulare Grundlage der kooperativen Sauerstoffbindung konnte hierdurch jedoch nicht aufgeklärt werden. In 1948 versuchte Wyman, die von Bohr und seinen Kollegen festgestellte, kooperative Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin dadurch zu erklären, dass er eine ligandeninduzierte Strukturveränderung vorschlug (Wyman, 1948). Der Begriff allosterisch wurde 1961 von Monod und Jacob eingeführt, um den weitreichenden Effekt einer Aktivatorbindung auf die Reaktivität eines an entfernter Stelle befindlichen Enzymsubstratkomplexes im Makromolekül zu beschreiben (Monod und Jacob, 1961). Monod et al. (1963) entwickelten hierauf basierend die Idee, dass die Ligandenbindung eine Konformationsveränderung auslöst und nannten dies eine allosterische Transition. Bei Rückgängigmachung der Bindung würde die ursprüngli-

che Form wieder hergestellt. Eine Vertiefung des allosterischen Konzepts gelang Monod, Wyman und Changeux in 1965.

Zum besseren Verständnis des Zusammenhangs von Struktur und Funktion respiratorischer Proteine entwickelten Monod et al. (1965) ein Modell der allosterischen Interaktionen, das MWC-Modell. Entsprechend dieser Modellvorstellung kann das Makromolekül in zwei Konformationen vorliegen, dem *R*- und dem *T*-Zustand. Die Basis der homotropen und heterotropen Interaktion ist die bevorzugte Bindung des Effektors an eine bestimmte Konformation. Die Sauerstoffbindungskurven, die mit komplexen Makromolekülen wie z.B. dem Hämoglobin oder dem Hämocyanin, aufgenommen wurden, konnten mit dem MWC-Modell jedoch nicht immer befriedigend interpretiert werden. Daher wurden auf der Grundlage des einfachen allosterischen Modells neue Modellvorstellungen entwickelt. So entstand das Three-State-MWC-Modell, erstmals von Minton und Imai (1974) bei der Interpretation der Sauerstoffbindung des Hämoglobins unter Einfluss von 2,3-Diphosphoglycerat, H⁺- und Cl⁻-Ionen angewandt. Dieses Modell geht von drei verschiedenen Konformationszuständen - *R*, *T* und *S* -, in denen das Makromolekül vorliegen kann, aus. In 1985 übertrugen Richey et al. das Three-State-MWC-Modell auf die Beschreibung der Sauerstoff- und Kohlenmonoxidbindung an das Hämocyanin der Mangroven Krabbe (*Scylla serrata*) und des Amerikanischen Hummers (*Homarus americanus*). Eine nochmalige Erweiterung erfuhr das MWC-Modell durch die Arbeit von Robert et al. (1987), die Sauerstoffbindungsstudien mit dem Hämocyanin der Vogelspinne (*Eurypelma californicum*) und dem Amerikanischen Hummer durchführten. Sie entwickelten das Nested-MWC-Modell, in dem das Makromolekül und zusätzlich auch ein Verbund physiologisch aktiver Untereinheiten in jeweils zwei verschiedenen Konformationen vorliegen können.

Zur thermodynamischen Charakterisierung des Zusammenspiels zwischen Makromolekül und Ligand kann die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) eingesetzt werden. In Kombination mit anderen Methoden, so z.B. mit Sauerstoffbindungsstudien, besteht zudem die Möglichkeit, komplexere allosterische Interaktionen zu beschreiben. Mit der ITC kann anhand eines Versuchs die Anzahl der Bindungsplätze *n*, die Bindungskonstante *K* und die Reaktionsenthalpie ΔH^0 bestimmt werden. Hierfür werden die gemessenen Wärmesignale integriert und über eine nichtlineare Regressionsanalyse ausgewertet. Bei Anwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K \quad (1.1)$$

auf die bestimmten Parameter kann zusätzlich die freie Energie ΔG^0 und die Entropie ΔS^0 der Ligandenbindung berechnet werden. *R* bezeichnet die Gaskonstante ($8,314 \cdot 10^{-3}$ kJ mol⁻¹ K⁻¹) und *T* die absolute Temperatur in Kelvin. Die zuverlässige Bestimmung der Parameter aus den integrierten Wärmetönungen ist vom Wiseman-Faktor, auch *c*-Wert

genannt, abhängig (Wiseman et al., 1989). Dieser Wert bestimmt sich bei Anwendung des einfachsten Bindungsmodells (Non-Interacting-Site-Modell, Kapitel 2.7.2) nach folgender Gleichung:

$$c = nk[M_t] \quad (1.2)$$

M_t bezeichnet die Makromolekülkonzentration in der Reaktionskammer, k steht für die mikroskopische Bindungskonstante und n ist die Anzahl der Bindungsplätze. Nach Wiseman et al. (1989) sollte der c -Wert zwischen 1 und 1000 liegen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Turnbull und Daranas (2003) hingegen zeigten, dass bei c -Werten von 0,1 bis 1 durchaus auch präzise Bindungskonstanten berechnet werden, wenn die Anzahl der Bindungsplätze konstant gesetzt wird.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Bindung des Effektors Urat und der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} an das Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*). Bekannt ist, dass die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins beeinflussen. Die Bestimmung ihrer thermodynamischen Bindungsparameter sollte Aufschlüsse über die Art und Anzahl der Bindungsplätze geben. Hierfür wurden isotherme titrationskalorimetrische Untersuchungen mit in seine Untereinheiten zerfallenem monomeren Hämocyanin durchgeführt. Zudem wurden ITC-Versuche mit hexamerem Hämocyanin durchgeführt, was zum einen nur gegen Tris-Puffer und zum anderen gegen mit Kationen angereichertem Tris-Puffer dialysiert wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen sollte Hinweise auf das Zusammenspiel der divalenten Kationen geben. Der Einfluss von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen auf die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurde mit Hilfe allosterischer Modellvorstellungen betrachtet.

Für die Charakterisierung der Uratbindungsstelle am Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurden thermodynamische Untersuchungen mit monomeren und hexamerem Hämocyanin durchgeführt. Als Ligand wurde der natürliche Modulator Urat und sein Strukturanalogon Koffein eingesetzt. Koffein wurde als Modell-Ligand bei Untersuchungen mit dem Hämocyanin von *Homarus vulgaris* schon häufiger verwandt (Menze, 2001; Menze et al., 2005; Pott, 2006), da er eine höhere Bindungskonstante als Urat besitzt und mit Urat um die Bindungsstelle am Hämocyanin konkurriert (Zeis, 1994; Menze, 2001). Die Eignung von Koffein als Modell-Ligand auch für das Hämocyanin der Europäischen Languste wurde überprüft. Anhand allosterischer Modellvorstellungen wurde die Auswirkung der Urat- und Koffeinbindung auf die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* charakterisiert. Da nach Menze et al. (2005) verschiedene Molekülkonformationen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen dominieren, wurden zusätzlich zu den Sauerstoffbindungskurven die thermodynamischen Bindungsparameter unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bestimmt. Abschließend wurden die unterschiedlichen

Ergebnisse für Urat und für die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} unter physiologischen Gesichtspunkten betrachtet.

2

Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Tiere der Art *Palinurus elephas* (Fabricius,1787) wurden bei ortsansässigen Großhändlern in Düsseldorf und Roscoff gekauft (Geb. Nikolaou GmbH, Düsseldorf und Le Viviers, Roscoff, Frankreich). Die Tiere wurden in einem Seewasser-Aquarium bei $15 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer Dichte von $1,026 \text{ g cm}^{-3}$, die mit Meersalz (Wiegandt, Krefeld) eingestellt wurde, gehalten. Der pH-Wert des Seewassers lag bei $7,8 \pm 0,1$. Die Langusten erhielten einmal wöchentlich Tintenfisch und sporadisch Miesmuscheln und Austern. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug $2000 \text{ g} \pm 500 \text{ g}$. Ihr Geschlecht blieb bei der Auswertung unberücksichtigt.

2.2 Gewinnung von Hämocyanin

Das Gelenkhäutchen an der Basis des dritten Peraeopoden wurde zur Entnahme von 20 - 25 ml Hämolymphe mit einer eisgekühlten 10 ml Einmalspritze punktiert. Anschließend konnte die Hämolymphe bei Raumtemperatur gerinnen. Die geronnene Hämolymphe wurde mit Hilfe einer Schere zerkleinert und für 17 min bei 170000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, DuPont, Bad Homburg) um Zelltrümmer, denaturierte Proteine und Gerinnungsfaktoren zu entfernen. Der Überstand wurde über Nacht bei 4°C gegen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 pH 8,0 eingestellt bei 20°C) dialysiert (Dialyseschläuche von Medicell, London). Anschließend wurde für 6 Stunden 30 min bei 170000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, DuPont, Bad Homburg). Hierdurch wurde das aus hexameren Aggregaten mit einem apparenten Molekulargewicht von 450 kDa ($S_{20,w} = 16,4 \text{ S}$) bestehende Hämocyanin sedimentiert (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936). Das Pellet wurde in dem zuvor schon erwähnten Tris-Puffer resuspendiert und gegen den jeweiligen im folgenden Versuch gewünschten

Puffer dialysiert (siehe Kapitel 2.5 und 2.6). Die in den einzelnen Versuchen eingesetzte Gesamtproteinkonzentration in der Hämocyaninlösung wurde photometrisch aus der Extinktion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,42 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$), dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren der Proteine, berechnet. Die Hämocyaninkonzentration bestimmte sich aus der optischen Absorption bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und einem Extinktionskoeffizienten von $0,269 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ für sauerstoffgesättigte Hämocyaninmoleküle (Nickerson und van Holde, 1971). Hierfür wurden die Proben auf eine im linearen Bereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes liegenden Absorption ($E < 1$) mit Probenpuffer (pH 8,0) verdünnt und im Wellenlängenbereich von 245 - 450 nm gegen den Probenpuffer als Referenz gemessen (Uvikon 941, Kontron, München). Das Verhältnis der Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ zur Absorption bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ wurde als Maß für die Reinheit des Hämocyanins herangezogen (Markl et al., 1979). Bei einem Quotienten zwischen 4,5 und 5,0 lag das Hämocyanin zu 100 % als hexameres Aggregat und bei einem Quotienten von 5,8 bis 6,0 lag es zu 95 % als Monomer und zu 5 % als Hexamer vor.

2.3 Aggregationszustand des Hämocyanins

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie wurde die prozentuale Zusammensetzung des Hämocyanins an monomeren Untereinheiten und hexameren Aggregaten bestimmt. Dies erfolgte vor Beginn eines jeden Versuches, um zu gewährleisten, dass die tatsächliche Zusammensetzung der Pigmentlösung auch der gewünschten entsprach. Hierzu wurde eine Superose-6-HR-Säule (GE Healthcare, München) an ein ÄKTA Chromatographiesystem (GE Healthcare, München) angeschlossen. Das Probenvolumen betrug $50 \mu\text{l}$ und die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe lag bei ca. 1 mg. Die Säule wurde mit dem jeweiligen Probenpuffer equilibriert (vgl. Kapitel 2.5 und 2.6) und die Probe mit diesem Puffer bei einer Flussrate von $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ eluiert. Die Absorption der Durchflusslösung wurde bei den Wellenlängen 280 nm und 334 nm aufgezeichnet (siehe Kapitel 2.2). Der prozentuale Anteil an monomerem und hexamerem Hämocyanin in der jeweiligen Probe wurde rechnergestützt über das Computerprogramm Unicorn 3.0 (GE Healthcare, München) aus der Peakfläche integriert. Zur Molekulargewichtskalibrierung dienten die Markerproteine Ovalbumin (M_r 45000), Aldolase (M_r 158000), Katalase (M_r 232000), Ferritin (M_r 440000) und Thyreoglobulin (M_r 669000).

Zur Überprüfung des Aggregationszustandes des nativen Hämocyanins wurde die Hämolymphe nach Entnahme direkt für 15 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 27000 g zentrifugiert (Sorvall RC 28S, DuPont, Bad Homburg), um Coelomocyten und eventuell vorhandene Zelltrümmer zu pelletieren. Die Hämocyaninprobe wurde mit 100 mM Tris/HCL-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 pH 8,0 eingestellt bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$) so verdünnt, dass die

eingesetzte Gesamtproteinkonzentration zwischen 0,5 und 1 mg lag. Der Tris/HCl-Puffer diente als Elutionspuffer.

Der Zerfall der hexameren Komplexe kann über Dialysen der Hämocyaninlösung gegen Puffer ohne Salzionen im alkalischen pH-Bereich bewirkt werden (van Holde und Miller, 1995). Zur Herstellung monomerer Hämocyaninlösungen wurde daher das nach der letzten präparativen Zentrifugation resuspendierte Pellet gegen 20 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) unter Zugabe von 10 mM EDTA dialysiert. Die Beigabe des Chelatbildners sollte sicherstellen, dass auch alle in der Lösung befindlichen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen gebunden wurden (Stöcker et al., 1988). Vor endgültiger Versuchsdurchführung wurde eine weitere Dialyse gegen 20 mM bzw. 100 mM Glycin/NaOH (pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) ohne EDTA durchgeführt, um einen eventuellen Einfluss des Chelatbildners auf das Versuchsergebnis ausschließen zu können. Für die Versuche, in denen hexamere Hämocyaninlösungen eingesetzt wurden, erfolgte eine Dialyse des nach der letzten präparativen Zentrifugation resuspendierten Pellets gegen die in Kapitel 2.5 und 2.6 aufgeführten Tris-Puffer.

2.4 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Anzahl der unterschiedlichen Monomeruntereinheiten und zu deren Größenbestimmung wurde eine SDS-Disk-Elektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Für das Sammel- und das Trenngel wurde das ursprünglich von Davis (1964) und Ornstein (1964) entwickelte alkalische Puffer-Gel-System eingesetzt. Das 4 %ige Sammelgel enthielt $0,125 \text{ mol l}^{-1}$ Tris/HCl (pH 6,8) und 10 % SDS. Für das Trenngel wurde eine 7,5 %ige Vernetzung gewählt, es enthielt $0,375 \text{ mol l}^{-1}$ Tris/HCl (pH 8,8) und 10 % SDS. Sowohl das Sammelgel als auch das Trenngel wiesen eine 3 %ige Quervernetzung auf. Sammel- und Trenngel wurden mit gebrauchsfertigen Acrylamid- und Bisacrylamidlösungen (Roth, Karlsruhe) hergestellt und auf einen Trägerfilm "Gelbond PAG-Film" (GE Healthcare, München) gegossen. Als Elektrodenpuffer diente 50 mM Glycin/NaOH (pH 9,6) mit 1 mM EDTA und 0,1 % SDS. Die Proben wurden über Nacht gegen den Elektrodenpuffer dialysiert. Der Probenpuffer enthielt $0,062 \text{ mol l}^{-1}$ Tris/HCl mit pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % Mercaptoethanol und 2 % SDS. Hiermit wurden die Proben 1:4 verdünnt und für eine Stunde bei 60 °C erhitzt. Jeweils 10 μl Probe wurde auf das Gel aufgetragen. Es wurde das horizontale Elektrophoresesystem Multiphor II (GE Healthcare, München) eingesetzt. Der molekulare Größenmarker der Firma Invitrogen (BenchMark Protein Ladder) wurde auf das Gel mit aufgetragen. Er enthielt künstliche Proteine in den Größen 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 und 220 kDa. Das Gel wurde während der Versuchsdauer mittels eines zur Apparatur gehörenden Kühlaggregates auf 15 °C gekühlt. Bei einer Spannung von 300 V

wurden die Proben für ca. 1 Stunde im Sammelgel konzentriert, um anschließend bei einer Spannung von 600 V im Trenngel für ca. 2 Stunden aufgetrennt zu werden. Die getrennten Proteinbanden wurden durch eine Coomassie Brillant Blue R Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel zuerst in eine 20 %ige TCA-Lösung gelegt, um die Proteine auszufällen, anschließend wurde die TCA-Lösung durch eine ca. 50 °C warme Coomassie-Lösung (0,02 % (w/v) PhastGel Blue R (Coomassie R 350), 10 % (v/v) Essigsäure) für 60 Minuten angefärbt. Die Hintergrundfärbung konnte mit 10 %iger Essigsäure (v/v) entfernt werden.

2.5 Sauerstoffbindungsstudien

Die Sauerstoffbindungsstudien wurden in einer Diffusionskammer nach der Methode von Sick und Gersonde (1969) modifiziert nach Lykkeboe und Johansen (1975), Bridges et al. (1979) und Bridges et al. (1984) durchgeführt. 10 μ l einer 60 - 70 μ molaren Hämocyaninprobe wurden auf einen Objektträger gegeben und in den Strahlengang eines Photometers (Photometer 1101 M, Eppendorf, Köln) geführt. Die Probe wurde anschließend mit einem wasserdampfgesättigten Gasstrom, der aus variablen Anteilen von N₂, O₂ (Messer Griesheim, Frankfurt) und Luft, deren Wasserdampf- und CO₂-Anteil zuvor absorbiert wurde, equilibriert. Über Gasmischpumpen (Wösthoff, Bochum) wurde die Zusammensetzung des Gasstroms variiert. Die Messungen erfolgten bei 20 °C. Die Extinktionsänderung der Lösung, bewirkt durch die Veränderung des Sauerstoffanteils im Gasstrom, wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm gemessen und im Verhältnis zur maximalen Extinktionsänderung der Kalibrierung mit Stickstoff (vollständig desoxygeniertes Hämocyanin) und Sauerstoff (vollständig oxygeniertes Hämocyanin) gesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses von Koffein und Urat auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von *Palinurus elephas* wurde der Hämocyaninlösung nach der letzten präparativen Zentrifugation 2 mM Koffein bzw. 2 mM Urat im Verhältnis 1:1 zugegeben. Als Referenz diente die Hämocyaninlösung nach der letzten präparativen Zentrifugation ohne Zugabe von Koffein oder Urat. Der Einfluss der zweiwertigen Ionen Ca²⁺ und Mg²⁺ sowie des einwertigen Na⁺-Ions auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins wurde mittels Hämocyaninlösungen untersucht, die gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl mit pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) ohne und mit den Ionen in verschiedenen Konzentrationen und Zusammensetzungen dialysiert wurden (siehe Tabelle 2.1). Des Weiteren wurde die Sauerstoffaffinität von Hämocyanin untersucht, dessen hexamere Aggregate über Dialysen gegen Glycin-Puffer (20 mM Glycin/NaOH pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) in seine monomeren Untereinheiten zerfallen war. Und von Hämocyanin dessen monomere Untereinheiten über Dialysen gegen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) und Tris-Puffer mit 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂ wieder zu hexameren Aggregaten zusammengefügt wurden.

Tabelle 2.1: Numerische Auflistung der eingesetzten Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C), gegen die das Hämocyanin von *Palinurus elephas* vor Aufnahme der Sauerstoffbindungskurven zur Untersuchung des Einflusses der zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} und des einwertigen Na^{+} -Ions auf die Sauerstoffaffinität des Pigments, dialysiert wurde.

	Puffer		Puffer		Puffer
1.	Tris/HCl	2.	Tris/HCl + 20 mM CaCl_2	3.	Tris/HCl + 50 mM CaCl_2
4.	Tris/HCl + 20 mM MgCl_2	5.	Tris/HCl + 50 mM MgCl_2	6.	Tris/HCl + 150 mM NaCl
7.	Tris/HCl + 500 mM NaCl	8.	Tris/HCl + 20 mM CaCl_2 + 50 mM MgCl_2	9.	Tris/HCl + 20 mM CaCl_2 + 500 mM NaCl
10.	Tris/HCl + 50 mM MgCl_2 + 500 mM NaCl	11.	Tris/HCl + 20 mM CaCl_2 + 50 mM MgCl_2 + 500 mM NaCl		

2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die kalorimetrischen Experimente wurden mit einem VP-ITC Titrationskalorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA) durchgeführt. In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau der ITC dargestellt. Das Titrationskalorimeter besteht aus zwei identischen Zellen, einer Reaktions- und einer Referenzzelle, die in einem adiabatischen Schirm eingelassen sind. Das jeweilige Zellvolumen beträgt 1,34 ml. Der adiabatische Schirm wird um 1 °C unter die vorgegebene Versuchstemperatur gekühlt. Um die Versuchstemperatur zu erreichen, wird beiden Zellen Wärmeenergie zugeführt. Das System besitzt zwei getrennte Heiz- und Thermoelemente, die zum einen den Temperaturunterschied zwischen den Zellen (ΔT_1) und zum anderen zwischen den Zellen und dem adiabatischen Schirm (ΔT_2) messen und regeln. Die Referenzzelle ist mit hochreinem Wasser (Millipore, Eschborn) gefüllt, in der Reaktionszelle befindet sich die zu untersuchende Makromoleküllösung. In diese wird die Ligandenlösung mittels automatischer Dosiereinrichtung titriert, was zu einer exothermen bzw. endothermen Reaktion führen kann. Um Reaktionszelle und Referenzzelle isotherm zu halten, muss der Reaktionszelle, entsprechend der Wärmebilanz der Reaktion, mehr oder weniger Wärmeenergie zugeführt werden, als der Referenzzelle. Diese Differenz wird vom Gerät als Wärmeenergie pro Zeiteinheit in $\mu\text{cal sec}^{-1}$ gemessen. Da in der Reaktionszelle ein konstanter Druck herrscht, entspricht die Enthalpiebilanz einer Reaktion ihrer Wärmebilanz. Falls die Reaktion in der Reaktionszelle exotherm ist, erhält diese eine geringere Wärmeenergiezugabe als die Referenzzelle. Die ITC zeigt dies als negatives Signal an. Im umgekehrten Fall erhält man ein positives Signal. Die Wärmesignale werden rechnergestützt integriert, wobei auf der Abszissenachse die Konzentration an Ligand, die sich nach der jeweiligen Injektion in der Reaktionszelle befindet, im Ver-

hältnis zur totalen Makromolekülkonzentration aufgetragen wird. Auf der Ordinatenachse werden die in μcal gemessenen Werte auf ein Mol Ligand bezogen und in kJ umgerechnet aufgetragen.

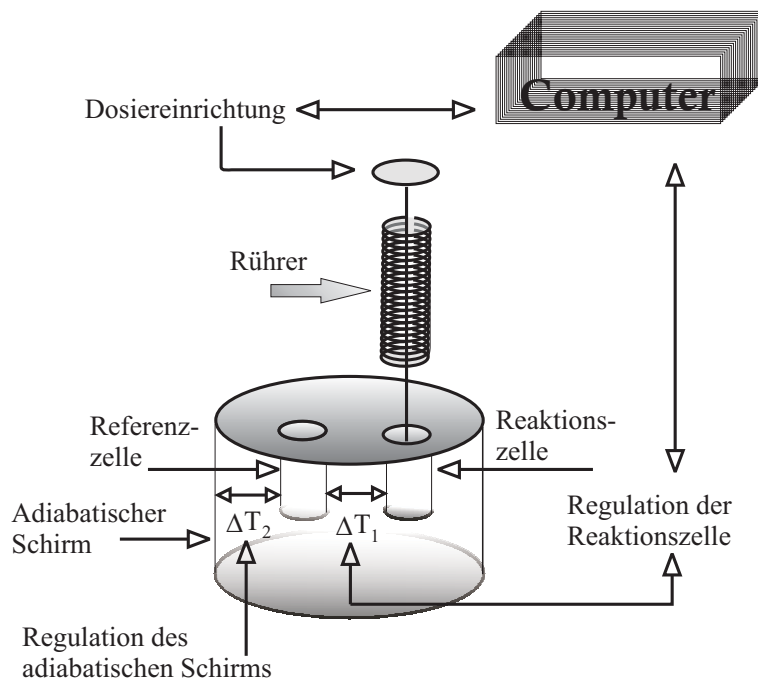


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters. Reaktionszelle und Referenzzelle sind in einem adiabatischen Schirm eingelassen, der um $1\text{ }^\circ\text{C}$ unter die Versuchstemperatur gekühlt wird. Beiden Zellen muss kontinuierlich Wärmeenergie zugeführt werden, um die Versuchstemperatur zu erreichen. Die automatische Injektion von Liganden in die das Makromolekül enthaltene Reaktionszelle führt zu einer Änderung der freien Enthalpie, die durch eine entsprechend höhere oder niedrigere Wärmezufuhr ausgeglichen wird. ΔT_1 = Temperaturunterschied zwischen Reaktionszelle und Referenzzelle. ΔT_2 = Temperaturunterschied zwischen dem adiabatischen Schirm und den eingelassenen Zellen.

Die Reaktionszelle wurde mit aufgereinigtem Hämocyanin in einer für den jeweiligen Versuch optimalen Proteinkonzentration befüllt. Die Hämocyaninlösung wurde zuvor gegen den für den folgenden Versuch gewünschten Puffer dialysiert und, wie auch die Ligandenlösung, in einem temperierten Vakuumtrog (ThermoVac, MicroCal Inc., Northampton, MA) bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ entgast. In Tabelle 2.2 und 2.3 sind die eingesetzten Liganden, die entsprechenden Hämocyaninkonzentrationen, die dazugehörigen Dialysepuffer, die Injektionsanzahl und das Injektionsvolumen der einzelnen Versuche zusammengestellt. Die Versuchstemperatur betrug bei allen Versuchen $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Als Dialysepuffer für die Verdrängungsversuche mit dem Liganden Urat wurde ein 100 mM Tris/HCl-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 pH 8,0 eingestellt bei $20\text{ }^\circ\text{C}$) verwandt. Drei Stunden vor Versuchsbeginn wurde die Hämocyaninlösung mit einer 2 mM Koffeinlösung 1 : 1 verdünnt. Für die Verdrängungsversuche mit dem Liganden Koffein wurde die Pigmentlösung gegen den zuvor erwähnten Tris-Puffer dialysiert und drei Stunden vor Versuchsbeginn mit einer 2 mM Uratlösung 1 : 1 verdünnt.

Tabelle 2.2: Tabellarische Auflistung der in den titrationskalorimetrischen Versuchen eingesetzten Liganden und der jeweils eingesetzten Hämocyaninkonzentration. Die Proteinlösung wurde vor dem Versuch über Nacht gegen den aufgeführten Puffer dialysiert. Zudem ist die Anzahl der Injektionen je Versuch und das dazugehörige Volumen pro Injektion aufgeführt. Der pH-Wert betrug bei allen aufgelisteten Dialysepuffern 8,0, eingestellt bei 20 °C. Zur besseren Übersicht wurden die Liganden in Gruppen zusammengefasst (1. Spalte).

Gruppe	Ligand	Hämocyaninkonz. [μM]	Dialysepuffer	Injektion (Anz.)	Injektionsvolumen [μl]
<i>a</i>	2 mM Koffein	60	100 mM Tris/HCl + 150 mM NaCl + 20 mM MgCl ₂	25	10
	2 mM Urat	60		25	10
<i>b</i>	2 mM Koffein	60	Verdrängungsversuche,	25	10
	2 mM Urat	60	Erläuterung siehe Text	25	10
<i>c</i>	120 mM CaCl ₂	130	100 mM Tris/HCl	50	5
	120 mM MgCl ₂	130		50	5
<i>d</i>	120 mM MgCl ₂	130	100 mM Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ ;	50	5
	120 mM MgCl ₂	130	100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl;	50	5
	120 mM MgCl ₂	130	100 mM Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 500 mM NaCl;	50	5
<i>e</i>	10 mM CaCl ₂	80	100 mM Tris/HCl + 50 mM MgCl ₂ ;	25	10
	10 mM CaCl ₂	80	100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl;	25	10
	10 mM CaCl ₂	80	100 mM Tris/HCl + 50 mM MgCl ₂ + 500 mM NaCl;	25	10

Zusätzlich zu den in den Tabellen aufgeführten ITC-Versuchen wurde eine 680 μM Hämocyaninlösung gegen einen 100 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5, eingestellt bei 20 °C) über Nacht dialysiert. Im Unterschied zu den in den Tabellen aufgezählten Versuchen wurde die Proteinlösung anschließend in den Injektor gefüllt. In die Reaktionszelle wurde ein Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, eingestellt bei 20 °C) gegeben. Die Hämocyaninlösung wurde mit 125 Injektionen zu je 2 μl in den Tris-Puffer titriert.

Die Injektionsdauer betrug bei allen Versuchen 20 s. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Injektionen betrug, abhängig von der Stärke des Wärmesignals, zwischen 250 und 450 Sekunden. Die Injektionspritze rotierte mit 310 Umdrehungen pro Minute, um eine optimale Durchmischung des Reaktionsgemisches zu gewährleisten. Die integrierten Wärmesignale wurden um die Verdünnungswärme, erzeugt durch Titration des jeweiligen Puffers in die Hämocyaninlösung und der Ligandenlösung in den jeweiligen Puffer, abzüg-

Tabelle 2.3: Tabellarische Auflistung der in den titrationskalorimetrischen Versuchen eingesetzten Liganden und der jeweils eingesetzten Hämocyaninkonzentration. Die Proteinlösung wurde vor dem Versuch über Nacht gegen den aufgeführten Puffer dialysiert. Zudem ist die Anzahl der Injektionen je Versuch und das dazugehörige Volumen pro Injektion aufgeführt. Der pH-Wert betrug bei allen aufgelisteten Dialysepuffern 9,5, eingestellt bei 20 °C.

Ligand	Hämocyaninkonz. [μM]	Dialysepuffer	Injektion (Anz.)	Injektionsvolumen [μl]
200 mM MgCl_2	680	100 mM Glycin/NaOH	125	2
200 mM CaCl_2	680		131	0,5-2
2 mM Koffein	400	100 mM Glycin/NaOH	25	10
2 mM Urat	400		25	10

lich der Temperaturunterschiede zwischen Reaktionszelle und Injektionsspritze (Titration von Puffer in Puffer), korrigiert.

Die isothermen titrationskalorimetrischen Versuche wurden auch unter hypoxischen Bedingungen nach Menze (2001) durchgeführt. Zur Messung unter hypoxischen Bedingungen befand sich das VP-ITC Titrationskalorimeter in einem geschlossenen Versuchszelt (Glovebag, Roth, Karlsruhe), dem kontinuierlich Stickstoff zugeführt wurde. Der Sauerstoffgehalt im Zelt wurde mit Hilfe eines Oxymeters (GMH 3691, Greisinger, Regenstauf) bestimmt. Der Stickstoffeinstrom ins Zelt konnte mit einem Nadelventil kontrolliert werden. Bei einem Sauerstoffgehalt von $\text{Po}_2 < 1$ Torr wurden die ITC-Versuche gestartet und durchgeführt. Die Liganden- und Hämocyaninlösungen wurden vor Versuchsbeginn außerhalb des Versuchszeltes für 1,5 Stunden in einem Tonometer bei 17 °C mit Stickstoff begast. Anschließend wurden die Lösungen unter Zuhilfenahme von mit Stickstoff gespülten, gasdichten Spritzen (Hamilton, Reno, NV) in das Versuchszelt überführt. Zu diesem Zeitpunkt lag der Sauerstoffanteil im Zelt unter 0,3 %. Die Liganden- und Hämocyaninlösungen wurden in einem im Zelt befindlichen Vakuumentgaser (ThermoVac, MicroCal Inc., Northampton, MA) für 35 min bei 20 °C entgast, bevor sie in die Reaktionszelle bzw. Injektionsspritze des Titrationskalorimeters überführt wurden. Die Reaktionszelle war zuvor für mindestens 1,5 Stunden mit Stickstoff mittels der geräteeigenen Messzellspülvorrichtung durchspült worden.

2.7 Analyse der Bindungskurven

2.7.1 Sauerstoffbindung

Die Sauerstoffbindungskurven wurden anhand des MWC-Modells und des Three-State-MWC-Modells mit dem Computerprogramm Sigma Plot 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) ausgewertet. Für jedes Modell existiert ein spezifisches Bindungspolynom P durch dessen

logarithmischer Ableitung in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration x die Sauerstoffbindungskurve beschrieben werden kann:

$$\bar{X} = \frac{\partial \ln P}{\partial \ln x} = \frac{x}{P} \frac{\partial P}{\partial x}. \quad (2.1)$$

\bar{X} bezeichnet die absolute Sättigung. Zur Bestimmung der relativen Sättigung \bar{X}_r einer Bindung muss zusätzlich die Anzahl der Bindungsplätze n berücksichtigt werden,

$$\bar{X}_r = \frac{\partial \ln P}{n \partial \ln x}. \quad (2.2)$$

Um experimentelle Unregelmäßigkeiten beim anfänglichen und endgültigen Sättigungsniveau einzubeziehen, wurden die Parameter F_{an} für die anfängliche und F_{fin} für die endgültige Sättigung eingeführt. Im Idealfall wäre $F_{\text{an}} = 0$ und $F_{\text{fin}} = 1$. Bei der Regression der Messdaten \bar{X}_{reg} wurde eine Abweichungen vom Idealwert in Höhe von 3 % zugelassen.

$$\bar{X}_{\text{reg}} = (F_{\text{fin}} - F_{\text{an}}) \bar{X} + F_{\text{an}}. \quad (2.3)$$

Die Analyse der Sauerstoffbindungskurven erfolgte mit der Levenberg-Marquardt-Routine des Computerprogramms Sigma Plot 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Zum Vergleich der beiden Modelle wurde die Güte der jeweiligen Approximation an die Messung mit

$$\chi^2 = \frac{\sum (\bar{X}_{\text{gem}} - \bar{X}_{\text{reg}})^2}{FG} \quad (2.4)$$

bestimmt. \bar{X}_{gem} ist der gemessene Sättigungsgrad, \bar{X}_{reg} der nach dem jeweiligen Modell berechnete Sättigungsgrad und FG bezeichnet den Freiheitsgrad der Regression. Der Freiheitsgrad berechnet sich aus der Differenz der Anzahl der Datenpunkte und der Anzahl der freien Parameter des jeweiligen Modells.

MWC-Modell

Das MWC-Modell nach Monod et al. (1965) ist die einfachste Form eines allosterischen Modells. Es wird davon ausgegangen, dass lediglich zwei allosterische Formen R_{mwc} und T_{mwc} existieren, wobei die R_{mwc} -Form die Referenzform ist. Die Ligandenbindung an beide Formen erfolgt an unabhängigen aber identischen Bindungsplätzen, deren Affinität nur von der jeweils vorliegenden allosterischen Form bestimmt wird. Die Gleichgewichtskonstante L_{mwc}^0 für den ungebundenen Zustand, d.h. für den Zustand in dem weder Sauerstoff noch ein Effektor gebunden ist, lautet

$$L_{\text{mwc}}^0 = \frac{[T_{\text{mwc}}^0]}{[R_{\text{mwc}}^0]}, \quad (2.5)$$

wobei $[T_{\text{mwc}}^0]$ und $[R_{\text{mwc}}^0]$ die Konzentration der jeweiligen ligandenfreien allosterischen Form bezeichnet. Das allgemeine Bindungspolynom für die Bindung von Sauerstoff und der Effektoren wird durch

$$P_{\text{all}}^M = Q_{R_{\text{mwc}}}^m P_{R_{\text{mwc}}}^u + L_{\text{mwc}}^0 Q_{T_{\text{mwc}}}^m P_{T_{\text{mwc}}}^u \quad (2.6)$$

beschrieben. Die Untereinheiten pro Oligomer werden durch u berücksichtigt. Da das Hämocyanin der Europäischen Languste zu 100 % aus hexameren Zusammenschlüssen besteht, wird $u = 6$ gesetzt. Die Anzahl der identischen Bindungsstellen des Effektors pro allosterischer Untereinheit wird mit m bezeichnet. Das Bindungspolynom des Effektors wird durch

$$Q_\beta = 1 + k_\beta^{\text{eff}} y \quad (2.7)$$

und das des Sauerstoffs durch

$$P_\beta = 1 + k_\beta^{O_2} x \quad (2.8)$$

mit $\beta = R_{\text{mwc}}$ und T_{mwc} charakterisiert. Die Bindungskonstanten k_β^{eff} und $k_\beta^{O_2}$ sind die Sauerstoff- und Effektorbindungskonstanten der jeweiligen Konformation. Der Sauerstoffpartialdruck wird über x und die Effetorkonzentration über y berücksichtigt. Unter der Voraussetzung, dass die Effetorkonzentration während der Sauerstoffbindung nicht variiert, ergibt sich ein vereinfachtes Bindungspolynom (Menze et al., 2005)

$$P_{\text{mwc}} = P_{R_{\text{mwc}}}^u + L_{\text{mwc}}^{\text{eff}} P_{T_{\text{mwc}}}^u. \quad (2.9)$$

Die allosterische Gleichgewichtskonstante $L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$ wird durch einen potentiellen Effektor gemäß

$$L_{\text{mwc}}^{\text{eff}} = L_{\text{mwc}}^0 W_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}} \quad (2.10)$$

beeinflusst. Durch den Faktor $W_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}}$ wird der Einfluss des Effektors auf die Sauerstoffbindung berücksichtigt. Wenn davon ausgegangen wird, dass m identische Bindungsplätze pro allosterischer Untereinheit existieren, dann berechnet sich $W_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}}$ aus

$$W_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}} = \frac{(1 + k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{eff}} y)^m}. \quad (2.11)$$

Die jeweilige Konformationsverteilung der allosterischen Untereinheiten kann durch die entsprechende Gleichgewichtskonstante und Formel 2.8 mit

$$f_{R_{\text{mwc}}} = \frac{P_{R_{\text{mwc}}}^u}{P_{\text{mwc}}}, f_{T_{\text{mwc}}} = \frac{L_{\text{mwc}}^{\text{eff}} P_{T_{\text{mwc}}}^u}{P_{\text{mwc}}} \quad (2.12)$$

berechnet werden.

Three-State-MWC-Modell

Das Three-State-MWC-Modell geht im Unterschied zum MWC-Modell davon aus, dass die allosterischen Untereinheiten drei unterschiedliche Konformationen S_3 , T_3 und R_3 annehmen können (Minton und Imai, 1974; Richey et al., 1985). Eine allosterische Untereinheit ist eine Gruppe von n Monomeren eines Oligomers, die immer in dergleichen Konformation unter spezifischen Bedingungen vorliegen (Monod et al., 1965). Die drei Konformationen befinden sich wie die zwei Konformationen des MWC-Modells im Gleichgewicht

zueinander. Die Gleichgewichte werden über die Gleichgewichtskonstanten $L_{S_3}^0$ und $L_{T_3}^0$ beschrieben.

$$L_{S_3}^0 = \frac{[S_3^0]}{[R_3^0]}, L_{T_3}^0 = \frac{[T_3^0]}{[R_3^0]}. \quad (2.13)$$

R_3^0 stellt die Referenzform dar. $[S_3^0]$, $[T_3^0]$ und $[R_3^0]$ bezeichnen die Konzentrationen der einzelnen Konformationen ohne jegliche Ligandenbindung, d.h. ohne Sauerstoff- und Effektorbindung. Das allgemeine Bindungspolynom für die Bindung von Sauerstoff und der Effektoren ergibt sich aus

$$P_{all}^T = Q_{R_3}^m P_{R_3}^u + L_{S_3}^0 Q_{S_3}^m P_{S_3}^u + L_{T_3}^0 Q_{T_3}^m P_{T_3}^u. \quad (2.14)$$

u bezeichnet die Anzahl der Untereinheiten pro Oligomer. Im Falle von *Palinurus elephas* ist $u = 6$, da das Hämocyanin zu 100 % aus hexameren Assoziaten besteht. m ist die Anzahl der identischen Effektorbindungsstellen pro allosterischer Untereinheit. Das Bindungspolynom des Effektors wird durch

$$Q_\alpha = 1 + k_\alpha^{\text{eff}} y \quad (2.15)$$

und das des Sauerstoffs durch

$$P_\alpha = 1 + k_\alpha^{O_2} x \quad (2.16)$$

mit $\alpha = R_3, S_3, T_3$ charakterisiert. Die spezifischen Affinitäten der Sauerstoff- und Effektorbindungen der jeweiligen Konformation werden durch die Bindungskonstanten k_α^{eff} und $k_\alpha^{O_2}$ beschrieben. Über die Variable x wird der Sauerstoffpartialdruck und über y die Effetorkonzentration berücksichtigt. Unter der Voraussetzung, dass der Effektor die Sauerstoffbindung konstant beeinflusst, ergibt sich das vereinfachte Bindungspolynom

$$P_3 = P_{R_3}^u + L_{S_3}^{\text{eff}} P_{S_3}^u + L_{T_3}^{\text{eff}} P_{T_3}^u. \quad (2.17)$$

Die allosterischen Gleichgewichtskonstanten $L_{S_3}^{\text{eff}}$ und $L_{T_3}^{\text{eff}}$ werden durch den Effektor wie folgt beeinflusst:

$$L_{S_3}^{\text{eff}} = L_{S_3}^0 W_{S_3}^{\text{eff}}, \quad (2.18)$$

$$L_{T_3}^{\text{eff}} = L_{T_3}^0 W_{T_3}^{\text{eff}}. \quad (2.19)$$

Der Einfluss des Effektors auf die Sauerstoffbindung wird durch die Faktoren $W_{S_3}^{\text{eff}}$ und $W_{T_3}^{\text{eff}}$ charakterisiert. Dabei wird von dem einfachsten Bindungsmodell ausgegangen, in dem m identische Bindungsplätze pro allosterischer Untereinheit existieren. Die Faktoren $W_{S_3}^{\text{eff}}$ und $W_{T_3}^{\text{eff}}$ berechnen sich aus

$$W_{S_3}^{\text{eff}} = \frac{(1 + k_{S_3}^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_{R_3}^{\text{eff}} y)^m}; \quad (2.20)$$

$$W_{T_3}^{\text{eff}} = \frac{(1 + k_{T_3}^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_{R_3}^{\text{eff}} y)^m}. \quad (2.21)$$

Bei Anwendung der Formel 2.16 und der entsprechenden Gleichgewichtskonstanten kann die Konformationsverteilung der allosterischen Untereinheiten mit

$$f_{R_3} = \frac{P_{R_3}^u}{P_3}, f_{S_3} = \frac{L_{S_3}^{\text{eff}} P_{S_3}^u}{P_3}, f_{T_3} = \frac{L_{T_3}^{\text{eff}} P_{T_3}^u}{P_3} \quad (2.22)$$

bestimmt werden.

In beiden Modellen sind die berechneten Bindungskonstanten unabhängig von der Bindung des Effektors. Wie aus den Gleichungen 2.10, 2.18 und 2.19 ersichtlich, beeinflusst die Effektorbindung lediglich das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen allosterischen Konformationen (Wyman und Gill, 1990).

Anwendung der Regression

Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell erfolgte in Analysegruppen (vgl. Tabelle 2.4). Hierdurch wurden die Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der freien Parameter verringert und die gemessenen Daten konnten mit der bestmöglichen Regression erfasst werden. Da wie zuvor dargelegt, die Bindungskonstanten generell unabhängig von der Bindung eines Effektors sind, wurden die Sauerstoffbindungskurven mit und ohne die Effektoren Urat und Koffein in einer Analysegruppe (VI) zusammengefasst. Die Zusammensetzung der Analysegruppen I - V resultierte aus den Ergebnissen der isothermen titrationskalorimetrischen Versuche. Eine nähere Erläuterung wird daher erst im Ergebnisteil gegeben.

Tabelle 2.4: Einteilung der aufgenommenen Sauerstoffbindungskurven in Analysegruppen. Unter Datengruppe wird die Zusammensetzung der Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) aufgeführt, gegen die das Hämocyanin vor Aufnahme der Bindungskurven dialysiert wurde.

Analyse- gruppe	Datengruppe
I	Tris/HCl
II	Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ Tris/HCl + 50 mM CaCl ₂
III	Tris/HCl + 20 mM MgCl ₂ Tris/HCl + 50 mM MgCl ₂
IV	Tris/HCl + 150 mM NaCl Tris/HCl + 500 mM NaCl
V	Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 50 mM MgCl ₂ Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 500 mM NaCl Tris/HCl + 50 mM MgCl ₂ + 500 mM NaCl
VI	Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 50 mM MgCl ₂ + 500 mM NaCl Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 20 mM MgCl ₂ + 150 mM NaCl ± Urat Tris/HCl + 20 mM CaCl ₂ + 20 mM MgCl ₂ + 150 mM NaCl ± Koffein

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten $L_{T_3}^{\text{eff}}$ und $L_{S_3}^{\text{eff}}$ des Three-State-MWC-Modells und $L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$ des MWC-Modells wurden die aus der Regression erhaltenen Sauerstoffbindungskonstanten der jeweiligen Gruppe festgesetzt und eine erneute Analyse der Bindungskurven durchgeführt.

2.7.2 Kalorimetrische Bindungskurven

Non-Interacting-Site-Modell

Die Bindungsdaten wurden anhand von drei verschiedenen Bindungsmodellen mit dem Computerprogramm Origin 7.0 (MicroCal Inc., Northampton, MA) ausgewertet. Das einfachste Modell, das Non-Interacting-Site-Modell geht davon aus, dass das Makromolekül ein multivalenter Rezeptor mit mehreren identischen aber invarianten Bindungsaffinitäten für den zu betrachtenden Liganden ist. Der Bindungsvorgang wird durch die mikroskopische Bindungskonstante k , die Reaktionsenthalpie ΔH^0 und die Anzahl der Bindungsplätze n beschrieben. Die mikroskopische Bindungskonstante k charakterisiert das Verhältnis der Konzentration an besetzten $[n_b]$ und freien $[n_f]$ Bindungsstellen in Abhängigkeit von der freien Ligandenkonzentration $[L_f]$.

$$k = \frac{[n_b]}{[n_f][L_f]}. \quad (2.23)$$

Die Konzentration an freien und besetzten Bindungsstellen ergibt die Gesamtkonzentration an Bindungsstellen $[n_t]$,

$$[n_t] = [n_b] + [n_f]. \quad (2.24)$$

Das Verhältnis der Konzentration der besetzten Bindungsplätze zur Gesamtzahl der Bindungsplätze beschreibt die Sättigung Θ ,

$$\Theta = \frac{[n_b]}{[n_f] + [n_b]} = \frac{[n_b]}{[n_t]}. \quad (2.25)$$

Wird nun Gleichung 2.23 in Gleichung 2.25 eingesetzt, erhält man

$$\Theta = \frac{k[L_f]}{1 + k[L_f]}. \quad (2.26)$$

Das Non-Interacting-Site-Modell setzt voraus, dass die Bindungsstellen n am Makromolekül identisch sind und gleiche konstante Bindungsaffinitäten besitzen. So dass für $i = 1$ bis n gilt

$$\Theta = \frac{k_i[L_f]}{1 + k_i[L_f]}, \quad (2.27)$$

und da sich die Bindungsstellen identisch verhalten

$$\Theta = n \frac{k[L_f]}{1 + k[L_f]}, \quad (2.28)$$

wobei n die maximale Anzahl an Bindungsstellen ist. Zur Analyse der kalorimetrischen Messdaten wird die allgemeine Sättigungsgleichung 2.28 um die molare Bindungsenthalpie ΔH^0 , die Grundlage des Messsignals q ist, die Makromolekülkonzentration $[M_t]$ und das Volumen der Reaktionszelle V erweitert.

$$q = \frac{n[M_t]V\Delta H^0 k[L_f]}{1 + k[L_f]}. \quad (2.29)$$

Der Bindungsprozess kann somit durch die mikroskopische Bindungskonstante k und die Änderung der freien Enthalpie ΔH^0 charakterisiert werden.

Two-Sets-of-Sites-Modell

Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass das Makromolekül, als multivalenter Rezeptor, zwei Bindungsplatztypen mit unterschiedlichen aber invarianten Bindungsaffinitäten für einen Liganden besitzt. Die mikroskopischen Bindungskonstanten k_1 und k_2 der Bindungsstellen sind

$$k_1 = \frac{[n_{b_1}]}{[n_{f_1}][L_{f_1}]}, \quad (2.30)$$

$$k_2 = \frac{[n_{b_2}]}{[n_{f_2}][L_{f_2}]}. \quad (2.31)$$

$[n_{b_1}]$, $[n_{b_2}]$ bezeichnet die Konzentration an besetzten Bindungsstellen des jeweiligen Bindungsplatztyps, $[n_{f_1}]$, $[n_{f_2}]$ ist die Konzentration an freien Bindungsstellen des jeweiligen Typs und $[L_{f_1}]$, $[L_{f_2}]$ die freie Ligandenkonzentration. Da das Modell von einem Liganden ausgeht, der zwei unterschiedliche Bindungsplatztypen an einem Makromolekül besetzt, kann L_{f_1} und L_{f_2} durch L_f ersetzt werden. Die Sättigung Θ ergibt sich dann aus

$$\Theta = \frac{n_1 k_1 [L_f]}{1 + k_1 [L_f]} + \frac{n_2 k_2 [L_f]}{1 + k_2 [L_f]}. \quad (2.32)$$

Um das Modell auf die gemessene Wärmefreisetzung q im kalorimetrischen Versuch anwenden zu können, muß die Sättigungsgleichung 2.32, wie zuvor schon beim Non-Interacting-Site-Modell, um die Makromolekülkonzentration $[M_t]$, das Volumen der Reaktionszelle V und die Bindungsenthalpie ΔH^0 erweitert werden. Das Messsignal kann somit durch folgende Gleichung beschrieben werden

$$q = [M_t]V \left(\frac{n_1 k_1 [L_f] \Delta H_1^0}{1 + k_1 [L_f]} + \frac{n_2 k_2 [L_f] \Delta H_2^0}{1 + k_2 [L_f]} \right). \quad (2.33)$$

Multisite-Interacting-Modell

Bei der Annahme, das Makromolekül habe als multivalenter Rezeptor eine definierte Anzahl an Bindungsstellen für einen Liganden, die in ihrer Affinität durch die Ligandenbindungen gegenseitig beeinflusst werden, wählt man das Multisite-Interacting-Modell. Dieses

Modell weist jeder Ligandenbindung eine eigene Bindungskonstante zu. Die Anzahl der Bindungsplätze wird in diesem Modell vorgegeben. Bei z.B. zwei Bindungsplätzen existieren zwei stöchiometrische Bindungskonstanten, die nach dem Massenwirkungsgesetz wie folgt definiert sind

$$K_1 = \frac{[ML_1]}{[M][L_f]}, \quad (2.34)$$

$$K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML_1][L_f]}. \quad (2.35)$$

$[M]$ ist die Konzentration an freiem Makromolekül, $[ML_1]$ bzw. $[ML_2]$ bezeichnet die Konzentration an mit einem bzw. zwei Liganden besetztem Makromolekül und $[L_f]$ ist die freie Ligandenkonzentration. Die Sättigung Θ ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentration an gebundenem Ligand $[L_g]$ zur Gesamtkonzentration an Makromolekül $[M_t]$. Für zwei Bindungsplätze berechnet sich die Sättigung durch

$$\Theta = \frac{[L_g]}{[M_t]} = \frac{[ML_1] + 2[ML_2]}{[M] + [ML_1] + [ML_2]}. \quad (2.36)$$

Zur Formulierung der stöchiometrischen Sättigungsfunktion in Abhängigkeit von den stöchiometrischen Bindungskonstanten K_1 und K_2 und der freien Ligandenkonzentration $[L_f]$ werden die Gleichungen 2.34 und 2.35 in Gleichung 2.36 eingesetzt. Hieraus ergibt sich

$$\Theta = \frac{K_1[L_f] + 2K_1K_2[L_f]^2}{1 + K_1[L_f] + K_1K_2[L_f]^2}. \quad (2.37)$$

Die Abhängigkeit der Sättigung von der freien Ligandenkonzentration wird somit eindeutig über die beiden stöchiometrischen Bindungskonstanten K_1 und K_2 definiert. Zur Auswertung der kalorimetrischen Messdaten q mit Hilfe des Multisite-Interacting-Modells muß in die Gleichung 2.37 die freie Enthalpie ΔH^0 , die Makromolekülkonzentration $[M_t]$ in der Reaktionszelle und das Volumen V der Reaktionszelle mit einbezogen werden. Im allgemeinen Fall von j -Bindungsschritten wird q durch folgende Gleichung beschrieben

$$q = [M_t]V \frac{K_1[L_f]\Delta H_1^0 + K_1K_2[L_f]^2(\Delta H_1^0 + \Delta H_2^0)}{1 + K_1[L_f] + K_1K_2[L_f]^2 + \dots + K_1K_2\dots K_j[L_f]^j} + \dots + \frac{K_1K_2\dots K_j[L_f]^j(\Delta H_1^0 + \Delta H_2^0 + \dots + \Delta H_j^0)}{1 + K_1[L_f] + K_1K_2[L_f]^2 + \dots + K_1K_2\dots K_j[L_f]^j}, \quad (2.38)$$

wobei ΔH_j^0 die molare Wärmetönung der Ligandenbindung an die j -te Bindungsstelle und K_j die entsprechende Bindungskonstante bezeichnet.

Durch das Multisite-Interacting-Modell werden die stöchiometrischen Bindungskonstanten der einzelnen Bindungsschritte bestimmt. Im Non-Interacting-Site-Modell und im Two-Sets-of-Sites-Modell hingegen die mikroskopischen Bindungskonstanten. Der Zusammenhang zwischen mikroskopischer und stöchiometrischer Bindungskonstante wird durch

$$K_j = \frac{n - (j - 1)}{j} k \quad (2.39)$$

charakterisiert. K_j ist die korrespondierende, stöchiometrische Bindungskonstante, k die mikroskopische Bindungskonstante, j der entsprechende Bindungsschritt und n die Anzahl der Bindungsplätze am Makromolekül (Klotz, 1997).

2.8 Chemikalien

Von den Firmen Acros (Geel, Belgien), AppliChem (Darmstadt), J.T.Baker (New Jersey, U.S.A.), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim) und VWR (Darmstadt) wurden die Chemikalien mit höchstmöglicher Reinheit bezogen. Die Lösungen wurden mit hochreinem Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt.

2.9 Statistische Auswertung

Unterschiedliche Messergebnisse wurden auf ihre statistische Signifikanz mit Hilfe des t-Tests oder der One-Way-ANOVA (Holm-Sidak-Methode) überprüft. ANOVA on Ranks (Dunn's Methode) wurde zur Signifikanzprüfung angewandt, wenn keine Normalverteilung und/oder Varianzgleichheit vorlag. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($P < 0,05$) wurden die Unterschiede als signifikant angesehen. Die graphische Darstellung und die Berechnung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Sigma Plot 9.0, Sigma Stat 3.1 (SPSS Inc., Chicago, IL) und dem Computerprogramm Origin 7.0 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA). Die FPLC-Läufe wurden mit Hilfe des Computerprogramms Unicorn 3.0 (GE Healthcare, München) integriert.

3

Ergebnisse

3.1 Aggregation und elektrophoretische Trennung

Das Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*) liegt zu mehr als 95 % als hexameres Assoziat in der Hämolymphe vor (Markl et al., 1979). Der Hämocyaninanteil am Gesamtproteingehalt der Hämolymphe beträgt ca. 95 % (van Holde und Miller, 1995). Als Qualitätsindex für die Reinheit des Hämocyanins kann das Verhältnis der Extinktion bei 280 nm und bei 334 nm verwandt werden (Markl et al., 1979). So wies gereinigtes Hämocyanin ein Verhältnis zwischen 4,5 und 4,8 auf. Bei zellfreier Hämolymphe ergab sich ein Verhältnis von ca. 5,6.

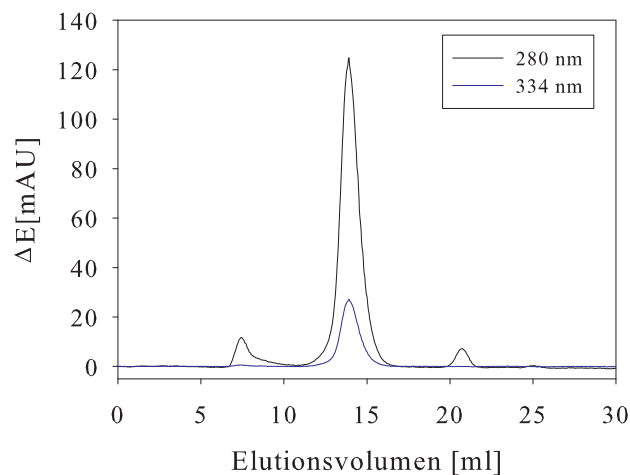


Abbildung 3.1: Elutionsprofil zellfreier Hämolymphe von *Palinurus elephas*. Das Elutionsprofil wurde mittels einer Superose-6-HR-Säule (GE Healthcare, München) aufgenommen. Als Elutionspuffer wurde ein Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ und 20 mM MgCl₂ pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) verwendet. Die Extinktion wurde bei 280 nm (schwarz) und bei 334 nm (blau) aufgezeichnet. Das Elutionsmaximum der hexameren Aggregate lag bei 13,89 ml. Ab 20 ml wurden alle kleineren Proteine mit einem Molekulargewicht unter 5 kDa (Ausschlussvolumen lt. Säulenbeschreibung, GE Healthcare, München) eluiert.

In Abbildung 3.1 ist das Elutionsprofil zellfreier Hämolymphe gezeigt. Hier können drei Fraktionen unterschieden werden, die bei 280 nm (Proteine) zu verschiedenen Zeitpunkten eluieren. Von diesen drei Fraktionen absorbierte eine bei 334 nm (Hämocyanin). Das Absorptionsmaximum lag bei 13,89 ml. Unter den gewählten Bedingungen eluierte hexamerer Hämocyanin entsprechend seinem apparenten Molekulargewicht zwischen 13,01 ml und 15,50 ml. Monomeres Hämocyanin wäre entsprechend seinem apparenten Molekulargewicht zwischen 15,50 ml und 18,50 ml eluiert. In der zellfreien Hämolymphe lag das Hämocyanin somit zu 100 % als hexamerer Komplex vor (siehe auch Tabelle 3.1).

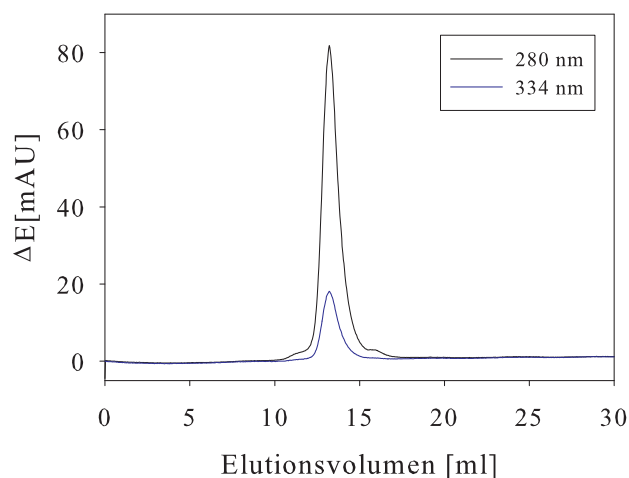


Abbildung 3.2: Elutionsprofil einer Hämocyaninlösung von *Palinurus elephas* die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 bei 20 °C eingestellt) dialysiert wurde. Das Elutionsprofil wurde mittels einer Superose-6-HR-Säule (GE Healthcare, München) aufgenommen. Als Elutionspuffer wurde der Dialysepuffer eingesetzt. Die Extinktion der Durchflusslösung wurde bei 280 nm (schwarz) und bei 334 nm (blau) aufgezeichnet. In der Lösung befanden sich ausschließlich hexamere Aggregate, deren Elutionsmaximum bei 13,21 ml lag.

In Abb. 3.2 ist das Elutionsprofil einer Hämocyaninlösung wiedergegeben, die nach der letzten präparativen Zentrifugation gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert wurde. Das Hämocyanin (blaue Linie) eluierte zwischen 11,86 ml und 15,12 ml mit einem Absorptionsmaximum bei 13,21 ml. Hexamere Assoziate eluieren unter den gewählten Bedingungen zu diesem Zeitpunkt. Die Dialyse der Pigmentlösung gegen einen Tris-Puffer ohne die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} und das monovalente Natriumion führte folglich nicht zum Zerfall der hexameren Aggregate (siehe auch Tabelle 3.1).

Durch Dialyse gegen salzfreie alkalische Puffer kann das Hämocyaninaggregat in seine monomeren Untereinheiten aufgespalten werden (van Holde und Miller, 1995). Abbildung 3.3 zeigt das Elutionsprofil einer Hämocyaninlösung, die gegen einen 20 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) dialysiert wurde. Das Hämocyanin (blaue Linie) eluierte zwischen 15,12 ml und 17,79 ml, das Absorptionsmaximum lag bei 16,10 ml.

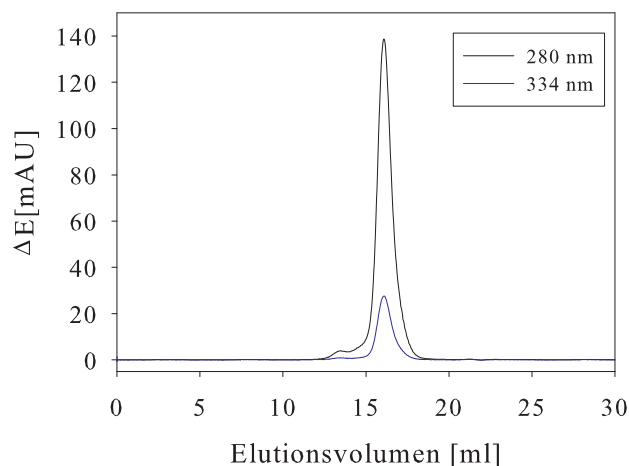


Abbildung 3.3: Elutionsprofil einer Hämocyaninlösung von *Palinurus elephas* die gegen 20 mM Glycin/NaOH (pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) dialysiert wurde. Das Elutionsprofil wurde mittels einer Superose-6-HR-Säule (GE Healthcare, München) aufgenommen. Als Elutionspuffer wurde der Dialysepuffer eingesetzt. Die Extinktion der Durchflusslösung wurde bei 280 nm (schwarz) und bei 334 nm (blau) aufgezeichnet.

Unter den gegebenen Bedingungen eluierten die Monomere zu diesem Zeitpunkt. Das hexamere Aggregat war zu 100 % in seine monomeren Untereinheiten zerfallen (siehe auch Tabelle 3.1).

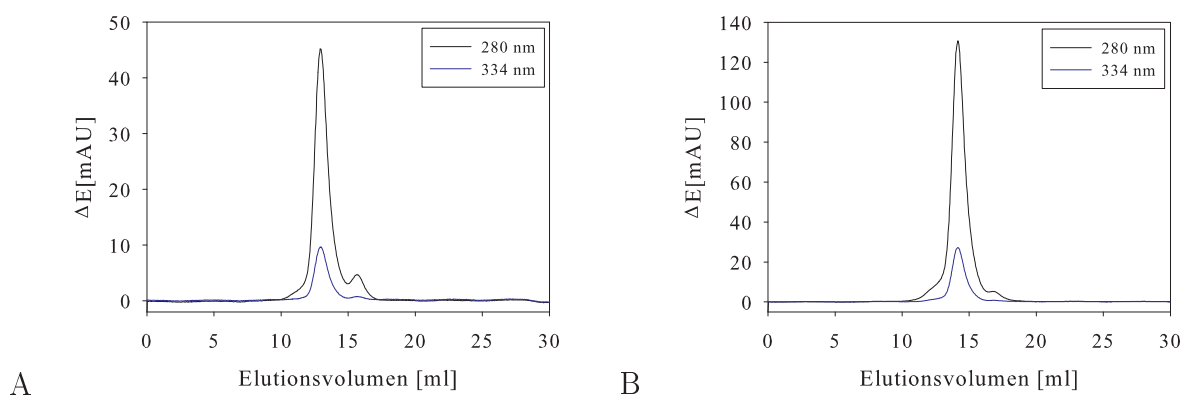


Abbildung 3.4: Elutionsprofil einer monomeren Hämocyaninlösung von *Palinurus elephas* die gegen A: 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) und gegen B: 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) mit 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂ dialysiert wurde. Das Elutionsprofil wurde mittels einer Superose-6-HR-Säule (GE Healthcare, München) aufgenommen. Als Elutionspuffer wurde der Dialysepuffer eingesetzt. Die Extinktion der Durchflusslösung wurde bei 280 nm (schwarz) und bei 334 nm (blau) aufgezeichnet.

Die monomeren Untereinheiten des Hämocyanins von *Palinurus elephas* konnten durch eine Dialyse gegen einen Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) wieder zu hexameren Aggregaten zusammengefügt werden. Abb. 3.4 A zeigt das Elutionsprofil einer monomeren Hämocyaninlösung, die gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde. Das Hämocyanin (334 nm) eluierte zwischen 11,82 ml und 14,92 ml mit einem Maximum bei

Tabelle 3.1: Tabellarische Übersicht der in den Abb. 3.1 bis 3.4 gezeigten Versuchsergebnisse. Aufgeführt sind die Aggregationszustände des Hämocyanins der Europäischen Languste vor (A_v) und nach (A_n) Dialyse gegen verschiedene Puffer. Der pH-Wert des jeweiligen Dialysepuffers wurde bei 20 °C eingestellt.

Abb.	A_v	Dialysepuffer	A_n
3.2	Hexamere	100 mM Tris/HCl pH 8,0	100 % Hexamere
3.3	Hexamere	20 mM Glycin/NaOH pH 9,5	100 % Monomere
3.4 A	Monomere	100 mM Tris/HCl pH 8,0	> 95 % Hexamere
3.4 B	Monomere	100 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM NaCl + 20 mM MgCl ₂ + 20 mM CaCl ₂	> 95 % Hexamere
3.1		zellfreie Hämolymphe	100 % Hexamere

12,97 ml. Unter den gegebenen Bedingungen eluierten zu diesem Zeitpunkt hexamere Aggregate. Das monomere Hämocyanin hatte sich wieder zu mehr als 95 % zu hexameren Zusammenschlüssen vereinigt. In Abb. 3.4 B ist das Elutionsprofil einer monomeren Pigmentlösung wiedergegeben, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer mit 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂ dialysiert wurde. Auch hier konnte die Absorption von mehr als 95 % hexameren Aggregaten aufgezeichnet werden. Das Hämocyanin (blaue Linie) eluierte von 11,54 ml bis 15,50 ml, das Absorptionsmaximum lag bei 14,06 ml (siehe auch Tabelle 3.1).

Zur Größenbestimmung und analytischen Betrachtung der verschiedenen Untereinheiten des Hämocyanins von *Palinurus elephas* wurde die Pigmentlösung nach der letzten präparativen Zentrifugation über eine SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt. Auf dem in Abb. 3.5 gezeigten Gel sind zwei Banden zu erkennen, deren apparentes Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 80 kDa liegt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Neuteboom et al. (1989) überein. Das Gel zeigte zudem, dass nach Reinigung des Hämocyanins keine weiteren Proteine in der Lösung vorhanden waren.

3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Mit der isothermen Titrationskalorimetrie wurde die Bindung des natürlichen Modulators Urat, des artifiziellen Effektors Koffein und der divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ an hexameres und in seine monomeren Untereinheiten zerfallenes Hämocyanin der Europäischen Languste thermodynamisch untersucht. Die isotherme Titrationskalorimetrie besitzt den Vorteil, dass die Stöchiometrie n , die Bindungskonstante k , die Bindungsenthalpie ΔH^0 , die Entropie ΔS^0 und die freie Enthalpie ΔG^0 der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül mit nur einem Versuchsansatz bestimmt werden kann. In einem ITC-Experiment wird, wie in Abbildung 3.6 exemplarisch gezeigt, die durch die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül erzeugte Wärmetönung aufgezeichnet (A). Die Wär-

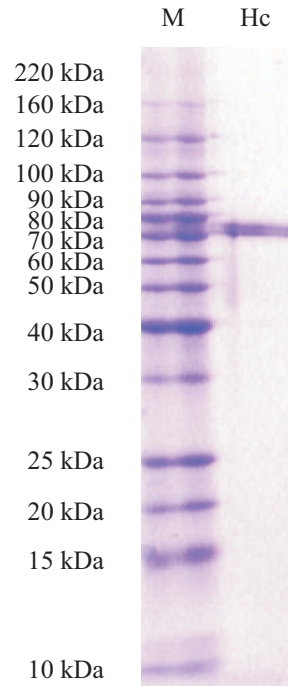


Abbildung 3.5: SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese des Hämocyanins der Europäischen Languste. Das Hämocyanin wurde nach der letzten präparativen Zentrifugation aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue 350 sichtbar gemacht. Als Marker wurde der molekulare Grössenmarker der Firma Invitrogen (BenchMark Protein Lader) verwendet. M = Marker; Hc = Hämocyanin.

mesignale werden für die weitere Auswertung auf die Ligandenkonzentration bezogen, zur Wärmeenergie Δq [kJ mol^{-1}] integriert und gegen das molare Verhältnis der totalen Liganden- und Makromolekülkonzentration aufgetragen (B). Die integrierten Daten können anschließend über die in Kapitel 2.7.2 vorgestellten Modelle ausgewertet werden. Nach Mizoue und Tellinghuisen (2004) ist die gemessene Wärmeenergie des ersten Signals zumeist fehlerbehaftet. Um diese Fehlerquelle bei der weiteren Auswertung der Messdaten auszuschliessen, wurde nach Integration der Wärmesignale das erste Signal verworfen. Die im Versuch eingesetzten Konzentrationen an Ligand und Makromolekül wurden jeweils so gewählt, um ein optimales Ergebnis und einen größtmöglichen c -Wert (Wiseman et al., 1989) zu erzielen. Turnbull und Daranas (2003) zeigten in ihrer Arbeit, dass die Bindungskonstante k und die freie Energie ΔG^0 auch bei niedrigen c -Werten bestimmt werden können. Jedoch wird die Bindungsenthalpie ΔH^0 in diesem Fall von Ungenauigkeiten in der Makromolekülkonzentration stark beeinflusst. Bei bekannter Stöchiometrie und geringem c -Wert wurde daher n konstant gesetzt um ΔH^0 bestimmen zu können.

3.2.1 Bindung von Urat und Koffein unter normoxischen Bedingungen

Zur Überprüfung, ob der natürliche Modulator Urat und der artifizielle Effektor Koffein identische Bindungsplätze am Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus*

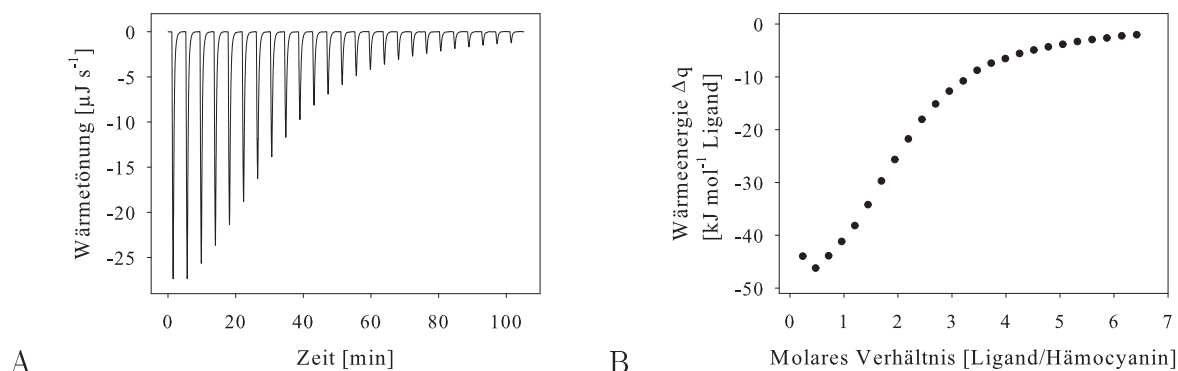


Abbildung 3.6: Wärmefreisetzung während der Titration von Koffein in hexamerem Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Der Versuch wurde in Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 , pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) durchgeführt. Es wurden 25 Injektionen von 2 mM Koffein in 60 μM Hämocyanin bei 20 °C aufgezeichnet. Pro Injektion wurden 10 μl Ligandenlösung titriert. A: zeigt die erhaltenen Wärmesignale [$\mu\text{J s}^{-1}$] und B: die entsprechenden zur Berechnung der Wärmeenergie [kJ mol^{-1}] integrierten Versuchsergebnisse.

elephas) besetzen, wurden Verdrängungsexperimente mit der ITC vorgenommen. Hierzu wurde 120 μM hexamerem Hämocyanin mit einer 2 mM Koffein- bzw. Uratlösung 1:1 verdünnt. In die mit Urat oder Koffein gesättigte Hämocyaninlösung wurde während des ITC-Versuchs der jeweils andere Ligand titriert. Die erhaltenen Bindungsisotherme sind aus Abb. 3.7 ersichtlich. Zum Vergleich wurde in die Abbildung die Bindungskurve gelegt, die bei der Titration des Liganden in eine hexamere, nicht mit dem anderen Effektor verdünnte, Hämocyaninlösung erhalten wurde. Die Zugabe von Urat in mit Koffein gesättigter Hämocyaninlösung führte zu keiner Wärmefreisetzung (A). Die Bindungsplätze für Urat waren mit Koffein schon besetzt. Im umgekehrten Fall (B) konnte ebenfalls keine Wärmetönung aufgezeichnet werden. Hier besetzte das Urat seine Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Das in die mit Urat gesättigte Pigmentlösung titrierte Koffein band nicht. Ähnliches beobachteten Nies et al. (1992) und Zeis et al. (1992) beim Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*). Auch hier war Koffein in der Lage, die Bindung von Urat an das Pigment komplett zu unterbinden. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass Urat und Koffein identische Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas* einnehmen.

Hexameres Hämocyanin

Die Bindungsisotherme für die Bindung von Urat und Koffein wurden an hexamerem und monomerem Hämocyanin von *Palinurus elephas* aufgenommen. In Abbildung 3.8 sind die Bindungsisotherme für die Bindung des Liganden Koffein und des natürlichen Modulators Urat an hexamerem Hämocyanin der Europäischen Languste wiedergegeben. Die Bindungskurve für die Koffeinbindung wies einen annähernd sigmoiden Verlauf auf.

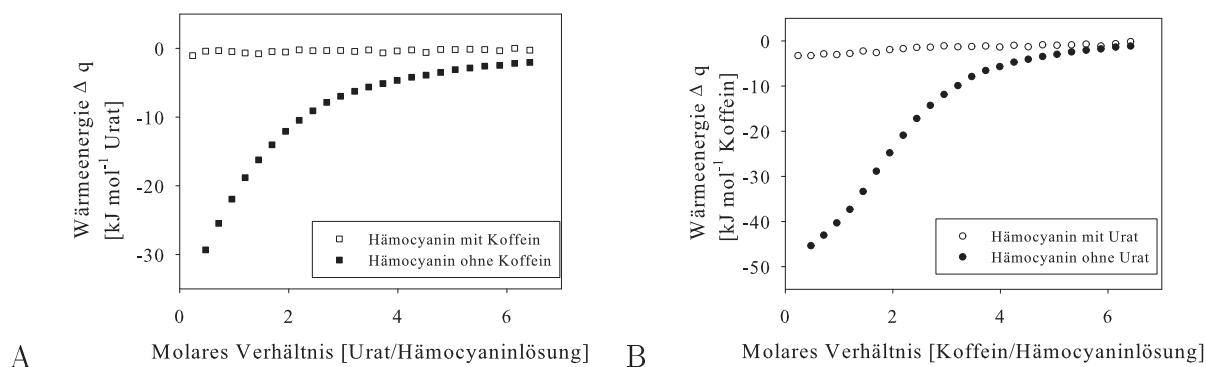


Abbildung 3.7: A: Bindung von Urat an hexamerer (■) und hexamerer mit Koffein gesättigtes (□) Hämocyanin von *Palinurus elephas*. B: Bindung von Koffein an hexamerer (●) und hexamerer mit Urat gesättigtes (○) Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Bindungsisotherme wurden durch 25 Injektionen einer 2 mM Ligandenlösung in eine 60 μ M Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂ pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Zur Sättigung des Hämocyanins mit Koffein (A) und Urat (B) wurde die Hämocyaninlösung mit einer 2 mM Ligandenlösung 1:1 verdünnt.

Die Uratbindungsisotherme zeigte eine hyperbole Form, was auf eine im Vergleich zum Koffein geringere Affinität des Hämocyanins für Urat zurückgeführt werden kann.

Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Koffeinbindung mit dem Non-Interacting-Site-Modell, in dem das Makromolekül als multivalenter Rezeptor mit mehreren identischen aber invarianten Bindungsaffinitäten für den jeweiligen Liganden gesehen wird (vgl. Kapitel 2.7.2), ergab eine Stöchiometrie von $1,90 \pm 0,15$. Die Bindungskonstante k_{Koffein} lag bei $53,04 \pm 3,87 \text{ mM}^{-1}$ und die Bindungsenthalpie $\Delta H_{\text{Koffein}}^0$ bei $-57,07 \pm 2,42 \text{ kJ mol}^{-1}$. Für die freie Energie der Bindung $\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ wurde ein Wert von $-26,63 \pm 0,18 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet, die Entropie $T\Delta S_{\text{Koffein}}^0$ lag bei $-30,44 \pm 2,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ (siehe Tabelle 3.2).

Die Auswertung der Bindungsdaten für Urat mit dem Non-Interacting-Site-Modell erwies sich als schwieriger, da die Parameter aufgrund der geringen Affinität des Urats zum Hämocyanin untereinander korrelierten. Um die thermodynamischen Parameter, insbesondere ΔH_{Urat}^0 , dennoch bestimmen zu können, wurde die Anzahl der Bindungsplätze, in Anlehnung an die Stöchiometrie für Koffein, mit $n_{\text{Urat}} = 2$ konstant gesetzt. Für die Bindungskonstante k_{Urat} ergab sich ein Wert von $27,37 \pm 4,18 \text{ mM}^{-1}$, die Bindungsenthalpie ΔH_{Urat}^0 lag bei $-36,01 \pm 1,98 \text{ kJ mol}^{-1}$, die Entropie der Bindung $T\Delta S_{\text{Urat}}^0$ berechnete sich mit $-11,09 \pm 2,36 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die freie Energie ΔG_{Urat}^0 betrug $-24,92 \pm 0,39 \text{ kJ mol}^{-1}$ (vgl. Tabelle 3.2). Der c-Wert der Messungen lag bei 6,36 für Koffein und bei 3,28 für Urat.

Eine weitere Charakterisierung der Ligandenbindung erfolgte über die Auswertung der Bindungsisotherme mit dem Multisite-Interacting-Modell. Dieses Modell bezieht homotrope Allosterie in die Auswertung mit ein. Das Makromolekül wird als multivalenter

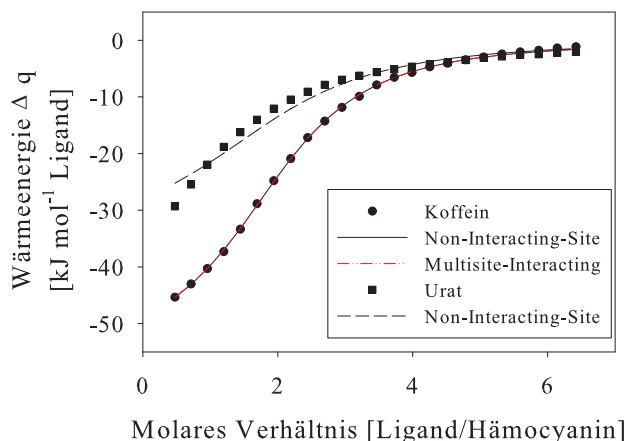


Abbildung 3.8: Bindung von Koffein (●) und Urat (■) an das Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Bindungsisotherme wurden durch 25 Injektionen einer 2 mM Ligandenlösung in eine 60 μM Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Die Regressionskurve des Non-Interacting-Site-Modells ist für Urat und Koffein eingezeichnet. Die Regressionskurve des Multisite-Interacting-Modells ist für Koffein eingezeichnet.

Tabelle 3.2: Thermodynamische Parameter der Bindung von Koffein und Urat an hexameres Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Werte wurden als Mittelwerte von 3 - 5 Versuchswiederholungen mit dem Non-Interacting-Site-Modell ermittelt. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$).

Ligand	n	Non-Interacting-Site-Modell			
		k [mM^{-1}]	ΔH^0 [kJ mol^{-1}]	$T\Delta S^0$ [kJ mol^{-1}]	ΔG^0 [kJ mol^{-1}]
Koffein	$1,90 \pm 0,15$	$53,04 \pm 3,87$	$-57,07 \pm 2,42$	$-30,42 \pm 2,53$	$-26,63 \pm 0,18$
Urat	2	$27,37 \pm 4,18$	$-36,01 \pm 1,98$	$-11,09 \pm 2,36$	$-24,92 \pm 0,39$

Rezeptor mit mehreren Bindungsstellen definiert. Die Affinität der jeweiligen Bindungsstelle wird von der Bindung der Liganden an die anderen Bindungsstellen beeinflusst. Das Modell beschreibt die Ligandenbindung über eine erhöhte Anzahl an thermodynamischen Parametern. Bei geringer Wärmefreisetzung führt dies jedoch dazu, dass die Parameter miteinander korrelieren. So konnte das Multisite-Interacting-Modell nur für die Koffeinbindungsisotherme angewandt werden, da die Bindungsstärke der Uratbindung an das Hämocyanin zu gering war und die Parameter untereinander stark korrelierten. In Tabelle 3.3 sind die berechneten Versuchsergebnisse aufgeführt. Die mikroskopischen Bindungskonstanten $k_{1\text{Koffein}}$ und $k_{2\text{Koffein}}$ der beiden Bindungsplätze waren mit $49,66 \pm 3,10 \text{ mM}^{-1}$ für $k_{1\text{Koffein}}$ und $53,52 \pm 5,01 \text{ mM}^{-1}$ für $k_{2\text{Koffein}}$ nicht signifikant unterschiedlich. Eine kooperative Bindung kann daher verneint werden. Die Bindungsenthalpie der beiden Bindungsplätze wich mit $-58,42 \pm 2,90 \text{ kJ mol}^{-1}$ für $\Delta H_{1\text{Koffein}}^0$ und $-49,12 \pm 8,64 \text{ kJ mol}^{-1}$ für $\Delta H_{2\text{Koffein}}^0$ nicht signifikant voneinander ab. Gleiches galt für die Entropie $T\Delta S_{\text{Koffein}}^0$, die für den ersten Bindungsplatz mit $-30,27 \pm 2,98 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für den zweiten Bindungsplatz mit $-24,18 \pm 8,60 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt wurde. Die freie Energie $\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ betrug

für den ersten Bindungsschritt $-28,16 \pm 0,12 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für den zweiten $-24,94 \pm 0,16 \text{ kJ mol}^{-1}$. Diese Werte zeigten einen signifikanten Unterschied.

Tabelle 3.3: Thermodynamische Parameter der Bindung von Koffein an das Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Werte wurden als Mittelwerte von 5 Versuchswiederholungen mit dem Multisite-Interacting-Modell ermittelt. Der jeweils angegebene Fehler ist die berechnete Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

Multisite-Interacting-Modell				
$k_{1\text{Koffein}} [\text{mM}^{-1}]$	$\Delta H_{1\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	$T\Delta S_{1\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	$\Delta G_{1\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	
$49,66 \pm 3,10$	$-58,42 \pm 2,90$	$-30,27 \pm 2,98$	$-28,16 \pm 0,12$	
$k_{2\text{Koffein}} [\text{mM}^{-1}]$	$\Delta H_{2\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	$T\Delta S_{2\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	$\Delta G_{2\text{Koffein}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	
$53,52 \pm 5,01$	$-49,12 \pm 8,64$	$-24,18 \pm 8,60$	$-24,94 \pm 0,16$	

Die in einem ITC-Versuch aufgenommenen und integrierten Bindungsdaten können zur weiteren Charakterisierung der Ligandenbindungen mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell ausgewertet werden, falls die Voraussetzung erfüllt wird, dass zwei unterschiedliche Bindungsplatztypen vorhanden sind (vgl. Kapitel 2.7.2). Bei diesem Modell werden die Bindungsparameter unter der Annahme berechnet, dass das Makromolekül ein multivalenter Rezeptor ist, dessen Bindungsstellen unterschiedliche aber invariante Bindungsaffinitäten für den Liganden aufweisen. Die Bindungsisotherme für Urat und Koffein konnten mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell nicht ausgewertet werden. Es lag somit nur ein Bindungsplatztyp für die Bindung dieser Liganden an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* vor.

Monomeres Hämocyanin

Das Hämocyanin von *Palinurus elephas* liegt unter natürlichen Bedingungen zu mehr als 95 % als hexamerer Aggregat vor. In Puffern ohne Salzionen und mit alkalischen pH-Werten zerfällt das Aggregat in seine monomeren Untereinheiten (vgl. Tabelle 3.1 u. Abb. 3.3). Das thermodynamische Bindungsverhalten des natürlichen Effektors Urat und des artifiziellen Liganden Koffein an die monomeren Untereinheiten wurde zur weiteren Charakterisierung der Bindungsstelle betrachtet. In eine $400 \mu\text{M}$ Hämocyaninlösung, in der das Pigment zu weniger als 5 % als hexamerer Aggregat vorlag, wurde eine 2 mM Koffein- bzw. Uratlösung titriert. Die erhaltenen Bindungsisotherme sind in Abb. 3.9 A für den Liganden Koffein und in Abb. 3.9 B für Urat gezeigt. Es konnte weder für Urat noch für Koffein eine Bindung an monomeres Hämocyanin nachgewiesen werden. Zum direkten Vergleich sind die integrierten Wärmetönungen der Titration des jeweiligen Liganden in hexamerem Hämocyanin in der Abbildung dargestellt.

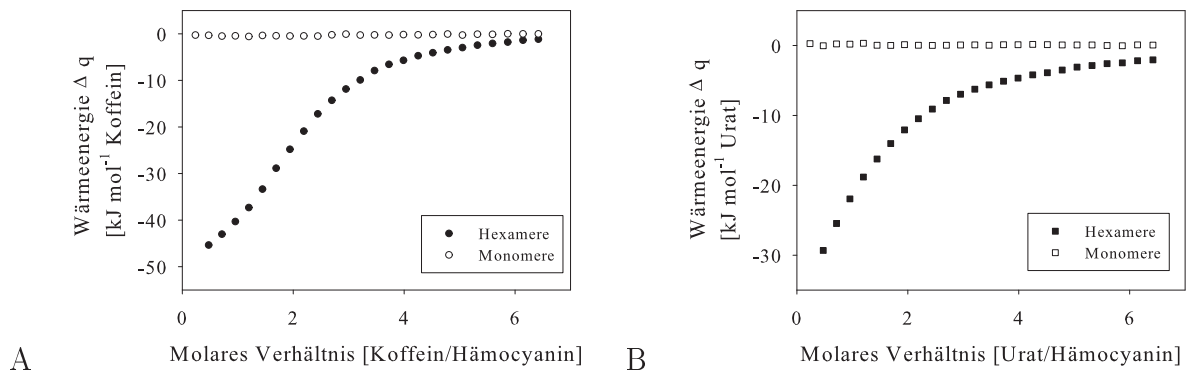


Abbildung 3.9: A: Bindung von Koffein an hexameres (●) und monomeres (○) Hämocyanin von *Palinurus elephas*. B: Bindung von Urat an hexameres (■) und monomeres (□) Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Es wurden 25 Injektionen von je $10 \mu\text{l}$ einer 2 mM Koffein- bzw. Uratlösung in eine $60 \mu\text{M}$ (Hexamere) und eine $400 \mu\text{M}$ (Monomere) Hämocyaninlösung bei 20°C durchgeführt. Um hexamere Aggregate zu erhalten, wurde das Hämocyanin zuvor gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 pH 8,0 eingestellt bei 20°C) dialysiert. Der Zerfall des Hämocyanins in monomere Untereinheiten wurde durch Dialyse gegen einen Glycin-Puffer (20 mM Glycin/NaOH pH 9,5 bei 20°C eingestellt) bewirkt.

3.2.2 Bindung von Urat und Koffein unter hypoxischen Bedingungen

Urat als natürlicher Modulator des Hämocyanins reichert sich unter hypoxischen Bedingungen in Crustaceen an (Lallier et al., 1987; Lallier und Truchot, 1989a) und erhöht, wie auch der artifizielle Effektor Koffein, die Sauerstoffaffinität des Pigments (vgl. Kapitel 3.3.1). Eine Untersuchung der Bindungsisotherme unter Sauerstoffausschluss ermöglicht den Einfluss des Sauerstoffs auf die Urat- und Koffeinbindung zu charakterisieren. Abbildung 3.10 zeigt einen Vergleich der Bindungsisotherme des Koffeins unter Sauerstoffausschluss ($P_{\text{O}_2} < 1$ Torr) und unter normoxischen Bedingungen. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die Bindungskurve eine hyperbole Form an und die freiwerdende Wärmeenergie verringerte sich. Die Affinität des Liganden Koffein zum Hämocyanin hatte unter Sauerstoffausschluss abgenommen. Dieser Affinitätsverlust wurde auch in der Auswertung der Bindungsdaten mit dem Non-Interacting-Site-Modell sichtbar. Zur Bestimmung der thermodynamischen Bindungsparameter wurde davon ausgegangen, dass die Anzahl der Bindungsplätze unter Hypoxie und Normoxie identisch ist und $n_{\text{hypKoffein}} = 2$ konstant gesetzt. Die Bindungskonstante $k_{\text{hypKoffein}}$ konnte mit $40,57 \pm 2,83 \text{ mM}^{-1}$ bestimmt werden. Die Bindungsenthalpie lag bei $-27,89 \pm 1,04 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Werte lagen alle signifikant unter den in sauerstoffgesättigter Atmosphäre erhaltenen (vgl. Tabelle 3.2). Die unter Hypoxie ermittelte Bindungsentropie war mit $-1,91 \pm 1,04 \text{ kJ mol}^{-1}$ zum normoxischen Wert signifikant erhöht. Lediglich die freie Energie wich mit $-25,98 \pm 0,17 \text{ kJ mol}^{-1}$ nicht signifikant von der unter normoxischen Bedingungen berechneten ab. Die unter hypoxischen Bedingungen ermittelten Werte sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

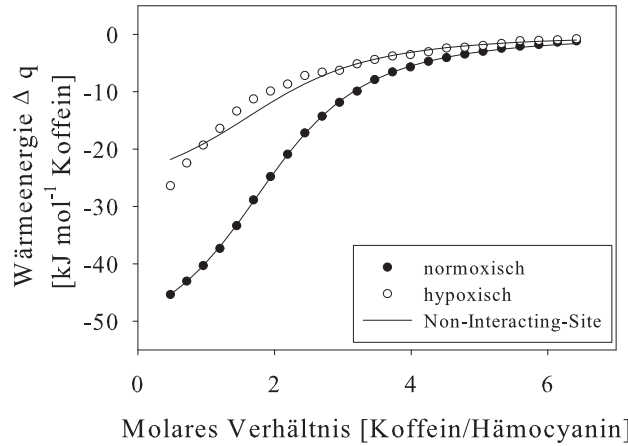


Abbildung 3.10: Bindung von Koffein an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter normoxischen (●) und hypoxischen (○) Bedingungen. Die Bindungsisotherme wurden durch jeweils 25 Injektionen einer 2 mM Koffeinpflösung in eine 60 μM Hämocyaninpflösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Die Regressionskurve für das Non-Interacting-Site-Modell ist eingezeichnet.

Tabelle 3.4: Thermodynamische Parameter der Bindung von Koffein und Urat unter hypoxischen Bedingungen an hexameres Hämocyanin der Europäischen Languste. Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte von 3 Versuchswiederholungen und wurden mit dem Non-Interacting-Site-Modell ermittelt. Der angegebene Fehler ist die berechnete Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$).

Non-Interacting-Site-Modell bei Hypoxie				
Ligand	k_{hyp} [mM^{-1}]	ΔH_{hyp}^0 [kJ mol^{-1}]	$T\Delta S_{\text{hyp}}^0$ [kJ mol^{-1}]	ΔG_{hyp}^0 [kJ mol^{-1}]
Koffein	$40,57 \pm 2,83$	$-27,89 \pm 1,04$	$-1,91 \pm 1,04$	$-25,98 \pm 0,17$
Urat	$16,13 \pm 2,90$	$-13,20 \pm 0,21$	$10,45 \pm 0,59$	$-23,65 \pm 0,46$

In Abbildung 3.11 sind die erhaltenen Bindungsisotherme für die Uratbindung an das Hämocyanin unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen wiedergegeben. Der natürliche Modulator Urat wies unter Sauerstoffausschluss eine geringere Affinität zum Hämocyanin im Vergleich zu normoxischen Bedingungen auf. Auch hier wurde davon ausgegangen, dass die Anzahl der Bindungsplätze unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen identisch ist. Zur Auswertung mit dem Non-Interacting-Site-Modell wurde daher die Anzahl der Bindungsplätze mit $n_{\text{hypUrat}} = 2$ konstant gesetzt. In Tabelle 3.4 sind die berechneten Werte dokumentiert. Die Bindungskonstante für den Liganden Urat verminderte sich signifikant im Vergleich zu den unter Normoxie berechneten Werten. Sie betrug $16,13 \pm 2,90 \text{ mM}^{-1}$. $\Delta H_{\text{hypUrat}}^0$ lag mit $-13,20 \pm 0,21 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant unter dem unter normoxischen Bedingungen erhaltenen Wert. Die Bindungsentropie $T\Delta S_{\text{hypUrat}}^0$ wurde mit $10,45 \pm 0,59 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant erhöht. Lediglich die freie Energie unterschied sich nicht signifikant vom normoxischen Wert ($\Delta G_{\text{hypUrat}}^0 = -23,65 \pm 0,46 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die c-Werte der Messungen lagen für Koffein bei 4,87 und für Urat bei 1,94.

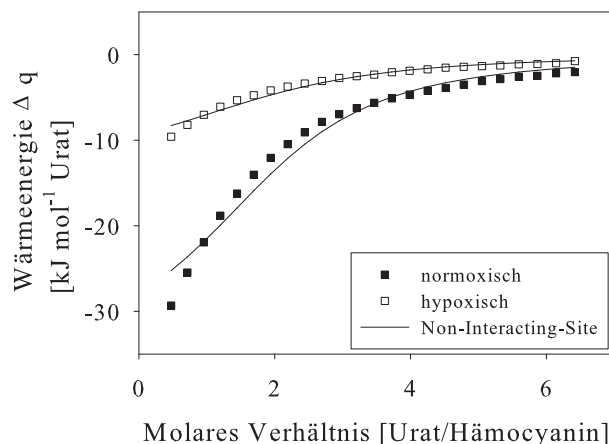


Abbildung 3.11: Bindung von Urat an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter normoxischen (■) und hypoxischen (□) Bedingungen. Die Bindungsisotherme wurden durch jeweils 25 Injektionen einer 2 mM Uratlösung in eine 60 μ M Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂ pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Die Regressionskurve für das Non-Interacting-Site-Modell ist eingezeichnet.

Die unter hypoxischen Bedingungen aufgenommenen und integrierten Bindungsdaten konnten nicht mit dem Multisite-Interacting-Modell und dem Two-Sets-of-Sites-Modell ausgewertet werden, da die freigewordene Wärmeenergie zu gering war und die im Vergleich zum Non-Interacting-Site-Modell vermehrten Bindungsparameter untereinander zu stark korrelierten.

3.2.3 Bindung von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen unter normoxischen Bedingungen

Zur Charakterisierung der thermodynamischen Bindungseigenschaften der divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ an das Hämocyanin der Europäischen Languste wurden die Wärmetönungen bei Injektion der Ionen in hexamere und monomere Pigmentlösungen aufgenommen. Die Bindungsisotherme der Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen an monomeres Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurde unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen betrachtet, um den Einfluss von Sauerstoff auf die Bindungseigenschaften einschätzen zu können. Isotherme titrationskalorimetrische Versuche mit hexamerem Hämocyanin, welches gegen Tris-Puffer mit unterschiedlicher Kationenzusammensetzung dialysiert wurde, sollten Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionenbindung durch andere Kationen zulassen. Die eingesetzten Dialysepuffer sind in Tabelle 2.2 unter Punkt *d* und *e* aufgeführt. Die Kationen wurden als Chloridsalze dem jeweiligen Dialysepuffer zugegeben. So stellten Kuiper et al. (1979) am Hämocyanin der Kalifornischen Languste fest, dass der Einfluss der Chloridionen auf die Bindungseigenschaften des Sauerstofftransportpigments von untergeordneter Bedeutung ist.

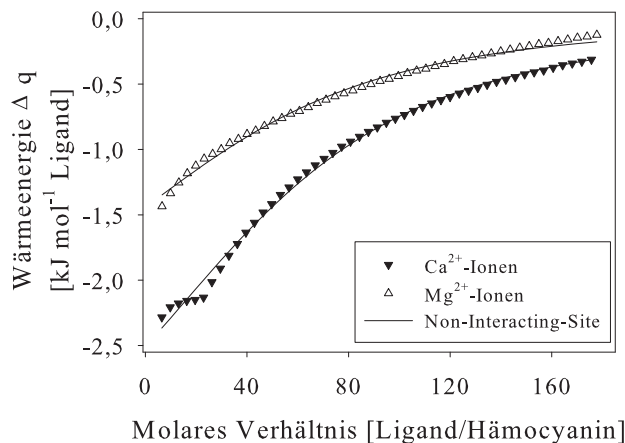
Bindung an hexameres, Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreies Hämocyanin

Abbildung 3.12: Bindung von Ca^{2+} - (\blacktriangledown) und Mg^{2+} - (\triangle) Ionen an hexameres Hämocyanin der Europäischen Languste. Die Bindungsisotherme wurden durch 50 Injektionen einer 120 mM Ligandenlösung in eine 130 μM Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Die Regressionskurve des Non-Interacting-Site-Modells ist eingezeichnet.

Die Bindungsisotherme der Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an zuvor gegen 100 mM Tris/HCl-Puffer (vgl. Tabelle 2.2 c) dialysiertes hexameres Hämocyanin sind in Abb.3.12 dargestellt. Die Bindungskurven konnten nur mit dem Non-Interacting-Site-Modell ausgewertet werden. Für die Bindung der Ca^{2+} -Ionen wurden $n_{\text{Ca}^{2+}} = 61 \pm 2,8$ Bindungsplätze bestimmt. Die Bindungskonstante ($k_{\text{Ca}^{2+}}$) betrug $0,16 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$ und die Bindungsenthalpie berechnete sich mit $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^0 = -4,39 \pm 0,27 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Entropie ($T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^0$) lag bei $7,94 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die freie Enthalpie ($\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^0$) bei $-12,33 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Bindung der Mg^{2+} -Ionen an das Pigment erzeugte eine geringere Wärmetönung. Die Stöchiometrie wurde mit $49,8 \pm 3,0$ bestimmt. Die Bindungskonstante wich mit $k_{\text{Mg}^{2+}} = 0,15 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$ nicht signifikant von der der Ca^{2+} -Bindung ab. Desgleichen die freie Enthalpie $\Delta G_{\text{Mg}^{2+}}^0$, die bei $-12,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ lag. Einen signifikanten Unterschied zur Ca^{2+} -Ionenbindung wiesen $\Delta H_{\text{Mg}^{2+}}^0$ mit $-2,93 \pm 0,23 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S_{\text{Mg}^{2+}}^0$ mit $9,35 \text{ kJ mol}^{-1}$ auf. Die ermittelten Bindungsparameter sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Eine Auswertung mit dem Multisite-Interacting-Modell war bei beiden Liganden nicht möglich. Aufgrund der ermittelten Stöchiometrie war die Anzahl der Parameter zu hoch, um mit diesem Modell verwertbare Ergebnisse erzielen zu können. Die Auswertung der integrierten Wärmetönungen mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell war in beiden Fällen ebenfalls nicht möglich, was ein Hinweis darauf ist, dass die untersuchten divalenten Kationen an hexamerem ionenfreiem Hämocyanin nur an einem Bindungsplatztyp binden. Die c-Werte der Messungen lagen für die Bindung von Ca^{2+} bei 1,24 und für die Mg^{2+} -Bindung bei 1.

Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter der Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an hexameres Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Pigmentlösung wurde gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert. Die Werte wurden als Mittelwerte von 4 Versuchswiederholungen mit dem Non-Interacting-Site-Modell ermittelt. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$).

Non-Interacting-Site-Modell					
Ligand	n	k [mM ⁻¹]	ΔH^0 [kJ mol ⁻¹]	$T\Delta S^0$ [kJ mol ⁻¹]	ΔG^0 [kJ mol ⁻¹]
Ca^{2+}	$61,0 \pm 2,8$	$0,16 \pm 0,01$	$-4,39 \pm 0,27$	7,94	-12,33
Mg^{2+}	$49,8 \pm 3,0$	$0,15 \pm 0,01$	$-2,93 \pm 0,23$	9,35	-12,28

Bindung an hexameres, Ca^{2+} -, Mg^{2+} - oder Na^+ -ionenhaltiges Hämocyanin

In Abb. 3.13 sind die Bindungsisotherme dargestellt, die bei der Injektion von Mg^{2+} -Ionen in hexameres Hämocyanin erhalten wurden. Die Pigmentlösungen wurden zuvor gegen verschiedene Tris-Puffer dialysiert (vgl. Tabelle 2.2 d). Bei Zugabe von Mg^{2+} zu hexamerem Hämocyanin, welches zuvor gegen 100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl oder gegen 100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl + 20 mM CaCl_2 dialysiert wurde, konnte keine Wärmetönung gemessen werden. Lediglich bei Injektion der Mg^{2+} -Ionen in hexameres Hämocyanin, was gegen einen Tris-Puffer mit 20 mM CaCl_2 dialysiert wurde, konnte eine geringe Wärmetönung aufgezeichnet werden. Die gemessenen Signale waren jedoch zu gering, um sie, nach Integration, mit einem der in Kapitel 2.7.2 vorgestellten Modelle auswerten zu können. Zum Vergleich wurde in Abb. 3.13 die Bindungsisotherme dargestellt, die bei Injektion von Mg^{2+} -Ionen in hexameres Hämocyanin erhalten wurde, welches zuvor gegen 100 mM Tris/HCl-Puffer ohne Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen dialysiert wurde (siehe auch Abb. 3.12).

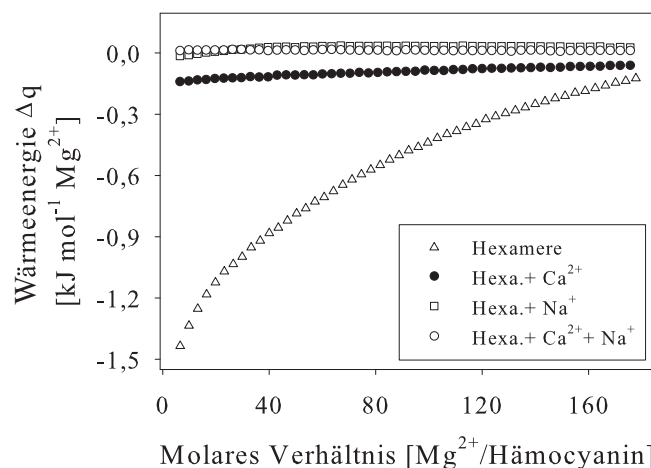


Abbildung 3.13: Bindung von Mg^{2+} -Ionen an hexameres Hämocyanin der Europäischen Languste. Die Bindungsisotherme wurden durch 50 Injektionen einer 120 mM Ligandenlösung in eine $130 \mu\text{M}$ Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen folgende Tris-Puffer (pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. Δ : 100 mM Tris/HCl; \bullet : 100 mM Tris/HCl + 20 mM CaCl_2 ; \square : 100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl; \circ : 100 mM Tris/HCl + 20 mM CaCl_2 + 500 mM NaCl (vgl. Tabelle 2.2 d).

Die bei Injektion von Ca^{2+} -Ionen in hexameres Hämocyanin erhaltenen Bindungsisotherme, welches zuvor gegen Tris-Puffer unterschiedlicher Zusammensetzung (vgl. Tabelle 2.2 e) dialysiert wurde, sind in Abb. 3.14 dargestellt.

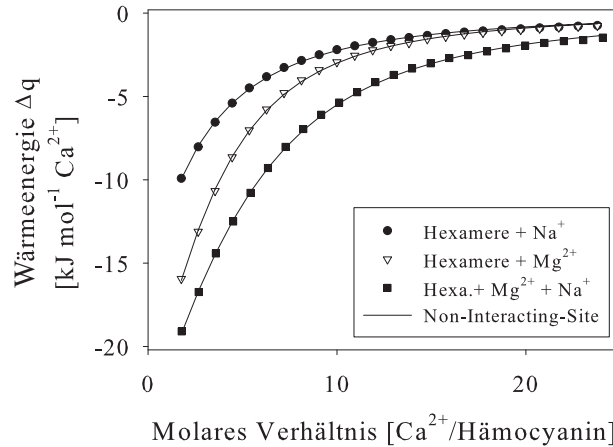


Abbildung 3.14: Bindung von Ca^{2+} -Ionen an hexameres Hämocyanin der Europäischen Languste. Die Bindungsisotherme wurden durch 25 Injektionen einer 10 mM Ligandenlösung in eine $80 \mu\text{M}$ Hämocyaninlösung bei 20°C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen folgende Tris-Puffer ($\text{pH } 8,0$ eingestellt bei 20°C) dialysiert worden. \bullet : 100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl; ∇ : 100 mM Tris/HCl + 50 mM MgCl_2 ; \blacksquare : 100 mM Tris/HCl + 500 mM NaCl + 50 mM MgCl_2 (vgl. Tabelle 2.2 e). Die Regressionskurven des Non-Interacting-Site-Modells sind eingezeichnet.

Die Auswertung der integrierten Bindungsdaten erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell. Für die Bindung von Ca^{2+} an hexameres Hämocyanin, an welches Na^+ - und Mg^{2+} -Ionen gebunden waren, konnte eine Stöchiometrie von $4,36 \pm 0,34$ mit einer Bindungskonstanten von $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 2,88 \pm 0,28 \text{ mM}^{-1}$ ermittelt werden. Die Bindungsenthalpie lag bei $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = -41,73 \pm 3,95 \text{ kJ mol}^{-1}$, die Entropie bei $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = -22,34 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die freie Energie wurde mit $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = -19,39 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet. Die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt. Für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an hexameres Hämocyanin, welches Mg^{2+} -Ionen gebunden hatte, wurden im Vergleich zum Mg^{2+} - und Na^+ -haltigen Pigment verminderte Wärmesignale aufgezeichnet. Die berechnete Anzahl der Bindungsplätze betrug $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = 3,65 \pm 0,27$. $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}}$ wurde mit $4,69 \pm 0,53 \text{ mM}^{-1}$ bestimmt. Bindungsenthalpie und Entropie lagen bei $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = -33,47 \pm 2,99 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = -12,77 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die freie Energie wies $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = -20,71 \text{ kJ mol}^{-1}$ auf. Alle Werte mit Ausnahme der Bindungsenthalpie unterschieden sich signifikant von den Werten, die bei Injektion von Ca^{2+} -Ionen in Mg^{2+} - und Na^+ -haltiges Hämocyanin berechnet wurden. Eine weitere Reduzierung der gemessenen Wärmesignale erfolgte bei Injektion der Ca^{2+} -Ionen in eine hexamere, gegen Na^+ -haltigen Tris-Puffer dialysierte Hämocyaninlösung. Hier wurde die Stöchiometrie mit $1,69 \pm 0,44$ angegeben. Die Bindungskonstante verminderte sich auf $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}} = 1,98 \pm 0,17 \text{ mM}^{-1}$. $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}}$ und $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}}$ betragen $-55,18 \pm 15,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ bzw. $-36,70 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die freie Energie

wurde mit $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}} = -18,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt. Mit Ausnahme der Bindungsenthalpie unterschieden sich die Werte signifikant von denen, die für die Injektion der Ca^{2+} -Ionen in Mg^{2+} -haltiges Hämocyanin berechnet wurden. Die c -Werte der Messungen lagen bei 0,52 für die Bindung von Ca^{2+} an Na^+ -ionenhaltiges Hämocyanin, bei 1,95 für die Bindung an Mg^{2+} - und Na^+ -ionenhaltiges Hämocyanin und bei 2,6 für die Bindung an das Mg^{2+} -ionenhaltige Pigment.

Tabelle 3.6: Thermodynamische Parameter der Bindung von Ca^{2+} -Ionen an hexameres Hämocyanin von *Palinurus elephas* welches zuvor gegen Mg^{2+} - und/oder Na^+ -ionenhaltigen Tris-Puffer dialysiert wurde. In Spalte d sind die im Dialysepuffer enthaltenen Kationen angegeben. Die Werte wurden als Mittelwerte von 3 - 4 Versuchswiederholungen mit dem Non-Interacting-Site-Modell ermittelt. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$).

Non-Interacting-Site-Modell					
d	$n_{\text{Ca}^{2+}}$	$k_{\text{Ca}^{2+}}$ [mM ⁻¹]	$\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^0$ [kJ mol ⁻¹]	$T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^0$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^0$ [kJ mol ⁻¹]
Na^+	$1,69 \pm 0,44$	$1,98 \pm 0,17$	$-55,18 \pm 15,49$	-36,70	-18,48
Mg^{2+}	$3,65 \pm 0,27$	$4,69 \pm 0,53$	$-33,47 \pm 2,99$	-12,77	-20,71
$\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$	$4,36 \pm 0,34$	$2,88 \pm 0,28$	$-41,73 \pm 3,95$	-22,34	-19,39

Die Auswertung der Bindungsisotherme mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell war bei allen drei Versuchsansätzen nicht möglich. Es lag somit in allen Fällen nur ein Bindungsplatztyp für die Ca^{2+} -Ionenbindung ans Hämocyanin vor. Auch konnten die aufgenommenen und integrierten Wärmetönungen der drei Versuchsansätze nicht mit dem Multisite-Interacting-Modell ausgewertet werden. Die Bindung der Ca^{2+} -Ionen erfolgte dementsprechend nicht kooperativ.

3.2.4 Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin unter normoxischen Bedingungen

Das im nativen Zustand zu mehr als 95 % als hexameres Aggregat vorliegende Hämocyanin der Europäischen Languste wurde durch Dialyse gegen einen salzfreien Puffer mit alkalischem pH-Wert (100 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5) in seine monomeren Untereinheiten aufgespalten. Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsplätze für Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurden die Wärmetönungen bei Injektion der Kationen in die monomeren Pigmentlösungen aufgenommen. Der Aggregationszustand des Makromoleküls wurde zu Versuchsbeginn und am Ende des ITC-Versuchs mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie bestimmt (vgl. Kapitel 2.3). So wurde gewährleistet, dass das Hämocyanin zu Beginn des Versuchs zu mehr als 95 % als Monomer vorlag und bei Versuchsende mehr als 95 % der monomeren Untereinheiten durch Anlagerung der divalenten Kationen hexamere Aggregate bildeten.

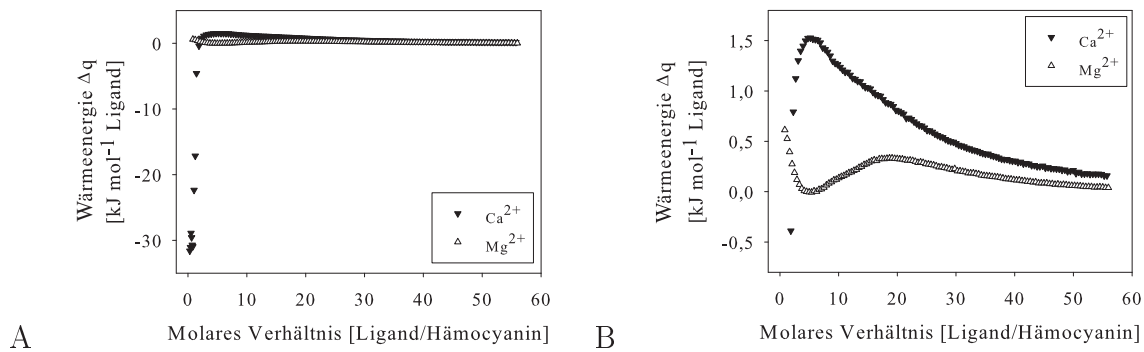


Abbildung 3.15: A: Bindung von Ca^{2+} - (▼) und Mg^{2+} - (△) Ionen an monomeres Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Die Bindungsisotherme wurden durch 131 (Ca^{2+}) bzw. 125 (Mg^{2+}) Injektionen einer 200 mM Ligandenlösung in eine 680 μM Hämocyaninlösung bei 20 °C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen 100 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5 eingestellt bei 20 °C) dialysiert worden. B: wie A. Zur besseren Darstellung ist nur der Bereich der y-Achse von - 0,8 kJ mol^{-1} bis 1,8 kJ mol^{-1} gezeigt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 gezeigt. Wie in Kapitel 2.6 ausgeführt, liegt die Bindungsisotherme einer exothermen Reaktion im negativen Energiebereich, da die Reaktionszelle eine geringere Wärmezufuhr erhält als die Referenzzelle. Die endotherme Reaktion wird entsprechend im positiven Bereich aufgezeichnet. Abb. 3.15 A zeigt, dass durch die Anlagerung von Ca^{2+} -Ionen an das monomere Molekül im Vergleich zur Mg^{2+} -Ionenanlagerung mehr Wärmeenergie freigesetzt wurde. Aus Abb. 3.15 B, in der der Bereich um den Nullpunkt der y-Achse vergrößert dargestellt ist, geht hervor, dass die anfänglich exotherme Anlagerungsreaktion der Ca^{2+} -Ionen an das monomere Molekül in eine endotherme Reaktion übergeht. Die Wärmebilanz der Mg^{2+} -Ionenbindung ist hingegen insgesamt endotherm.

Um einen weiteren Einblick in den Reaktionsablauf zu erzielen, wurden die ITC-Versuche an markanten Punkten der Bindungsisotherme gestoppt und die aktuelle Zusammensetzung des Reaktionsgemischs hinsichtlich der monomeren Untereinheiten und der hexameren Aggregate mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (vgl. Kapitel 2.3) bestimmt. Abb. 3.16 A zeigt die Bindungsisotherme für die Mg^{2+} -Ionen. Die Reaktion wurde an den mit einem Pfeil gekennzeichneten Punkten gestoppt. Die Prozentangabe bezieht sich auf die zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten hexameren Aggregate und die in Klammern gesetzte Ziffer auf die Gesamtligandenkonzentration [mM] in der Reaktionszelle. Die anfänglich aufgezeichnete Wärmeenergie verminderte sich bis auf 0 kJ mol^{-1} bei einer Mg^{2+} -Ionenkonzentration von 3,65 mM. 6 % des Hämocyanins lag zu diesem Zeitpunkt als Hexamer vor. Anschließend stieg die gemessene Wärmeenergie linear an bis 76 % des Hämocyanins als hexamere Aggregate, bei einer Ligandenkonzentration von 12,07 mM, vorlagen um dann wieder bis zur Nulllinie abzufallen. Bei einer Gesamtligandenkonzentration von 19,85 mM lagen 86 % als hexamere Zusammenschlüsse vor. Und 100 % der monomeren

Untereinheiten vereinigten sich zu hexameren Assoziaten bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 32,26 mM.

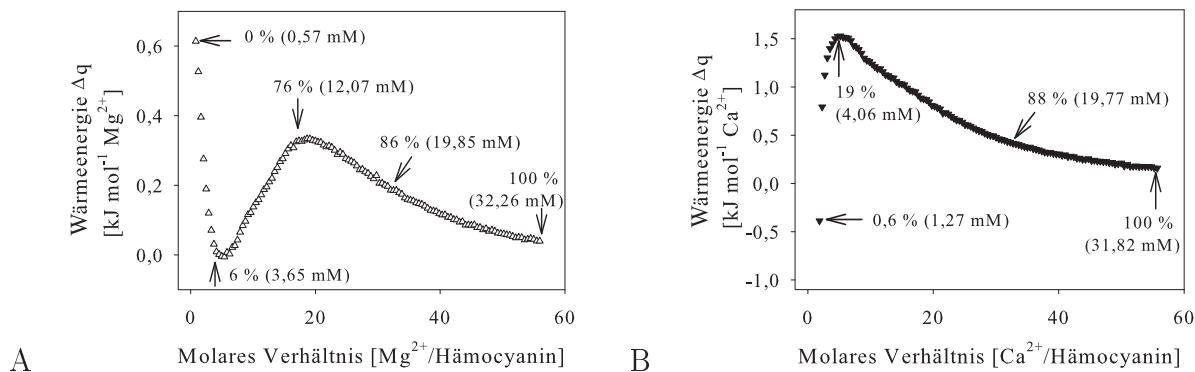


Abbildung 3.16: A: Bindungsisotherme für die Bindung von Mg^{2+} an monomeres Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Es wurde eine 200 mM Ligandenlösung in eine $680 \mu M$ Hämocyaninlösung bei $20^\circ C$ titriert. Die ITC-Versuche wurden nach der mit einem Pfeil gekennzeichneten Injektion abgebrochen. Die Prozentangabe bezeichnet den jeweiligen Status an hexameren Aggregaten. Es wurde der Mittelwert von 2 bis 4 Versuchen angegeben. Die in Klammern gesetzte Ziffer gibt die Ligandenkonzentration in der Reaktionszelle bei Abbruch der Versuche an. Es wurde ein Mittelwert aus 2 bis 4 Versuchen gebildet. B: Bindungsisotherme (Ausschnitt des y-Achsenbereichs von $-1,1 kJ mol^{-1}$ bis $1,8 kJ mol^{-1}$) für die Bindung von Ca^{2+} an monomeres Hämocyanin der Europäischen Languste. Es wurde eine 200 mM Ligandenlösung in eine $680 \mu M$ Hämocyaninlösung bei $20^\circ C$ titriert. Die ITC-Versuche wurden nach der mit einem Pfeil gekennzeichneten Injektion abgebrochen. Die Prozentangabe bezeichnet den jeweiligen Status an hexameren Aggregaten. Es wurde der Mittelwert von 2 bis 3 Versuchen angegeben. Die in Klammern gesetzte Ziffer gibt die Ligandenkonzentration in der Reaktionszelle bei Abbruch des Versuchs an. Es wurde ein Mittelwert aus 2 bis 3 Versuchen gebildet.

Aus Abb. 3.16 B ist zu erkennen, dass die eingangs positive Energiebilanz bei Anlagerung der Ca^{2+} -Ionen an das monomere Hämocyanin sich linear verminderte. Bei einer Ionenkonzentration von 1,27 mM und 0,6 % hexameren Aggregaten kehrte sie sich um und erreichte ihr Minimum bei einer Ca^{2+} -Ionenkonzentration von 4,06 mM. Bei dieser Konzentration hatten sich 19 % der Monomere zu hexameren Assoziaten zusammengelagert. 88 % der monomeren Untereinheiten hatten sich bei einer Ca^{2+} -Ionenkonzentration von 19,77 mM zu hexameren Zusammenschlüssen vereinigt. Und bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 31,82 mM lagen 100 % der monomeren Untereinheiten als hexamere Aggregate vor.

Die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten des Hämocyanins von *Palinurus elephas* zu hexameren Aggregaten ist ein endothermer Vorgang. Dies konnte durch ITC-Versuche gezeigt werden, bei denen das monomere Hämocyanin in einen Tris-Puffer (pH 8,0) titriert wurde (vgl. Abb. 3.17). Im Anschluss an den Versuch wurde der aktuelle Aggregationszustand des Hämocyanins in der Reaktionszelle überprüft. Zwischen 25 % und 34 % der injizierten monomeren Untereinheiten hatten sich zu hexameren Molekülen zusammengelagert. Eine größere Ausbeute an Hexameren konnte auch bei diversen Versuchsabwandlungen nicht erzielt werden.

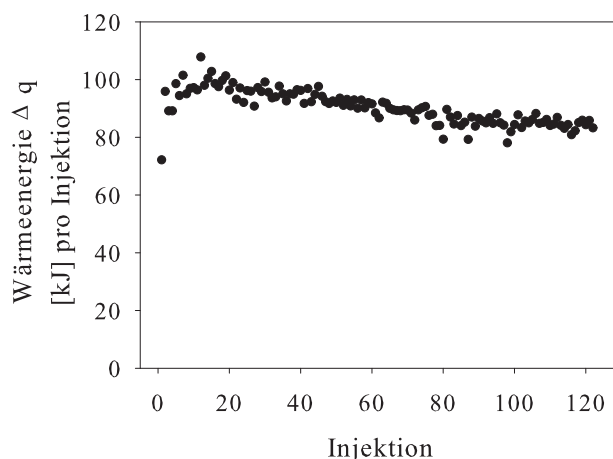


Abbildung 3.17: Aufgezeichnete Wärmeenergie bei Injektion einer $680 \mu\text{M}$ monomeren Hämocyaninlösung, die zuvor gegen 100 mM Glycin/NaOH-Puffer ($\text{pH } 9,5$ eingestellt bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$) dialysiert wurde, in 100 mM Tris/HCl-Puffer ($\text{pH } 8,0$ eingestellt bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Es wurden 125 Injektionen mit je $2 \mu\text{l}$ Hämocyaninlösung durchgeführt. Bei Versuchsende hatten sich 25% bis 34% der monomeren Untereinheiten zu hexameren Aggregaten zusammengelagert.

Eine Auswertung der in Abb. 3.15 gezeigten Bindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell, dem Multisite-Interacting-Modell und dem Two-Sets-of-Sites-Modell war nicht möglich, da neben der Wärmeenergie, die für die Bindung der divalenten Kationen verbraucht bzw. frei wurde, die aufgezeichneten Signale auch durch die Energie beeinflusst wurden, die für die Zusammenlagerung der Monomeren zu höhermolekularen Aggregaten verbraucht wurde. Dieser energetische Aspekt wird in den in Kapitel 2.7.2 dargestellten Modellen nicht berücksichtigt. Aus den in Abb. 3.17 illustrierten ITC-Versuchen war bekannt, dass die alleinige Aggregation endotherm verläuft. Jedoch konnte die verbrauchte Wärmeenergie nicht in kJ mol^{-1} Monomer beziffert werden, da die erhaltenen Wärmetönungen diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Dies kann daran liegen, dass das hexamere Hämocyanin von *Palinurus elephas* aus vier verschiedenen Monomeruntereinheiten zusammengesetzt wird (Jekel et al., 1996). In welchem Verhältnis und in wieviel Schritten die Zusammenlagerung erfolgt bzw. welche Phasen energetisch begünstigt sind, ist nicht bekannt.

3.2.5 Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin unter hypoxischen Bedingungen

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Bindungseigenschaften der untersuchten divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} an monomeres Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurde über isotherme titrationskalorimetrische Versuche charakterisiert, die bei einem Sauerstoffpartialdruck unter einem Torr durchgeführt wurden. Die Bindung der Ionen unter Sauerstoffausschluss ist von Bedeutung, da sie ihrerseits die Sauerstoffaffinität des Pig-

ments beeinflussen. Dies konnte anhand der in dieser Arbeit betrachteten Sauerstoffbindungskurven gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.2).

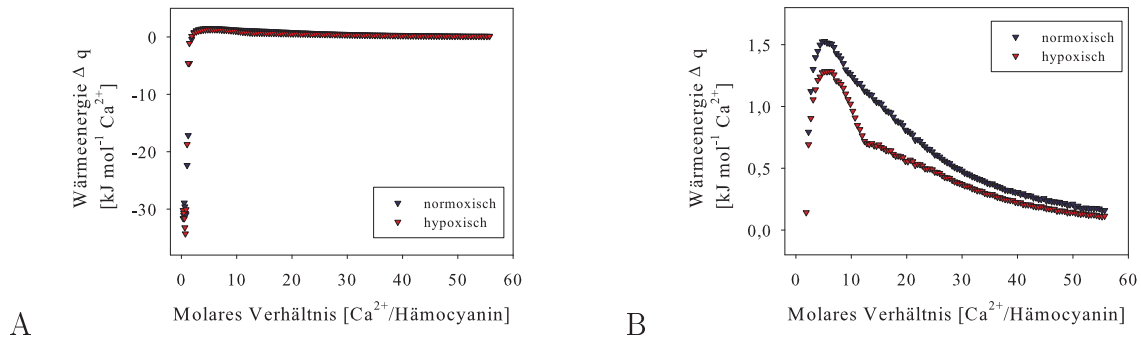


Abbildung 3.18: A: Bindung von Ca^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin der Europäischen Languste unter normoxischen ($\text{Po}_2 > 150$ Torr) und hypoxischen ($\text{Po}_2 < 1$ Torr) Bedingungen. Die Bindungsisotherme wurden durch 131 Injektionen einer 200 mM Ligandenlösung in eine $680 \mu\text{M}$ Hämocyaninlösung bei 20°C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen 100 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5 eingestellt bei 20°C) dialysiert worden. B: wie A. Zur besseren Darstellung ist nur der Bereich der y-Achse von $-0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis $1,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ gezeigt.

In Abb. 3.18 A ist die Bindungsisotherme für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin unter hypoxischen Bedingungen ($\text{Po}_2 < 1$ Torr) im Vergleich zur Anlagerung bei einem Sauerstoffpartialdruck von mehr als 150 Torr gezeigt. Die gemessenen und integrierten Signale weichen nicht voneinander ab. Auch die detaillierte Betrachtung im endothermen Bereich (Abb. 3.18 B) zeigte, dass die unter Hypoxie und Normoxie aufgenommenen Wärmesignale nur geringfügige Unterschiede aufwiesen.

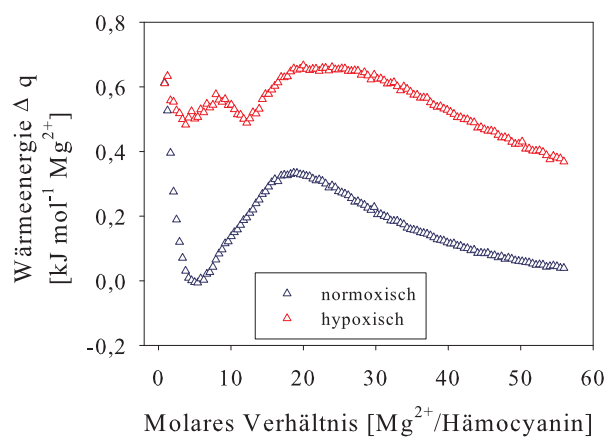


Abbildung 3.19: Bindung von Mg^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin der Europäischen Languste unter normoxischen ($\text{Po}_2 > 150$ Torr) und hypoxischen ($\text{Po}_2 < 1$ Torr) Bedingungen. Die Bindungsisotherme wurden durch 125 Injektionen einer 200 mM Ligandenlösung in eine $680 \mu\text{M}$ Hämocyaninlösung bei 20°C erhalten. Das Hämocyanin war zuvor gegen einen 100 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5 eingestellt bei 20°C) dialysiert worden.

Für die Anlagerung der Mg^{2+} -Ionen bei einem Sauerstoffpartialdruck unter einem Torr lag die integrierte Wärmeenergie bis zu $0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ über der unter Normoxie erzielten (vgl. Abb. 3.19). Die direkte Überprüfung des Aggregationszustandes des Hämocyanins nach Versuchsende ergab für die Injektion von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen unter hypoxischen wie unter normoxischen Bedingungen eine Ausbeute an Hexameren von mehr als 95 %. Eine Auswertung der Bindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell, dem Multisite-Interacting-Modell und dem Two-Sets-of-Sites-Modell war auch für die unter Hypoxie aufgenommenen Messdaten aus den in Kapitel 3.2.4 dargestellten Gründen nicht möglich.

3.3 Sauerstoffbindungsstudien

Die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins dekapoder Krebse werden u. a. durch die divalenten Calcium- und Magnesiumionen, durch das monovalente Natriumion, durch den natürlichen Modulator Urat und durch den artifiziellen Effektor Koffein beeinflusst (Bonaventura und Bonaventura, 1980; Morris et al., 1985). Eine eingehende Charakterisierung der Einflussnahme beim Hämocyanin der Europäischen Languste erfolgte mittels Sauerstoffbindungskurven, die in An- und Abwesenheit aller bzw. eines Teils dieser Liganden aufgenommen wurden. Hierzu wurden die Hämocyaninlösungen gegen Tris-Puffer mit unterschiedlicher Kationenzusammensetzung dialysiert (vgl. Tabelle 2.1). Der Einfluss von Urat bzw. Koffein auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins wurde über den Vergleich von Bindungskurven betrachtet, die ohne und mit Urat bzw. Koffein gesättigtem Hämocyanin aufgenommen wurden. Zudem wurden die Bindungseigenschaften von in seine monomeren Untereinheiten zerfallenem Pigment und von monomeren Hämocyanin, das wieder zu hexameren Komplexen reagregiert wurde, über Sauerstoffbindungskurven analysiert.

3.3.1 Urat und Koffein als Liganden

Um den Einfluss des natürlichen Modulators Urat und des artifiziellen Effektors Koffein auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins von *Palinurus elephas* beurteilen zu können, wurden die Halbsättigungsdrücke (P_{50}) und Hill-Koeffizienten (n_H) von Hämocyaninlösungen mit und ohne Ligand bestimmt. Ein Maß für die Sauerstoffaffinität des Pigments ist der P_{50} . Die Kooperativität der Sauerstoffbindung kann über den n_H beschrieben werden.

Für die in An- und Abwesenheit der Effektoren Urat und Koffein aufgenommenen Sauerstoffbindungskurven ergaben sich die in Tabelle 3.7 aufgeführten Halbsättigungswerte und Hill-Koeffizienten. Der P_{50} des Pigments ohne beide Liganden betrug $6,48 \pm 0,21$ Torr.

Tabelle 3.7: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H des Hämocyansins von *Palinurus elephas* in An- und Abwesenheit von 1 mM Urat und 1 mM Koffein. Die Messungen erfolgten bei 20 °C. Es wurden 3 bis 5 Versuchswiederholungen durchgeführt ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Ligand	P_{50} [Torr]	n_H
ohne	$6,48 \pm 0,21$	$2,80 \pm 0,25$
Urat	$3,50 \pm 0,08$	$2,31 \pm 0,04$
Koffein	$2,90 \pm 0,16$	$1,71 \pm 0,14$

Unter Zugabe von Urat erhöhte sich die Sauerstoffaffinität des Hämocyansins signifikant. Der Halbsättigungsdruck verminderte sich auf $P_{50}^{\text{Urat}} = 3,50 \pm 0,08$ Torr. Die höchste Affinität des Hämocyansins zu Sauerstoff wurde bei Zugabe des Effektors Koffein erzielt. Der P_{50} veränderte sich nochmals signifikant und konnte mit $2,90 \pm 0,16$ Torr berechnet werden. Der Hill-Koeffizient wurde für das Pigment ohne die Effektoren Urat und Koffein mit $2,80 \pm 0,25$ bestimmt. Die Sauerstoffbindung ans Hämocyansin erfolgte kooperativ. Bei Zugabe des natürlichen Modulators Urat nahm die Kooperativität der Bindung ab. Der n_H^{Urat} betrug $2,31 \pm 0,04$. Mit Koffein gesättigtes Hämocyansin wies einen Hill-Koeffizienten von $n_H^{\text{Koffein}} = 1,71 \pm 0,14$ auf. Die Kooperativität der Sauerstoffbindung verminderte sich im Vergleich zum ligandenfreien Hämocyansin signifikant, im Vergleich zum uratgesättigten Pigment konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Erhöhung der Sauerstoffaffinität durch Sättigung der Hämocyansinlösung mit den Effektoren Urat oder Koffein und die gleichzeitige Verminderung der Kooperativität kann an den Sauerstoffbindungskurven auch optisch erfasst werden. Abbildung 3.21 zeigt die Sauerstoffbindung an das Hämocyansin unter Einfluss der Effektoren Urat und Koffein im Vergleich zu einer Hämocyansinlösung ohne beide Effektoren. Alle Bindungskurven wiesen eine sigmoide Form auf, was die kooperative Bindung des Sauerstoffs an das Hämocyansin der Europäischen Languste unterstrich. Der sigmoide Charakter wurde jedoch in Anwesenheit von Urat und Koffein abgeschwächt. Die Kooperativität der Sauerstoffbindung war vermindert. Die Erhöhung der Sauerstoffaffinität bei Zugabe der Effektoren äußerte sich durch eine Verschiebung der Bindungskurven entlang der Abszisse nach links.

3.3.2 Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^{+} -Ionen als Liganden

Zur Überprüfung welchen Einfluss divalente und monovalente Kationen auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyansins der Europäischen Languste besitzen, wurden Sauerstoffbindungskurven in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^{+} -Ionen aufgenommen. Die Hämocyansinlösungen wurden hierfür gegen die in Tabelle 2.1 Nr. 1 bis 7 aufgelisteten Tris-Puffer dialysiert. Die berechneten Halbsättigungswerte (P_{50}) und Hill-Koeffizienten (n_H) sind in Tabelle 3.8 zusammengestellt. Hämocyansin, welches gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde, wies einen Halbsättigungsdruck von $9,04 \pm 0,36$ Torr auf. Unter Zugabe der Kationen zur Hämocyansinlösung erhöhte sich die Sauerstoffaffini-

Tabelle 3.8: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H des Hämocyansins von *Palinurus elephas* in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 2.1 Nr. 1 bis 7). In Spalte Kationen ist die jeweilige Kationenzusammensetzung des Tris-Puffers angegeben gegen den die Hämocyansinlösung dialysiert wurde. Die in Spalte b aufgeführten Ziffern entsprechen den Nummern der Tris-Puffer in Tabelle 2.1. Die Messungen erfolgten bei 20°C . Es wurden 3 bis 4 Versuchswiederholungen durchgeführt ($X \pm \text{SD}$).

b	Kationen	P_{50} [Torr]	n_H
1	ohne	$9,04 \pm 0,36$	$2,44 \pm 0,10$
2	20 mM Ca^{2+}	$6,18 \pm 0,25$	$2,48 \pm 0,07$
3	50 mM Ca^{2+}	$5,35 \pm 0,30$	$2,67 \pm 0,15$
4	20 mM Mg^{2+}	$7,01 \pm 0,36$	$2,60 \pm 0,15$
5	50 mM Mg^{2+}	$4,10 \pm 0,17$	$2,47 \pm 0,10$
6	150 mM Na^+	$6,22 \pm 0,11$	$2,32 \pm 0,01$
7	500 mM Na^+	$4,02 \pm 0,32$	$2,25 \pm 0,06$

tät des Pigments signifikant. Die Verminderung des P_{50} war vom eingesetzten Effektor und von dessen Ionenstärke abhängig. Der geringste Einfluss auf die Affinität konnte bei Zugabe von 20 mM Mg^{2+} -Ionen festgestellt werden. Der Halbsättigungswert betrug $P_{50}^{20\text{Mg}} = 7,01 \pm 0,36$ Torr. Die Erhöhung der Ionenstärke auf 50 mM bewirkte eine signifikante Verminderung des Halbsättigungsdrucks auf $P_{50}^{50\text{Mg}} = 4,10 \pm 0,17$ Torr. Der P_{50} einer Hämocyansinlösung mit 20 mM Ca^{2+} -Ionen wurde mit $P_{50}^{20\text{Ca}} = 6,18 \pm 0,25$ Torr bestimmt. Die Affinität erhöhte sich nicht signifikant bei Zugabe von 50 mM Ca^{2+} -Ionen zur Pigmentlösung ($P_{50}^{50\text{Ca}} = 5,35 \pm 0,30$ Torr). Das monovalente Kation Na^+ bewirkte mit einer Ionenstärke von 150 mM im Vergleich zum ionenfreien Hämocyansin eine signifikante Verminderung des $P_{50}^{150\text{Na}}$ auf $6,22 \pm 0,11$ Torr. Bei Zugabe von 500 mM Na^+ -Ionen zur Hämocyansinlösung verminderte sich der Halbsättigungsdruck signifikant auf $P_{50}^{500\text{Na}} = 4,02 \pm 0,32$ Torr.

Die Kationen wurden als Chloridsalze dem Dialysepuffer beigegeben, wobei die Auswirkung der in der Lösung enthaltenen Chloridionen auf die Messdaten von untergeordneter Bedeutung war. Der P_{50} wies nach Dialyse der Hämocyansinlösung gegen einen Tris-Puffer mit 20 mM CaCl_2 oder gegen einen Tris-Puffer mit 150 mM NaCl keinen signifikanten Unterschied auf. Gleiches galt für die Dialyse des Makromoleküls gegen einen Tris-Puffer mit 50 mM MgCl_2 oder 500 mM NaCl , auch hier konnte kein signifikanter Unterschied der berechneten P_{50} -Werte festgestellt werden. In beiden Fällen traten, trotz Verdrei- bzw. Verfünffachung der Chloridionenstärke, keine signifikanten Veränderungen im Halbsättigungsdruck auf.

Die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyansin von *Palinurus elephas* das gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde, erfolgte kooperativ. Der berechnete Hill-Koeffizient lag bei $2,44 \pm 0,10$. Die kooperative Bindung wurde durch Dialyse der Pigmentlösung gegen einen Tris-Puffer, der Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Na^+ -Ionen beinhaltet, nicht signifikant beeinflusst. Der n_H -Wert betrug in mit 20 mM Ca^{2+} -Ionen angereichertem Hämocyansin $2,48 \pm 0,07$. Bei

Erhöhung der Ionenstärke auf 50 mM erhöhte sich der Wert auf $n_H^{50\text{Ca}} = 2,67 \pm 0,15$. Im Fall von 20 mM Mg^{2+} -Ionen wurde ein Hill-Koeffizient von $n_H^{20\text{Mg}} = 2,60 \pm 0,15$ berechnet, der auf $n_H^{50\text{Mg}} = 2,47 \pm 0,10$ bei vermehrter Ionenzugabe (50 mM) sank. Die für eine Hämocyaninlösung mit Na^+ -Ionen ermittelten n_H -Werte lagen bei $n_H^{150\text{Na}} = 2,32 \pm 0,01$ (150 mM) und $n_H^{500\text{Na}} = 2,25 \pm 0,06$ (500 mM).

Tabelle 3.9: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H des Hämocyanins von *Palinurus elephas* das gegen Tris-Puffer mit jeweils zwei bzw. drei verschiedenen Kationenkombinationen dialysiert wurde (siehe Tabelle 2.1 Nr. 8 bis 11). Die in Spalte *b* aufgeführten Ziffern entsprechen den Nummern der Tris-Puffer in Tabelle 2.1. In Spalte Kationen ist die jeweilige Kationenzusammensetzung des Tris-Puffers angegeben gegen den die Hämocyaninlösung dialysiert wurde. Die Messungen erfolgten bei 20 °C. Es wurden 3 bis 4 Versuchswiederholungen durchgeführt ($X \pm \text{SD}$). Zum direkten Vergleich wurden die Werte einer Hämocyaninlösung aufgeführt, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer dialysiert wurde.

<i>b</i>	Kationen	P_{50} [Torr]	n_H
1.	ohne	$9,04 \pm 0,36$	$2,44 \pm 0,10$
8.	20 mM Ca^{2+} + 50 mM Mg^{2+}	$6,18 \pm 0,01$	$2,79 \pm 0,04$
9.	20 mM Ca^{2+} + 500 mM Na^+	$5,10 \pm 0,29$	$2,67 \pm 0,02$
10.	50 mM Mg^{2+} + 500 mM Na^+	$3,57 \pm 0,21$	$2,65 \pm 0,13$
11.	20 mM Ca^{2+} + 50 mM Mg^{2+} + 500 mM Na^+	$5,61 \pm 0,19$	$3,07 \pm 0,16$

Eine weitere Charakterisierung der Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins der Europäischen Languste unter Einfluss divalenter und monovalenter Kationen erfolgte über die Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven mit Pigmentlösungen, denen zwei unterschiedliche Kationen zugegeben wurden (siehe Tabelle 2.1 Nr. 8 bis 10). Die Halbsättigungswerte (P_{50}) und Hill-Koeffizienten (n_H) sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Als Referenzwert ist der P_{50} und der n_H einer Hämocyaninlösung angegeben, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer ohne die untersuchten Kationen dialysiert wurde. Die Sauerstoffaffinität nahm mit Erhöhung der Ionenkonzentration signifikant zu. Bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} - und 50 mM Mg^{2+} -Ionen (Nr. 8) verminderte sich der Halbsättigungsdruck signifikant auf $P_{50}^{20\text{Ca}50\text{Mg}} = 6,18 \pm 0,01$ Torr. Eine weitere Erhöhung der Ionenkonzentration (20 mM Ca^{2+} - und 500 mM Na^+ -Ionen = Nr. 9) ließ den P_{50} signifikant auf $5,10 \pm 0,29$ Torr sinken. Die höchste Sauerstoffaffinität wurde bei Zugabe von 50 mM Mg^{2+} - und 500 mM Na^+ -Ionen (Nr. 10) zum Dialysepuffer erreicht ($P_{50}^{50\text{Mg}500\text{Na}} = 3,57 \pm 0,21$ Torr). Eine Hämocyaninlösung, die gegen einen Puffer dialysiert wurde, in dem alle untersuchten Kationen (Tabelle 2.1 Nr. 11) vereinigt waren, wies entgegen dem zuvor beschriebenen Trend lediglich einen Halbsättigungsdruck von $5,61 \pm 0,19$ Torr auf. Die berechneten Hill-Koeffizienten erhöhten sich bei Zugabe zweier verschiedener Kationen zum Dialysepuffer signifikant zum Referenzwert. Die n_H -Werte wichen jedoch mit $2,79 \pm 0,04$ (Nr. 8), $2,67 \pm 0,02$ (Nr. 9) und $2,65 \pm 0,13$ (Nr. 10) nicht signifikant voneinander ab. Hämocyanin, welches gegen einen Tris-Puffer dialysiert wurde, in dem alle drei untersuchten Kationen vereinigt waren, zeigte einen signifikanten Anstieg des Hill-Koeffizienten auf $n_H^{20\text{Ca}50\text{Mg}500\text{Na}} = 3,07 \pm 0,16$ gegenüber dem Referenzwert.

3.3.3 Sauerstoffbindung an monomeres und reaggregiertes Hämocyanin

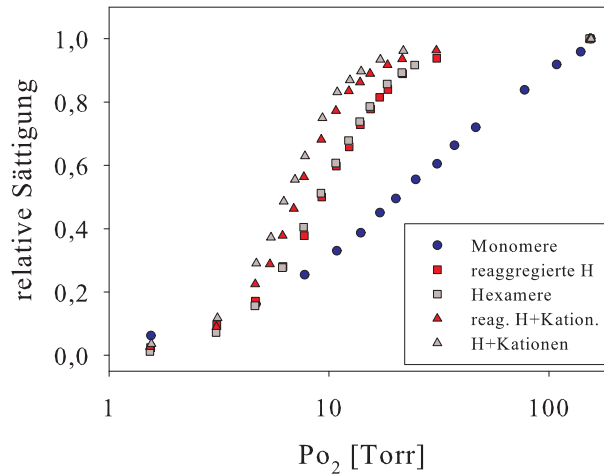


Abbildung 3.20: Sauerstoffbindungsdaten von in seine monomeren Untereinheiten zerfallenem Hämocyanin (blauer ●), monomerem Hämocyanin, welches durch Dialyse gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) (rotes ■) oder gegen 100 mM Tris/HCl + 150 mM NaCl + 20 mM CaCl₂ + 20 mM MgCl₂ (pH 8,0) (rotes △) zu hexameren Komplexen reaggregiert wurde. Im Vergleich zu hexamerem Hämocyanin, was gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) (graues ■) oder gegen 100 mM Tris/HCl + 150 mM NaCl + 20 mM CaCl₂ + 20 mM MgCl₂ (pH 8,0) (graues △) dialysiert wurde. H = Hexamere

Zur weiteren Analyse der Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins der Europäischen Languste wurden Bindungskurven mit in seine monomeren Untereinheiten zerfallenem Protein aufgenommen. Nach van Holde und Miller (1995) besitzt Sauerstoff am monomerem Hämocyanin eine Bindungsstelle. Der berechnete Hill-Koeffizient von $n_H^{\text{mono}} = 1,11 \pm 0,11$ steht für eine nicht kooperative Bindung (vgl. Tabelle 3.10). Die Sauerstoffaffinität des monomeren Pigments war sehr gering. Der Halbsättigungsdruck lag bei $P_{50}^{\text{mono}} = 18,65 \pm 1,96$ Torr. In Abb. 3.20 ist die Bindungskurve für die Anlagerung von Sauerstoff an monomeres Hämocyanin gezeigt. Der Verlauf der Kurve war annähernd linear. Im Vergleich zur Sauerstoffbindungskurve für hexameres Hämocyanin war die Kurve für das monomere Pigment, aufgrund der geringen Sauerstoffaffinität, entlang der Abszisse nach rechts verschoben.

Wie in Kapitel 3.1 dargestellt, können die monomeren Untereinheiten des Hämocyanins durch Dialyse gegen einen Tris-Puffer (pH 8,0) mit und ohne Zugabe von Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-Ionen zu hexameren Komplexen reaggregiert werden. Zur Untersuchung, ob das reaggregierte Hämocyanin die gleichen Sauerstoffbindungseigenschaften aufweist wie das hexamere, nicht zuvor in seine Untereinheiten zerfallene Pigment, wurden die in Abb. 3.20 gezeigten Bindungskurven aufgenommen. In Tabelle 3.10 sind die aus den Sauerstoffbindungskurven berechneten Halbsättigungsdrücke und Hill-Koeffizienten aufgeführt. Als Referenz dienten die Werte, die für hexameres nicht zuvor in die monomeren

Tabelle 3.10: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H des in seine monomeren Untereinheiten zerfallenen Hämocyanins von *Palinurus elephas* und von reaggregiertem Hämocyanin. Hier wurde das monomere Hämocyanin gegen folgende Tris-Puffer dialysiert: 1: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 2: 100 mM Tris/HCl mit 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 und 150 mM NaCl (pH 8,0). Die Messungen erfolgten bei 20°C. Es wurden 3 bis 4 Versuchswiederholungen durchgeführt ($X \pm \text{SD}$). Zum direkten Vergleich wurden die Werte aufgeführt, die für hexamerer Hämocyanin berechnet wurden, das gegen die o.g. Tris-Puffer Nr. 1 und Nr. 2 dialysiert wurde.

Dialysepuffer	Aggregationszustand	P_{50} [Torr]	n_H
	Monomere	$18,65 \pm 1,96$	$1,11 \pm 0,11$
1	reaggregierte Hexamere	$9,61 \pm 1,24$	$2,34 \pm 0,07$
1	Hexamere	$9,04 \pm 0,36$	$2,44 \pm 0,10$
2	reaggregierte Hexamere	$7,61 \pm 0,78$	$2,96 \pm 0,17$
2	Hexamere	$6,48 \pm 0,21$	$2,80 \pm 0,25$

Untereinheiten zerfallenes Hämocyanin berechnet wurden. Nach Dialyse des monomeren Hämocyanins gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) erfolgte die Sauerstoffbindung kooperativ und mit einer signifikant höheren Affinität als bei monomerem Hämocyanin. Der Hill-Koeffizient betrug $n_H^r = 2,34 \pm 0,07$ und der Halbsättigungsdruck lag bei $P_{50}^r = 9,61 \pm 1,24$ Torr. Beide Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen, die für eine hexamere Hämocyaninlösung ermittelt wurden, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) dialysiert wurde ($P_{50} = 9,04 \pm 0,36$ Torr, $n_H = 2,44 \pm 0,10$). Die aufgenommenen Sauerstoffbindungskurven verschoben sich, aufgrund der erhöhten Affinität, im Vergleich zur annähernd linearen Sauerstoffbindungskurve des monomeren Proteins, entlang der Abszisse nach links. Ihre sigmoide Form resultierte aus der Kooperativität der Bindung. Die Dialyse von monomerem Hämocyanin gegen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit monovalenten (150 mM NaCl) und divalenten (20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2) Kationen führte zu hexameren Aggregaten, deren Kooperativität mit $n_H^{r+K} = 2,96 \pm 0,17$ berechnet wurde. Der n_H -Wert unterschied sich nicht signifikant von dem einer hexameren Hämocyaninlösung, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer mit 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 und 20 mM CaCl_2 dialysiert wurde ($n_H = 2,80 \pm 0,25$). Die Sauerstoffaffinität des reaggregierten Proteins wurde mit $P_{50}^{r+K} = 7,61 \pm 0,78$ Torr berechnet und war signifikant geringer als die der Referenzlösung ($P_{50} = 6,48 \pm 0,21$ Torr).

3.3.4 Analyse der Sauerstoffbindungskurven

Zur weiteren Beschreibung der Sauerstoffbindung wurde das MWC-Modell und das Three-State-MWC-Modell angewandt (vgl. Kapitel 2.7.1). Nach beiden Modellen kann das Makromolekül in verschiedenen Konformationen vorliegen. Das MWC-Modell geht von zwei unterschiedlichen Zuständen, das Three-State-MWC-Modell von drei Formen aus, die im Gleichgewicht zueinander stehen. Dieses Gleichgewicht wird nach Wyman (1972) durch die Bindung eines Effektors an das Makromolekül verschoben. Die Sauerstoffbindungskon-

stanten der allosterischen Unterformen bleiben durch die Effektorbindung unverändert. Optisch kann dieser Effekt an der Verschiebung der Bindungskurven entlang der x-Achse ausgemacht werden (vgl. Abb 3.21). Die weitere Betrachtung der Sauerstoffbindungskurven erfolgte in Analysegruppen (siehe Tabelle 2.4).

Urat und Koffein als Liganden

Nach der Theorie des MWC-Modells kann das Hämocyaninmolekül von *Palinurus elephas* in einer T_{mwc} - oder R_{mwc} -Form vorliegen, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Für die Sauerstoffbindungskurven, die in An- und Abwesenheit des natürlichen Modulators Urat und des artifiziiellen Effektors Koffein aufgenommen wurden (Analysegruppe VI), ergab sich eine Sauerstoffbindungskonstante für die Bindung an die R_{mwc} -Form ($k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$) von $0,539 \pm 0,022 \text{ Torr}^{-1}$ und für die Bindung an die T_{mwc} -Form ($k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$) von $0,021 \pm 0,004 \text{ Torr}^{-1}$ (vgl. Tabelle 3.11). Die Bindungskonstanten $k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$ und $k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$ gelten für das Hämocyanin in An- und Abwesenheit der Effektoren.

Tabelle 3.11: χ^2 der Regression der Sauerstoffbindungskurven und Sauerstoffbindungskonstanten [Torr^{-1}] $k_{R_{\text{mwc}}}$, $k_{T_{\text{mwc}}}$, k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} der Analysegruppe VI für das MWC-Modell und das Three-State-MWC-Modell. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.9 für das MWC-Modell und mit Formel 2.17 für das Three-State-MWC-Modell berechnet. Die angegebenen Fehler entsprechen den in der Regressionsroutine berechneten Unsicherheiten der Parameter.

MWC		Three-State-MWC	
χ^2	$7,04 \times 10^{-4}$	χ^2	$4,48 \times 10^{-4}$
$k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$	$0,539 \pm 0,022 \text{ Torr}^{-1}$	$k_{R_3}^{\text{VI}}$	$1,792 \pm 0,427 \text{ Torr}^{-1}$
$k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{VI}}$	$0,021 \pm 0,004 \text{ Torr}^{-1}$	$k_{T_3}^{\text{VI}}$	$0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$
		$k_{S_3}^{\text{VI}}$	$0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$

Für das Three-State-MWC-Modell, in dem das Hämocyanin der Europäischen Languste in den drei allosterischen Konformationen R_3 , T_3 und S_3 vorliegen kann, ergaben sich die in Tabelle 3.11 aufgeführten Werte. Die Bindungskonstante für die Bindung des Sauerstoffs an die R_3 -Form ($k_{R_3}^{\text{VI}}$) betrug $1,792 \pm 0,427 \text{ Torr}^{-1}$, für die Bindung an die T_3 -Form ($k_{T_3}^{\text{VI}}$) wurde ein Wert von $0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$ und für die Bindung an die S_3 -Form ($k_{S_3}^{\text{VI}}$) ein Wert von $0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$ berechnet. $k_{R_3}^{\text{VI}}$, $k_{T_3}^{\text{VI}}$ und $k_{S_3}^{\text{VI}}$ gelten in An- und Abwesenheit der Effektoren Urat und Koffein. Die allosterischen Konformationen stehen sowohl beim MWC-Modell als auch beim Three-State-MWC-Modell im Gleichgewicht zueinander, das über die Konstanten $L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$ bzw. $L_{S_3}^{\text{eff}}$ und $L_{T_3}^{\text{eff}}$ beschrieben wird. Die Gleichgewichtskonstanten wurden für jede Datengruppe innerhalb der Analysegruppe VI bestimmt. Die Werte sind im Anhang in Tabelle A.1 zusammengestellt und logarithmiert in Abb. 3.24 für das MWC-Modell und in Abb. 3.25 für das Three-State-MWC-Modell aufgetragen.

Die Sauerstoffbindungskurven sind in Abbildung 3.21 gezeigt. Die Messdaten wurden einer nichtlinearen Regression mit dem MWC-Modell (Abb. 3.21 A) und mit dem Three-

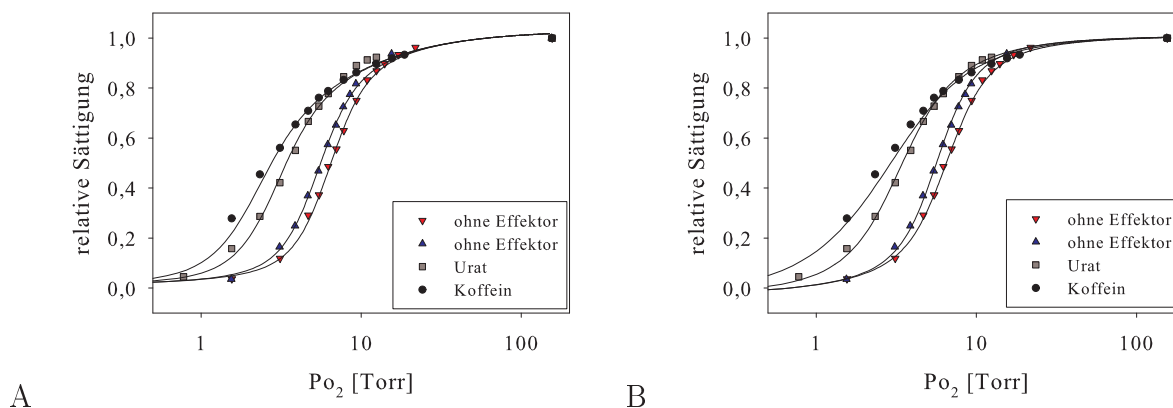


Abbildung 3.21: Sauerstoffbindung an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter dem Einfluss der Effektoren Urat und Koffein (Analysegruppe VI). Die Sättigung des Hämocyanins wurde in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in 100 mM Tris/HCl-Puffer mit 500 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂ (pH 8,0) (rote Symbole) und in 100 mM Tris/HCl-Puffer mit 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂ (pH 8,0) ohne (blaue Symbole) und mit 1 mM Koffein (●) oder 1 mM Urat (■) bei 20 °C bestimmt (siehe Tabelle 2.4). Die Daten wurden einer nichtlinearen Regression mit dem MWC-Modell (A) und dem Three-State-MWC-Modell (B) unterzogen.

State-MWC-Modell (Abb. 3.21 B) unterzogen. Da es mit beiden Modellen möglich war, die Sauerstoffbindungsdaten zu beschreiben und eine nichtlineare Regression durchzuführen, wurden zur Beurteilung der Güte der Regression die χ^2 -Werte für beide Modelle berechnet (vgl. Tabelle 3.11). Für das MWC-Modell wurde ein Wert von $7,04 \times 10^{-4}$ ermittelt. Der χ^2 -Wert des Three-State-MWC-Modells lag bei $4,48 \times 10^{-4}$. Die Messwerte wurden somit bei Anwendung des Three-State-MWC-Modells von der Regression besser erfasst als beim MWC-Modell. Die folgenden Betrachtungen für die Effektoren Urat und Koffein wurden daher nur noch auf der Grundlage des Three-State-MWC-Modells durchgeführt.

Über die Formeln 2.22 konnte die prozentuale Verteilung der allosterischen Konformationen unter normoxischen ($P_{O_2} > 150$ Torr) und unter hypoxischen ($P_{O_2} < 1$ Torr) Bedingungen bestimmt werden. Unter Normoxie lag das mit Koffein oder Urat gesättigte Pigment zum überwiegenden Teil in der R_3 -Konformation vor (Koffein gesättigt: 86,03 %; Urat gesättigt: 90,09 %). In beiden Fällen war die T_3 -Form nicht vorhanden. Auf die S_3 -Konformation entfiel ein prozentualer Anteil von 9,91 beim mit Urat und 13,97 beim mit Koffein gesättigten Hämocyanin. Ohne die Liganden Urat oder Koffein lag das Makromolekül unter Normoxie zu 84,52 % in der R_3 -Konformation vor. Die S_3 -Konformation war zu 15,45 % und die T_3 -Form zu 0,04 % vorhanden. Sank der Sauerstoffpartialdruck unter einem Torr verschob sich das Konformationsverhältnis beim mit Urat gesättigten Hämocyanin zu Gunsten der T_3 -Form (79,60 %). Die P_{O_2} -Abnahme bewirkte beim mit Koffein gesättigten Makromolekül eine Verschiebung zur S_3 -Form (62,70 %). Die R_3 -Konformation war bei beiden fast nicht mehr vorhanden (Urat gesättigt: 0,49 %; Koffein gesättigt: 1,05 %). Auf die S_3 -Form entfielen 19,91 % beim Urat gesättigten Pigment und

auf die T_3 -Form entfielen 36,25 % beim Koffein gesättigten Pigment. Ohne die Liganden lag das Molekül zu 98,78 % in der T_3 -Konformation vor. 1,21 % entfielen auf die S_3 - und 0,02 % auf die R_3 -Konformation. Die prozentuale Verteilung der Konformationen ist aus Tabelle 3.12 ablesbar. Zu bedenken ist, dass die stark mit Fehlern behafteten Gleichgewichtskonstanten bei Berechnung der Konformationsverteilung mit den Formeln 2.22 einen großen Einfluss ausüben und zudem f_{R_3} , f_{S_3} und f_{T_3} sehr parameterempfindlich sind. Die berechnete prozentuale Konformationsverteilung kann daher nur als Tendenz verstanden werden.

Tabelle 3.12: Prozentuale Verteilung der allosterischen Untereinheiten des Hämocyanins von *Palinurus elephas* bei Anwendung des Three-State-MWC-Modells unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. Die Konformationsverteilung ist für das Hämocyanin ohne und mit den Liganden Urat oder Koffein angegeben. Die prozentuale Verteilung wurde mit den Formeln 2.22 für das Three-State-MWC-Modell berechnet.

P _{O₂}	> 150 Torr			< 1 Torr		
	Konformation	R_3	T_3	S_3	R_3	T_3
ohne Urat/Koffein	84,52 %	0,04 %	15,45 %	0,02 %	98,78 %	1,21 %
mit Urat	90,09 %	0 %	9,91 %	0,49 %	79,60 %	19,91 %
mit Koffein	86,03 %	0 %	13,97 %	1,05 %	36,25 %	62,70 %

In Tabelle 3.13 sind die Einflussfaktoren $W_{T_3}^{\text{eff}}$ und $W_{S_3}^{\text{eff}}$ für die Effektoren Urat und Koffein angegeben. Wie in Kapitel 2.7.1 dargestellt, charakterisieren $W_{T_3}^{\text{eff}}$ und $W_{S_3}^{\text{eff}}$ den Einfluss der Liganden auf die Sauerstoffbindung an das Hämocyanin durch Einwirkung auf die allosterischen Gleichgewichtskonstanten $L_{T_3}^{\text{eff}}$ und $L_{S_3}^{\text{eff}}$. Für den natürlichen Modulator Urat wurde $W_{T_3}^{\text{Urat}}$ mit $0,037 \pm 0,004$ und $W_{S_3}^{\text{Urat}}$ mit $0,549 \pm 0,068$ berechnet. Die Werte für den artifiziellen Effektor Koffein betragen $W_{T_3}^{\text{Koffein}} = 0,010 \pm 0,002$ und $W_{S_3}^{\text{Koffein}} = 0,933 \pm 0,084$.

Tabelle 3.13: Einflussfaktoren $W_{T_3}^{\text{Urat}}$, $W_{S_3}^{\text{Urat}}$, $W_{T_3}^{\text{Koffein}}$ und $W_{S_3}^{\text{Koffein}}$ der Modulatoren Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindung an das Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

Effektor	$W_{T_3}^{\text{eff}}$	$W_{S_3}^{\text{eff}}$
Urat	$0,037 \pm 0,004$	$0,549 \pm 0,068$
Koffein	$0,010 \pm 0,002$	$0,933 \pm 0,084$

In Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 wurden die Bindungskonstanten (k_{Urat} , k_{Koffein} , k_{hypUrat} , $k_{\text{hypKoffein}}$) für die Bindung des natürlichen Modulators Urat und seines artifiziellen Effektors Koffein an hexameres Hämocyanin unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bestimmt. Da die Konformationsverteilung der allosterischen Untereinheiten unter diesen Bedingungen bekannt ist (siehe Tabelle 3.12), können die berechneten Bindungskonstanten einer bestimmten Konformation zugeordnet werden. Hierbei wird unterstellt, dass die über die Bindungsisotherme berechnete Konstante für die unter den jeweiligen Bedingungen vorherrschende Konformation gilt. Über die berechneten Einflussfaktoren (vgl. Tabelle 3.13)

und unter Anwendung der Formeln 2.20 und 2.21 war es möglich, die Bindungskonstante für die Bindung des Liganden an die weder unter Hypoxie noch unter Normoxie dominierende Konformation (k_{trans}) zu berechnen. Bei mit Urat gesättigtem Hämocyanin lag die S_3 -Konformation weder unter Hypoxie noch unter Normoxie als Dominierende vor. Falls das Pigment mit Koffein gesättigt war, traf dies auf die T_3 -Konformation zu (vgl. Tabelle 3.12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 zusammengestellt.

Tabelle 3.14: Bindungskonstanten k , k_{hyp} und k_{trans} der Bindung von Urat und Koffein an das Hämocyanin der Europäischen Languste. k ist die Bindungskonstante der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation. Mit k_{hyp} ist die Konstante für die Bindung an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Form bezeichnet. k_{trans} gibt die Bindungsaffinität an die weder bei einem Sauerstoffpartialdruck von > 150 Torr noch bei einem P_{O_2} von < 1 Torr als dominierende Konformation vorliegende allosterische Untereinheit wieder. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$). In Spalte a , b und c sind die dazugehörigen Konformationen (R_3 , T_3 , S_3) angegeben.

Ligand	a	k [mM^{-1}]	b	k_{hyp} [mM^{-1}]	c	k_{trans} [mM^{-1}]
Urat	R_3	$27,37 \pm 4,18$	T_3	$16,13 \pm 2,90$	S_3	4,46
Koffein	R_3	$53,04 \pm 3,87$	S_3	$40,57 \pm 2,83$	T_3	4,40

Für die Bindung von Urat an die S_3 -Konformation, die weder bei einem Sauerstoffpartialdruck von mehr als 150 Torr noch bei einem von weniger als 1 Torr vorherrschend war, wurde ein Wert von $k_{\text{trans}}^{\text{Urat}} = 4,46 \text{ mM}^{-1}$ berechnet. Die Bindungskonstante für den artifiziellen Effektor Koffein an die T_3 -Konformation betrug $k_{\text{trans}}^{\text{Koffein}} = 4,40 \text{ mM}^{-1}$.

Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-Ionen als Liganden

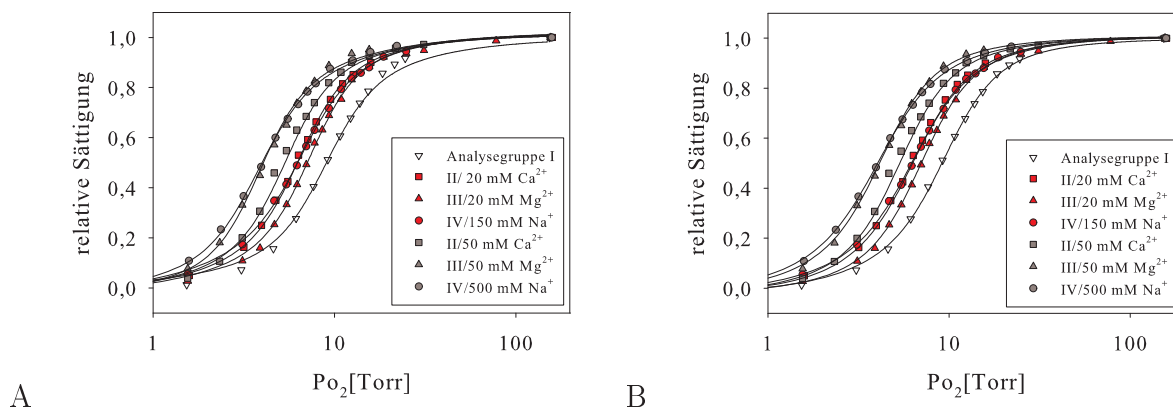


Abbildung 3.22: Sauerstoffbindung an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* innerhalb der Analysegruppen I bis IV. Die Sättigung des Hämocyanins wurde in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks bei 20 °C bestimmt. Die Kationenangaben in der Legende beziehen sich auf die Zusammensetzung der Tris-Puffer gegen die das Hämocyanin dialysiert wurde (vgl. Tabelle 2.4 II - IV). Die Daten wurden einer nichtlinearen Regression mit dem MWC-Modell (A) und dem Three-State-MWC-Modell (B) unterzogen.

In Abb. 3.22 sind die Sauerstoffbindungskurven gezeigt, die für hexamerer, Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-ionenfreies Hämocyanin der Europäischen Languste und für Hämocyaninlösun-

gen von *Palinurus elephas*, die mit Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Na^+ -Ionen angereichert waren, aufgenommen wurden (siehe Tabelle 2.1 Nr. 1 bis 7). Die Auswertung dieser Bindungskurven mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell erfolgte, wie in Kapitel 2.7.1 ausgeführt, in Analysegruppen. Die Zusammensetzung der Gruppen resultierte aus den Ergebnissen der isothermen titrationskalorimetrischen Untersuchungen. So zeigten die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber dem Hämocyanin von *Palinurus elephas*, welches zuvor gegen einen Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien Tris-Puffer oder einen Tris-Puffer, der diese Kationen in verschiedenen Kombinationen beinhaltet, dialysiert wurde (vgl. Kapitel 3.2.3). Da nicht auszuschließen ist, dass die Kationenanlagerung die Struktur des Hämocyanins derart verändert, dass Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften gegenüber Sauerstoff nicht mehr nur mit der Gleichgewichtsverschiebung zwischen den allosterischen Konformationen begründet werden können, wurde das Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreie Molekül separat analysiert (Analysegruppe I). Aus dem gleichen Grund wurden Hämocyaninlösungen, die gegen Tris-Puffer mit jeweils verschiedener Kationenzusammensetzung dialysiert wurden, in unterschiedliche Analysegruppen zusammengefasst (Analysegruppe II - IV). Auch hier variierten die bei den ITC-Versuchen gemessenen Wärmetönungen bei Injektion des gleichen Liganden in Hämocyaninlösungen mit differierender Kationenzusammensetzung (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Auswertung der Messdaten mit dem MWC-Modell führte für die Pigmentlösungen der Analysegruppen I bis IV zu dem in Tabelle 3.15 zusammengefassten Ergebnis.

Tabelle 3.15: χ^2 der Regression der Sauerstoffbindungskurven und Sauerstoffbindungskonstanten [Torr^{-1}] $k_{R_{\text{mwc}}}$ und $k_{T_{\text{mwc}}}$ der unterschiedlichen Analysegruppen g für das MWC-Modell. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.9 für das MWC-Modell berechnet. In Spalte Kationen ist die jeweilige Kationenzusammensetzung des Tris-Puffers angegeben, gegen den die Hämocyaninlösung dialysiert wurde. Die angegebenen Fehler entsprechen den in der Regressionsroutine berechneten Unsicherheiten der Parameter.

MWC-Modell				
g	Kationen	$k_{R_{\text{mwc}}}$ [Torr^{-1}]	$k_{T_{\text{mwc}}}$ [Torr^{-1}]	χ^2
I	ohne	$0,379 \pm 0,062$	$0,033 \pm 0,006$	$3,20 \times 10^{-4}$
II	20 mM Ca^{2+} 50 mM Ca^{2+}	$0,769 \pm 0,116$	$0,056 \pm 0,009$	$4,48 \times 10^{-4}$
III	20 mM Mg^{2+} 50 mM Mg^{2+}	$0,756 \pm 0,063$	$0,050 \pm 0,005$	$5,43 \times 10^{-4}$
IV	150 mM Na^+ 500 mM Na^+	$0,676 \pm 0,055$	$0,066 \pm 0,007$	$4,07 \times 10^{-4}$

Die Sauerstoffbindungskonstante für die R_{mwc} -Konformation betrug bei einer Hämocyaninlösung die gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde (Analysegruppe I) $0,379 \pm 0,062$ Torr^{-1} und unterschied sich signifikant von denen der Analysegruppen II bis IV. Zwischen diesen Gruppen konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Bindungskonstante

der R_{mwc} -Form aufgezeichnet werden. Bei Zugabe von Na^+ -Ionen zum Dialysepuffer lag $k_{R_{\text{mwc}}}^{\text{IV}}$ bei $0,676 \pm 0,055 \text{ Torr}^{-1}$. Sie betrug in Analysegruppe III $0,756 \pm 0,063 \text{ Torr}^{-1}$ und in Gruppe II $0,769 \pm 0,116 \text{ Torr}^{-1}$. Die Bindungskonstante der Sauerstoffbindung an die T_{mwc} -Konformation des Hämocyans ($k_{T_{\text{mwc}}}$) war in allen Analysegruppen signifikant geringer als $k_{R_{\text{mwc}}}$. Sie wies jedoch keinen signifikanten Unterschied bei Anlagerung der untersuchten ein- und zweiwertigen Ionen auf (Analysegruppen II - IV). Sie schwankte zwischen $0,050 \pm 0,005 \text{ Torr}^{-1}$ (Mg^{2+}), $0,056 \pm 0,009 \text{ Torr}^{-1}$ (Ca^{2+}) und $0,066 \pm 0,007 \text{ Torr}^{-1}$ (Na^+). Für Analysegruppe I wurde ein $k_{T_{\text{mwc}}}^{\text{I}}$ -Wert von $0,033 \pm 0,006 \text{ Torr}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert wies lediglich zur Analysegruppe IV einen signifikanten Unterschied auf. Die Sauerstoffbindungskonstanten der allosterischen Konformationen innerhalb der einzelnen Analysegruppen waren identisch. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die unterschiedlichen Konzentrationen der in einer Gruppe zusammengefassten Ionen lediglich auf das Gleichgewicht zwischen den allosterischen Formen des Hämocyansmoleküls auswirkten. In Tabelle A.3 des Anhangs sind die für die Datengruppen berechneten Gleichgewichtskonstanten ($L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$) erfasst und logarithmiert in Abb. 3.24 aufgetragen.

Die Sauerstoffbindungskurven der vier Analysegruppen (I - IV) wurden auch mit dem Three-State-MWC-Modell ausgewertet (Abb. 3.22 B). Dieses Modell geht im Unterschied zum MWC-Modell von drei möglichen allosterischen Formen aus, in denen das Makromolekül vorliegen kann. Jedem Zustand wird eine Sauerstoffbindungskonstante zugeordnet. Die berechneten Werte sind in Tabelle 3.16 dokumentiert. In der R_3 -Konformation betrug $k_{R_3}^{\text{II}}$ für die Analysegruppe II $1,284 \pm 0,423 \text{ Torr}^{-1}$, in Gruppe III lag die Konstante bei $1,764 \pm 0,442 \text{ Torr}^{-1}$ und in Gruppe IV berechnete sie sich mit $k_{R_3}^{\text{IV}} = 1,554 \pm 0,448 \text{ Torr}^{-1}$. Die k_{R_3} -Werte der drei Gruppen (II-IV) wichen nicht signifikant voneinander ab. Das gleiche galt für die Sauerstoffbindungskonstanten der allosterischen Konformationen T_3 und S_3 . Auch diese Bindungskonstanten variierten zwischen den Analysegruppen II bis IV nicht signifikant. k_{T_3} wurde für Gruppe II mit $0,015 \pm 0,025 \text{ Torr}^{-1}$, für Gruppe III mit $0,022 \pm 0,012 \text{ Torr}^{-1}$ und für Gruppe IV mit $0,043 \pm 0,016 \text{ Torr}^{-1}$ bestimmt. k_{S_3} lag bei $0,128 \pm 0,048 \text{ Torr}^{-1}$ in Analysegruppe II, bei $0,165 \pm 0,036 \text{ Torr}^{-1}$ in Analysegruppe III und bei $0,224 \pm 0,050 \text{ Torr}^{-1}$ in Gruppe IV. Die Bindungsparameter im Three-State-MWC-Modell konnten für die Bindungsdaten der Analysegruppe I nur mit hohen Ungenauigkeiten bestimmt werden. Statistisch wichen die ermittelten Werte daher nicht signifikant von denen, die für die Analysegruppen II bis IV berechnet wurden, ab. Für $k_{R_3}^{\text{I}}$ ergaben sich $1,074 \pm 0,784 \text{ Torr}^{-1}$, für $k_{T_3}^{\text{I}}$ $0,020 \pm 0,017 \text{ Torr}^{-1}$ und $k_{S_3}^{\text{I}}$ bestimmte sich mit $0,090 \pm 0,036 \text{ Torr}^{-1}$. Die Gleichgewichtskonstanten L_{T_3} und L_{S_3} wurden für jede Datengruppe innerhalb der Analysegruppen berechnet (siehe Anhang Tabelle A.3) und logarithmiert in Abb. 3.25 dargestellt.

Die aufgenommenen Sauerstoffbindungskurven konnten mit beiden Modellen ausgewertet werden. Um die Güte der Regression beurteilen und das MWC-Modell mit dem Three-

Tabelle 3.16: χ^2 der Regression der Sauerstoffbindungskurven und Sauerstoffbindungskonstanten [Torr⁻¹] k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} der unterschiedlichen Analysegruppen g für das Three-State-MWC-Modell. In Spalte Kationen ist die jeweilige Kationenzusammensetzung des Tris-Puffers angegeben gegen den die Hämocyaninlösung dialysiert wurde. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.17 für das Three-State-MWC-Modell berechnet. Die angegebenen Fehler entsprechen den in der Regressionsroutine berechneten Unsicherheiten der Parameter.

Three-State-MWC-Modell					
g	Kationen	k_{R_3} [Torr ⁻¹]	k_{T_3} [Torr ⁻¹]	k_{S_3} [Torr ⁻¹]	χ^2
I	ohne	1,074 ± 0,784	0,020 ± 0,017	0,090 ± 0,036	3,08 x 10 ⁻⁴
II	20 mM Ca ²⁺ 50 mM Ca ²⁺	1,284 ± 0,423	0,015 ± 0,025	0,128 ± 0,048	4,05 x 10 ⁻⁴
III	20 mM Mg ²⁺ 50 mM Mg ²⁺	1,764 ± 0,442	0,022 ± 0,012	0,165 ± 0,036	3,91 x 10 ⁻⁴
IV	150 mM Na ⁺ 500 mM Na ⁺	1,554 ± 0,448	0,043 ± 0,016	0,224 ± 0,050	3,36 x 10 ⁻⁴

State-MWC-Modell vergleichen zu können, wurden für jede Analysegruppe die χ^2 -Werte berechnet. Die Werte ergeben sich aus Tabelle 3.15 und 3.16. Für alle Analysegruppen waren die χ^2 -Werte des MWC-Modells höher als die des Three-State-MWC-Modells. Die Messdaten konnten in den Analysegruppen I bis IV durch eine nichtlineare Regression mit dem Three-State-MWC-Modell somit besser erfasst werden.

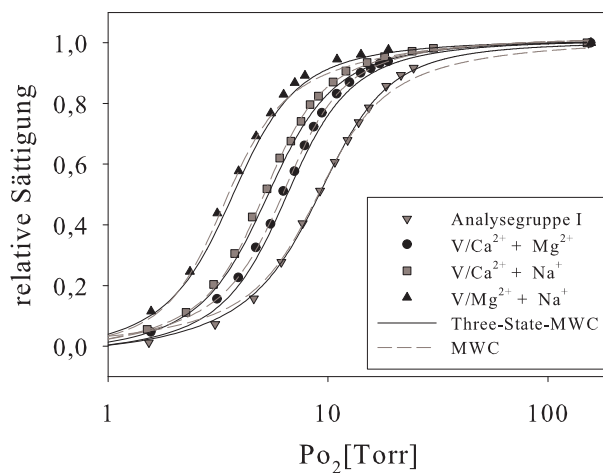


Abbildung 3.23: Sauerstoffbindung an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* innerhalb der Analysegruppe V. Die Sättigung des Hämocyanins wurde in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks bei 20 °C bestimmt. Zum direkten Vergleich wurden die Bindungsdaten der Analysegruppe I in die Abbildung aufgenommen. Die Kationenangabe in der Legende bezieht sich auf die Zusammensetzung der Tris-Puffer gegen die das Hämocyanin dialysiert wurde (siehe Tabelle 2.4 V). Die Daten wurden einer nichtlinearen Regression mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell unterzogen.

Abb. 3.23 zeigt die Sauerstoffbindungskurven von Hämocyaninlösungen der Analysegruppe V. In dieser Gruppe sind alle Pigmentlösungen zusammengefasst, die gegen einen Tris-Puffer dialysiert wurden, der jeweils zwei der drei untersuchten Kationen beinhaltet

(siehe Tabelle 2.4). In den Analysegruppen II bis IV sind Pigmentlösungen zusammengefasst, die gegen einen Tris-Puffer dialysiert wurden, dem eines der untersuchten Kationen zugegeben war. Die Analysegruppe VI beinhaltet Hämocyaninlösungen, die gegen Tris-Puffer dialysiert wurden, denen alle drei Kationen zugegeben waren. Die Auswertung der Messdaten der Analysegruppen II bis IV und VI über eine nichtlineare Regression mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Berechnung der Sauerstoffbindungskonstanten $k_{R_{\text{mwc}}}$, $k_{T_{\text{mwc}}}$, k_{R_3} , k_{T_3} , k_{S_3} (siehe Tabelle 3.11, Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16). Es wurde davon ausgegangen, dass auch Hämocyaninlösungen, die gegen Tris-Puffer mit zwei der untersuchten Kationen dialysiert wurden, keine signifikanten Unterschiede in den Sauerstoffbindungskonstanten untereinander aufweisen. Entsprechende Pigmentlösungen wurden daher in Analysegruppe V zusammengefasst. Hierdurch konnte zudem eine Regression mit der besten Anpassung an die Messdaten ermöglicht werden. Das Ergebnis bei Anwendung des MWC-Modells ist in Tabelle 3.17 erfasst. $k_{R_{\text{mwc}}}^V$ betrug $0,883 \pm 0,066 \text{ Torr}^{-1}$, $k_{T_{\text{mwc}}}^V$ wurde mit $0,053 \pm 0,005 \text{ Torr}^{-1}$ berechnet. Beide Parameter wichen nicht signifikant von den für die übrigen Analysegruppen ermittelten Werten ab. Bei Auswertung der Messdaten mit dem Three-State-MWC-Modell ergaben sich mit $k_{R_3}^V = 1,822 \pm 0,395 \text{ Torr}^{-1}$, $k_{T_3}^V = 0,025 \pm 0,012 \text{ Torr}^{-1}$ und $k_{S_3}^V = 0,186 \pm 0,044 \text{ Torr}^{-1}$ für die Sauerstoffbindungskonstanten keine signifikanten Unterschiede zu den ermittelten Werten der Analysegruppen II bis IV und VI. Die Messdaten konnten mit dem Three-State-MWC-Modell besser beschrieben werden, der χ^2 -Wert lag bei $3,72 \times 10^{-4}$. Für das MWC-Modell wurde ein χ^2 -Wert von $4,65 \times 10^{-4}$ berechnet.

Tabelle 3.17: χ^2 der Regression der Sauerstoffbindungskurven und Sauerstoffbindungskonstanten [Torr⁻¹] $k_{R_{\text{mwc}}}$, $k_{T_{\text{mwc}}}$, k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} der Analysegruppe V für das MWC-Modell und das Three-State-MWC-Modell. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.9 für das MWC-Modell und mit Formel 2.17 für das Three-State-MWC-Modell berechnet. Die angegebenen Fehler entsprechen den in der Regressionsroutine berechneten Unsicherheiten der Parameter.

	MWC		Three-State-MWC
χ^2	$4,65 \times 10^{-4}$	χ^2	$3,72 \times 10^{-4}$
$k_{R_{\text{mwc}}}^V$	$0,883 \pm 0,066 \text{ Torr}^{-1}$	$k_{R_3}^V$	$1,822 \pm 0,395 \text{ Torr}^{-1}$
$k_{T_{\text{mwc}}}^V$	$0,053 \pm 0,005 \text{ Torr}^{-1}$	$k_{T_3}^V$	$0,025 \pm 0,012 \text{ Torr}^{-1}$
		$k_{S_3}^V$	$0,186 \pm 0,044 \text{ Torr}^{-1}$

Zur weiteren Charakterisierung der Sauerstoffbindungskurven mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell wurden die Gleichgewichtskonstanten, wie zuvor schon erwähnt, für die einzelnen Datengruppen innerhalb der Analysegruppen I bis VI berechnet (siehe Anhang Tabelle A.1, A.2 und A.3). Da die Sauerstoffbindungskonstanten ($k_{R_{\text{mwc}}}$, $k_{T_{\text{mwc}}}$, k_{R_3} , k_{T_3} , k_{S_3}) der einzelnen Datengruppen einer Analysegruppe identisch sind, kann eine Veränderung der Sauerstoffaffinität (P_{50}) in der Analysegruppe nur aus der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den allosterischen Konformationen herrühren (Menze et al., 2005). Gleiches gilt für nicht signifikant unterschiedliche Sauerstoffbindungs-

konstanten verschiedener Analysegruppen. Auch hier kann eine signifikante Veränderung im P_{50} nur über eine Gleichgewichtsverschiebung zwischen den allosterischen Konformationen erklärt werden.

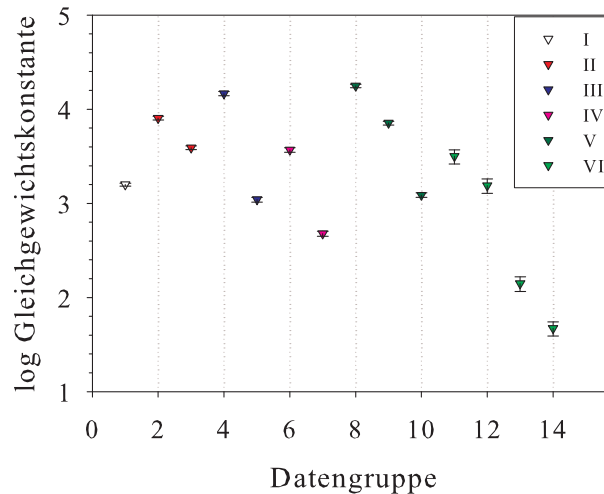


Abbildung 3.24: Logarithmierte Gleichgewichtskonstanten (L_{mwc}^{eff}) des MWC-Modells für die einzelnen Datengruppen der Analysegruppen I bis VI (siehe Tabelle 2.4). Die Beschriftung der x-Achse ist ein Synonym für die unterschiedlichen Datengruppen innerhalb der Analysegruppen. Datengruppen: 1 = Analysegruppe I; 2 = Analysegruppe II/ + 20 mM $CaCl_2$; 3 = Analysegruppe II/ + 50 mM $CaCl_2$; 4 = Analysegruppe III/ + 20 mM $MgCl_2$; 5 = Analysegruppe III/ + 50 mM $MgCl_2$; 6 = Analysegruppe IV/ + 150 mM $NaCl$; 7 = Analysegruppe IV/ + 500 mM $NaCl$; 8 = Analysegruppe V/ + 20 mM $CaCl_2$ + 50 mM $MgCl_2$; 9 = Analysegruppe V/ + 20 mM $CaCl_2$ + 500 mM $NaCl$; 10 = Analysegruppe V/ + 50 mM $MgCl_2$ + 500 mM $NaCl$; 11 = Analysegruppe VI/ + 150 mM $NaCl$ + 20 mM $CaCl_2$ + 20 mM $MgCl_2$; 12 = Analysegruppe VI/ + 500 mM $NaCl$ + 20 mM $CaCl_2$ + 50 mM $MgCl_2$; 13 = Analysegruppe VI/+ Urat; 14 = Analysegruppe VI/ + Koffein. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

In Abb. 3.24 sind die berechneten Gleichgewichtskonstanten (L_{mwc}^{eff}) des MWC-Modells für die einzelnen Datengruppen logarithmiert aufgetragen. Die Werte lagen zwischen 1,67 und 4,25. Als Referenzwert wurde die Gleichgewichtskonstante der Analysegruppe I betrachtet. In Analysegruppe I sind alle Hämocyaninlösungen zusammengefasst, die gegen einen 100 mM Tris/HCl-Puffer ohne die untersuchten Liganden dialysiert wurden (siehe Tabelle 2.4). Die Gleichgewichtskonstanten aller Datengruppen in Analysegruppe II waren zum Referenzwert (L_{mwc}^I) signifikant erhöht. In den restlichen Analysegruppen (III - VI) befand sich immer eine Datengruppe deren L_{mwc}^{eff} keinen signifikanten Unterschied zu L_{mwc}^I aufwies. Hingegen wiesen die berechneten Halbsättigungsdrücke der unterschiedlichen Datengruppen alle signifikante Unterschiede zum P_{50} der Analysegruppe I auf (vgl. Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Innerhalb der Analysegruppen II bis V unterschieden sich die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Datengruppen signifikant. Der jeweilige L_{mwc}^{eff} nahm mit Erhöhung der Ionenstärke ab. Die P_{50} -Werte der verschiedenen Datengruppen in Analysegruppe II unterschieden sich allerdings nicht signifikant voneinander. In Analysegruppe VI bewirkte die Bindung des natürlichen Modulators Urat oder des artifiziiellen Effektors Koffein eine

signifikante Reduzierung des $L_{\text{mwc}}^{\text{VI}}$ im Vergleich zum Hämocyanin ohne beide Liganden. $L_{\text{mwc}}^{\text{VI Urat}}$ und $L_{\text{mwc}}^{\text{VI Koffein}}$ unterschieden sich nicht signifikant. Die Halbsättigungsdrücke P_{50}^{Urat} und P_{50}^{Koffein} wiesen hingegen signifikante Unterschiede auf. Die hier aufgezeigten Differenzen zu den Charakterisierungsgrößen der Sauerstoffbindung sind darauf zurückzuführen, dass die Gleichgewichtskonstanten während der Regression nur mit großen Ungenauigkeiten bestimmt werden konnten.

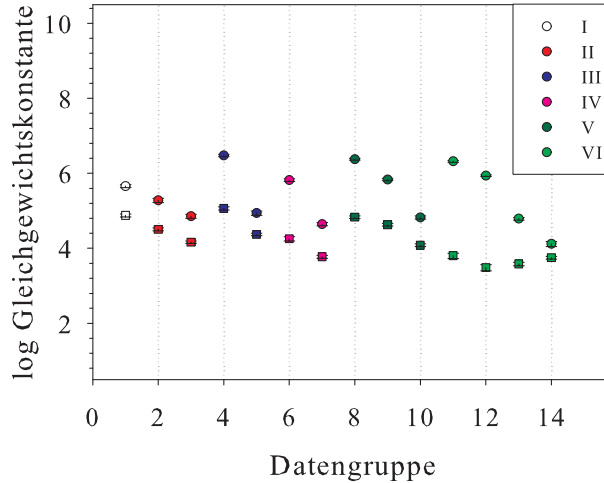


Abbildung 3.25: Logarithmierte Gleichgewichtskonstanten $L_{T_3}^{\text{eff}}$ (●) und $L_{S_3}^{\text{eff}}$ (■) des Three-State-MWC-Modells für die einzelnen Datengruppen der Analysegruppen I bis VI (siehe Tabelle 2.4). Die Beschriftung der x-Achse ist ein Synonym für die unterschiedlichen Datengruppen innerhalb der Analysegruppen. Datengruppen: 1 = Analysegruppe I; 2 = Analysegruppe II/ + 20 mM CaCl_2 ; 3 = Analysegruppe II/ + 50 mM CaCl_2 ; 4 = Analysegruppe III/ + 20 mM MgCl_2 ; 5 = Analysegruppe III/ + 50 mM MgCl_2 ; 6 = Analysegruppe IV/ + 150 mM NaCl ; 7 = Analysegruppe IV/ + 500 mM NaCl ; 8 = Analysegruppe V/ + 20 mM CaCl_2 + 50 mM MgCl_2 ; 9 = Analysegruppe V/ + 20 mM CaCl_2 + 500 mM NaCl ; 10 = Analysegruppe V/ + 50 mM MgCl_2 + 500 mM NaCl ; 11 = Analysegruppe VI/ + 150 mM NaCl + 20 mM CaCl_2 + 20 mM MgCl_2 ; 12 = Analysegruppe VI/ + 500 mM NaCl + 20 mM CaCl_2 + 50 mM MgCl_2 ; 13 = Analysegruppe VI/ + Urat; 14 = Analysegruppe VI/ + Koffein. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

Die berechneten Gleichgewichtskonstanten $L_{T_3}^{\text{eff}}$ und $L_{S_3}^{\text{eff}}$ für das Three-State-MWC-Modell sind logarithmiert für die Datengruppen der Analysegruppen I bis VI in Abb. 3.25 aufgetragen. Die $L_{T_3}^{\text{eff}}$ -Werte lagen zwischen 4,12 und 6,48 und die $L_{S_3}^{\text{eff}}$ -Werte zwischen 3,49 und 5,06. Insgesamt war $L_{T_3}^{\text{eff}}$, die Gleichgewichtskonstante die das Verhältnis der T_3 -Form zur R_3 -Form charakterisiert, in den einzelnen Datengruppen größer als $L_{S_3}^{\text{eff}}$. Bei Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem Three-State-MWC-Modell wiesen die Sauerstoffbindungskonstanten k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} der Analysegruppen I bis VI keine signifikanten Unterschiede auf. Die signifikant differierenden P_{50} -Werte basieren hier lediglich auf einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den unterschiedlichen Konformationen (Menze et al., 2005). Wie zuvor schon bei der Beschreibung der $L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$ -Werte dienten die Gleichgewichtskonstanten der Analysegruppe I als Referenzwerte. Die Halbsättigungswerte aller Datengruppen unterschieden sich signifikant von dem der Analysegruppe I (siehe Kapitel

3.3.1 und 3.3.2). Auch die $L_{T_3}^{\text{eff}}$ -Werte aller Datengruppen innerhalb der Analysegruppe VI unterschieden sich signifikant von denen der Analysegruppe I. Die übrigen Analysegruppen (II bis V) wiesen jeweils eine Datengruppe auf, die nicht signifikant unterschiedlich in ihrem $L_{T_3}^{\text{eff}}$ -Wert zum $L_{T_3}^{\text{I}}$ war. Die Gleichgewichtskonstante $L_{S_3}^{\text{eff}}$, die das Verhältnis der S_3 - zur R_3 -Konformation beschreibt, zeigte signifikante Unterschiede aller Datengruppen der Analysegruppen II bis IV und VI zur Analysegruppe I. Lediglich eine Datengruppe innerhalb der Analysegruppe V wies keine signifikante Differenz zum $L_{S_3}^{\text{I}}$ auf. Jedoch war hier der $L_{T_3}^{\text{eff}}$ -Wert der Datengruppe zum $L_{T_3}^{\text{I}}$ -Wert signifikant unterschiedlich.

Die $L_{T_3}^{\text{eff}}$ - und $L_{S_3}^{\text{eff}}$ -Werte der einzelnen Datengruppen innerhalb der Analysegruppen III und V unterschieden sich signifikant. Die berechneten Werte verminderten sich jeweils bei Erhöhung der Ionenstärke. Keinen signifikanten Unterschied wiesen die $L_{S_3}^{\text{eff}}$ -Werte innerhalb der Analysegruppe IV auf. Hingegen unterschieden sich die $L_{T_3}^{\text{eff}}$ -Werte dieser Analysegruppe signifikant voneinander. Desgleichen unterschieden sich die P_{50} -Werte innerhalb der Analysegruppen III bis V signifikant. Lediglich der Halbsättigungsdruck innerhalb der Analysegruppe II veränderte sich nicht signifikant (siehe Tabelle 3.8 b 2 u. b 3). So auch die $L_{T_3}^{\text{eff}}$ - und $L_{S_3}^{\text{eff}}$ -Werte der Analysegruppe II, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Durch Bindung der Effektoren Urat oder Koffein ans Hämocyanin von *Palinurus elephas* verminderte sich $L_{T_3}^{\text{VI}}$ signifikant, die $L_{S_3}^{\text{VI}}$ -Werte veränderten sich nicht signifikant. Sowohl $L_{T_3}^{\text{VI}}$ für Koffein und $L_{T_3}^{\text{VI}}$ für Urat als auch die entsprechenden $L_{S_3}^{\text{VI}}$ -Werte, wichen, trotz signifikant unterschiedlicher Halbsättigungswerte, nicht signifikant voneinander ab. So konnten bei Anwendung des Three-State-MWC-Modells die Gleichgewichtskonstanten nur mit großer Streuung bestimmt werden, was zu den Differenzen mit den Ergebnissen aus den Sauerstoffbindungsstudien führte. Insgesamt jedoch stimmten die Ergebnisse aus der Berechnung der Halbsättigungsdrücke mit denen aus der Regression der Sauerstoffbindungskurven über das Three-State-MWC-Modell besser überein als aus der Regression mit dem MWC-Modell.

4

Diskussion

Das Hämocyanin der Arthropoden besitzt dem Sauerstoff gegenüber ein ausgeprägt kooperatives Bindungsverhalten. So wurden Hill-Koeffizienten von bis zu neun beschrieben (van Holde et al., 2001). Die Sauerstoffbindung wird zudem durch eine Vielzahl anorganischer und organischer Effektoren in ihrer Affinität beeinflusst. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das Hämocyanin hervorragend zur Aufklärung allosterischer Wechselwirkungen und zur Weiterentwicklung allosterischer Modellvorstellungen.

Aus Ergebnissen von Sauerstoffbindungsstudien mit Hämoglobin entwickelten Monod et al. (1965) ein einfaches allosterische Modell, das MWC-Modell. Es diente als Grundlage für die Entstehung komplexerer allosterischer Modelle, so z.B. dem Three-State-MWC-Modell von Minton und Imai (1974) und dem Nested-MWC-Modell von Robert et al. (1987). In Kombination mit Sauerstoffbindungsstudien können isotherme titrationskalorimetrische Untersuchungen einen zusätzlichen Beitrag zum Verständnis allosterischer Wechselwirkungen durch die Charakterisierung der Ligandenbindung leisten. So ermöglichen thermodynamische Analysen die Bestimmung der freien Enthalpie einer Ligandenbindung (ΔG^0) und die Berechnung enthalpischer (ΔH^0) und entropischer (ΔS^0) Beiträge am Bindungsprozess.

Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins wird durch organische Modulatoren wie Urat und seinem Struktur analogon Koffein, bei gleichzeitiger Reduzierung der Kooperativität, erhöht (Nies et al., 1992; Zeis et al., 1992). Zudem haben anorganische Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} einen affinitätssteigernden Einfluss auf die Sauerstoffbindung des Transportpigments (Larimer und Riggs, 1964). Die innere Ionenzusammensetzung der meisten aquatischen Lebewesen kann durch eine ständig sich verändernde Umwelt beeinflusst werden (Bridges, 2001). Es ist daher von besonderem Interesse, das Zusammenspiel der anorganischen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen unter thermodynamischen Gesichtspunkten und allosterischen Modellvorstellungen zu betrachten. So können Rückschlüsse auf die Auswirkung von Veränderungen im inneren Ionenmilieu auf die Sauerstoffversorgung der Gewebe

gezogen werden. Ein Vergleich der untersuchten Liganden unter physiologischen Gesichtspunkten gibt Einblicke in die unterschiedlichen allosterischen Kontrollmechanismen zur effektiven Sauerstoffversorgung der Gewebe.

4.1 Bindung von Urat und Koffein

Die Bindung des natürlichen Modulators Urat und des artifiziellen Effektors Koffein an das Hämocyanin der Europäischen Languste wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie bei 20 °C untersucht. Die Bindungsisotherme wurden für hexameres und in seine monomeren Untereinheiten zerfallenes Hämocyanin unter normoxischen Bedingungen aufgenommen. Zudem wurde der Sauerstoffeinfluss auf die Bindungseigenschaften der Effektoren für hexameres Hämocyanin betrachtet.

Bei Titration der Liganden in eine monomere Hämocyaninlösung von *Palinurus elephas* wurden keine Wärmesignale aufgezeichnet (vgl. Abb. 3.9). Erst die Injektion der Effektoren in eine hexamere Hämocyaninlösung erzeugte messbare Wärmesignale. Die Aggregation der Hämocyaninuntereinheiten zu hexameren Komplexen ist somit eine wesentliche Voraussetzung für die Bindung des natürlichen Modulators Urat und seines Strukturanalogs Koffein. Durch die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten wird eine entsprechende Bindungstasche ausgebildet, an der die Liganden Urat und Koffein binden können. Dass es sich bei der Uratbindungsstelle um eine Bindungstasche handelt, an der mehrere Untereinheiten des Hämocyanins beteiligt sind, vermutete auch Zeis (1994) im Rahmen ihrer Untersuchungen mit dem Hämocyanin des Europäischen Hummers.

Das natürlich vorkommende Urat und das strukturverwandte Koffein nehmen identische Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas* ein. Dies konnte anhand von Verdrängungsexperimenten, in denen das Hämocyanin mit Urat oder Koffein gesättigt vorlag und der andere Ligand hinzutitriert wurde, gezeigt werden (vgl. Abb. 3.7). Auch beim Europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*) stellten Nies et al. (1992) fest, dass beide Effektoren um die Bindungsstelle am Pigment konkurrieren und deshalb gebundenes Koffein eine Uratbindung verhindert. Die von Zeis (1994) beobachtete Verdrängung des Urats aus der Bindungstasche durch das Koffein konnte hingegen nicht bestätigt werden. Beim Hämocyanin von *Palinurus elephas* wird vermutlich durch die Uratbindung die Molekülstruktur derart verändert, dass Koffein sterisch an der Besetzung des Bindungsplatzes gehindert wird. So könnte durch die Uratbindung die Öffnung der Bindungstasche verkleinert oder verschlossen werden.

Die Regressionsanalyse der unter Normoxie aufgenommenen Koffeinbindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell ergab eine Stöchiometrie von $n_{\text{Koffein}} = 1,90 \pm 0,15$ (vgl. Tabelle 3.2). Die Auswertung der Uratbindungsisotherme war ohne Festsetzung der

Anzahl der Bindungsplätze nicht möglich, da die Parameter aufgrund der geringeren Affinität des Urats zum Hämocyanin untereinander korrelierten. Entsprechend der Stöchiometrie des Koffein wurde $n_{\text{Urat}} = 2$ konstant gesetzt. Wie aus Abb. 4.1 ersichtlich lag die Bindungskonstante für Urat mit $k_{\text{Urat}} = 27,37 \pm 4,18 \text{ mM}^{-1}$ signifikant unter der Koffeinbindungskonstante ($k_{\text{Koffein}} = 53,04 \pm 3,87 \text{ mM}^{-1}$). Die Werte für die Bindungsenthalpie ($\Delta H_{\text{Urat}}^0 = -36,01 \pm 1,98 \text{ kJ mol}^{-1}$), Bindungsentropie ($T\Delta S_{\text{Urat}}^0 = -11,09 \pm 2,36 \text{ kJ mol}^{-1}$) und freien Reaktionsenthalpie ($\Delta G_{\text{Urat}}^0 = -24,92 \pm 0,39 \text{ kJ mol}^{-1}$) der Uratbindung lagen signifikant über denen einer Koffeinbindung (vgl. Abb. 4.3). Letztere wurden mit $\Delta H_{\text{Koffein}}^0 = -57,07 \pm 2,42 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{Koffein}}^0 = -30,44 \pm 2,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta G_{\text{Koffein}}^0 = -26,63 \pm 0,18 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet. Die geringere Bindungsaffinität des Urats im Vergleich zum Koffein kann darauf zurückgeführt werden, dass Koffein durch die drei Methylgruppen am Xanthingerüst hydrophober und ungeladener ist als Urat (Pott, 2006). So konnte Pott anhand von kalorimetrischen Versuchen mit Xanthinderivaten zeigen, dass die Methylgruppen am Xanthingerüst eine Bindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers begünstigten.

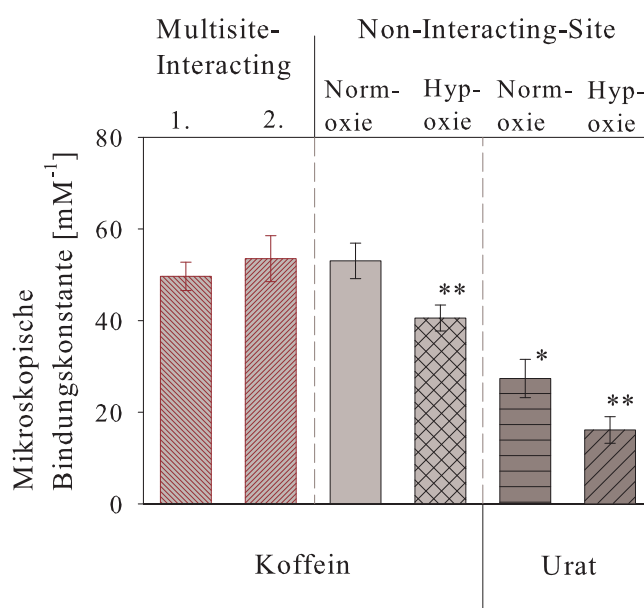


Abbildung 4.1: Mikroskopische Bindungskonstanten für die Bindung von Koffein und Urat an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell für Koffein und Urat unter Normoxie und Hypoxie und mit dem Multisite-Interacting-Modell für Koffein unter Normoxie. 1. = erster Bindungsplatz; 2. = zweiter Bindungsplatz ($X \pm \text{SD}$). *: Signifikanter Unterschied der Uratbindungskonstante zur Koffeinbindungskonstante unter Normoxie, berechnet mit dem Non-Interacting-Site-Modell. **: Signifikanter Unterschied der unter hypoxischen Bedingungen bestimmten Bindungskonstanten zu denen unter Normoxie bestimmten, berechnet mit dem Non-Interacting-Site-Modell.

Als weitere Möglichkeiten der Regressionsanalyse standen das Multisite-Interacting-Modell und das Two-Sets-of-Sites-Modell zur Verfügung. Letzteres setzt voraus, dass zwei unterschiedliche Bindungsplatztypen vorliegen. Eine Auswertung der Bindungsisotherme

mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell war aber bei beiden Liganden nicht möglich. Die ermittelte Stöchiometrie von zwei bezieht sich dementsprechend auf nur einen Bindungsplatztyp, im Unterschied zum Hämocyanin des *Homarus vulgaris*, für den zwei allosterische und zwei nicht-allosterische Uratbindungsstellen beschrieben wurden (Menze et al., 2005).

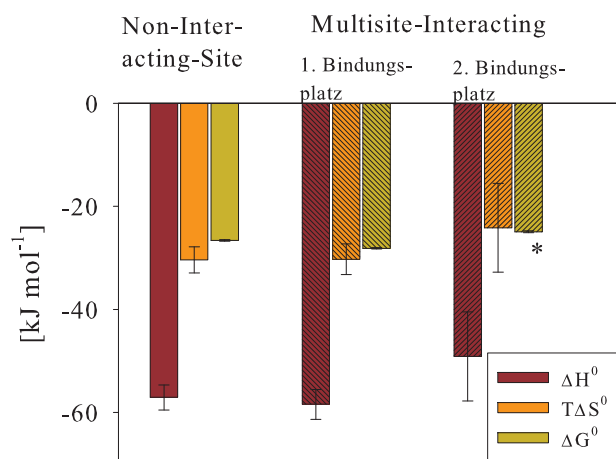


Abbildung 4.2: Bindungsenthalpie (ΔH^0), Bindungsentropie ($T\Delta S^0$) und freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) der Bindung von Koffein an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter normoxischen Bedingungen. Die Auswertung der Bindungsisotherme erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell und dem Multisite-Interacting-Modell. ($X \pm SD$) *: Signifikanter Unterschied des Bindungsparameters für den zweiten Bindungsplatz zum ersten Bindungsplatz, berechnet mit dem Multisite-Interacting-Modell.

Die Koffeinbindungsisotherme konnten mit dem Multisite-Interacting-Modell ausgewertet werden. Eine Regressionsanalyse mit diesem Modell ermöglicht die Auswertung unter Einbeziehung homotroper Allosterie. Abb. 4.1 zeigt, dass die mikroskopischen Bindungskonstanten für die Bindung des Liganden an den ersten und zweiten Bindungsplatz mit $k_{1\text{Koffein}} = 49,66 \pm 3,10 \text{ mM}^{-1}$ und $k_{2\text{Koffein}} = 53,52 \pm 5,01 \text{ mM}^{-1}$ keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Hiernach band Koffein nicht kooperativ an seine beiden Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas*. In Abb. 4.2 sind die Bindungsenthalpie (ΔH^0), Bindungsentropie ($T\Delta S^0$) und freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) für beide Bindungsstellen aufgetragen. Lediglich die freie Energie des ersten Bindungsschritts lag mit $\Delta G_{1\text{Koffein}}^0 = -28,16 \pm 0,12 \text{ kJ mol}^{-1}$ um 12 % unter der des Zweiten ($\Delta G_{2\text{Koffein}}^0 = -24,94 \pm 0,16 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die übrigen thermodynamischen Parameter der beiden Bindungsstellen wichen nicht signifikant voneinander ab (vgl. Tabelle 3.3). So konnte auch die erstmals von Fisher und Tally (1997) beschriebene isoergonische Kooperativität ausgeschlossen werden. Die isoergonische Kooperativität beschreibt den Fall, dass die Bindungskonstanten der sukzessiven Bindungsschritte eines Liganden an ein homotrop allosterisches Makromolekül nahezu identisch sind, die entsprechenden Bindungsenthalpien (ΔH^0) und Entropien (ΔS^0) sich hingegen signifikant unterscheiden. Eine Auswertung der Uratbindungsisotherme mit dem Multisite-Interacting-Modell war, aufgrund der im Vergleich zum Liganden

Koffein geringeren Affinität zum Hämocyanin und der dadurch bedingten verminderten Wärmetönung, nicht möglich.

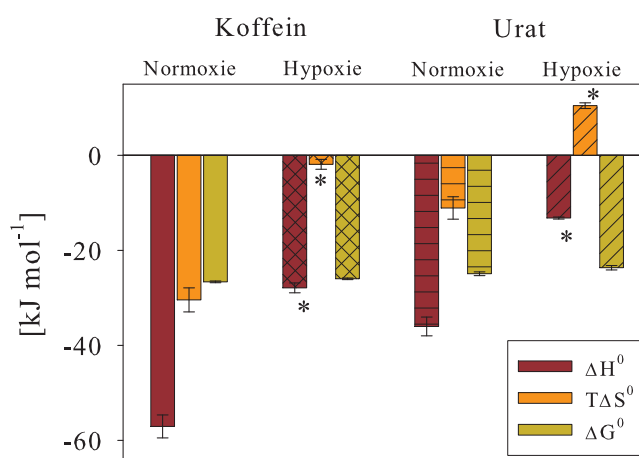


Abbildung 4.3: Bindungsenthalpie (ΔH^0), Bindungsentropie ($T\Delta S^0$) und freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) der Bindung von Koffein und Urat an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Auswertung der Bindungsisotherme erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell. ($\bar{X} \pm \text{SD}$). *: Signifikanter Unterschied der unter Hypoxie bestimmten Bindungsparameter zu den normoxischen Werten.

Eine weitere Affinitätsreduzierung trat unter Hypoxie ein. Die berechneten Bindungsparameter für die Bindung der Liganden unter Normoxie und Hypoxie sind in Abb. 4.1 und Abb. 4.3 zusammengestellt. Die verminderte Wärmetönung bewirkte eine erhöhte Korrelation der Parameter untereinander, sodass eine Auswertung der Bindungsisotherme nur mit dem Non-Interacting-Site-Modell und bei konstanter Stöchiometrie möglich war. Die Untersuchungen am Hämocyanin des Europäischen Hummers zeigten, dass die sauerstofffreie Atmosphäre keine Auswirkung auf die Anzahl der Bindungsplätze hat (Menze, 2001; Pott, 2006). Die Stöchiometrie wurde daher entsprechend der unter Normoxie bestimmten mit zwei konstant gesetzt. Die Bindungskonstante der Koffeinbindung verminderte sich um ca. 25 % auf $k_{\text{hypKoffein}} = 40,57 \pm 2,83 \text{ mM}^{-1}$, die der Uratbindung um ca. 40 % auf $k_{\text{hypUrat}} = 16,13 \pm 2,90 \text{ mM}^{-1}$ im Vergleich zu den normoxischen Werten (siehe Tabelle 3.2 u. 3.4). ΔH_{hyp}^0 reduzierte sich unter Hypoxie um ca. 50 % auf $-27,89 \pm 1,04 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei Bindung von Koffein, die Bindungsenthalpie der Uratbindung ermäßigte sich um ca. 63 % auf $-13,20 \pm 0,21 \text{ kJ mol}^{-1}$. Lediglich die freie Reaktionsenthalpie unterschied sich bei beiden Ligandenbindungen mit und ohne Sauerstoffeinfluss nicht signifikant voneinander. Letzteres ist auf die Entropie-Enthalpie-Kompensation zurückzuführen, auf die in Kapitel 4.5 noch näher eingegangen wird.

4.2 Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen

Die Bindungsstellen der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurden thermodynamisch mittels ITC an aggregiertem und in seine Untereinheiten zer-

fallenem Protein charakterisiert. Einblicke in das Zusammenspiel der divalenten Kationen sollten Versuche gewähren, für die das hexamere Hämocyanin gegen Tris-Puffer mit unterschiedlicher Kationenzusammensetzung dialysiert wurde (vgl. Tabelle 2.2 *d* und *e*). Zudem wurde der Sauerstoffeinfluss auf die Bindungseigenschaften an monomerem Hämocyanin untersucht.

4.2.1 Hexamerer Hämocyanin

Gemeinsame Bindungsplätze der Kationen

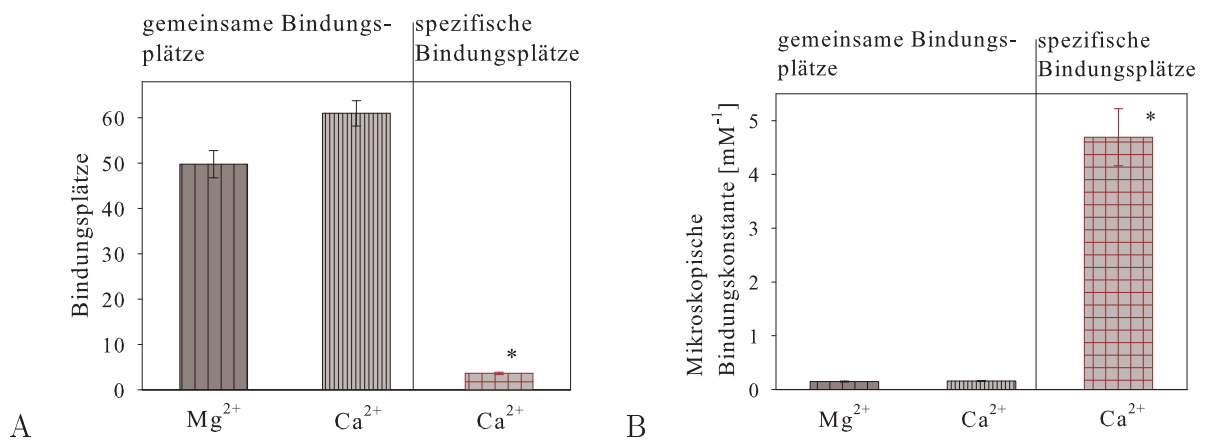


Abbildung 4.4: A: Anzahl der Bindungsplätze von Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen an das Hämocyanin von *Palinurus elephas*, das gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) dialysiert wurde (gemeinsame Bindungsplätze) und Anzahl der Bindungsplätze von Ca²⁺-Ionen an Hämocyanin, das gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) + 50 mM MgCl₂ dialysiert wurde (spezifische Bindungsplätze). B: Mikroskopische Bindungskonstante der Bindung von Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen an die gemeinsamen Bindungsplätze und mikroskopische Bindungskonstante der Bindung von Ca²⁺-Ionen an die spezifischen Bindungsplätze. Die Auswertung der Bindungsisotherme erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell. (X±SD). *: signifikanter Unterschied der für die spezifischen Bindungsplätze berechneten Parametern zu den übrigen Werten.

Das Hämocyanin der Europäischen Languste bildet auch ohne die Anwesenheit von Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ionen hexamere Aggregate (siehe Abb. 3.2 u. Tabelle 3.1). Zur Bestimmung der Anzahl der Bindungsplätze für Ca²⁺ und Mg²⁺ am Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurden Bindungsisotherme mit dem hexameren Pigment aufgenommen, welches zuvor gegen einen Tris-Puffer (pH = 8,0) ohne Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-Ionen dialysiert worden war. Die Auswertung erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell und ergab für das Ca²⁺-Ion eine Stöchiometrie von $n_{Ca^{2+}} = 61 \pm 2,8$. Die Mg²⁺-Ionen besetzten $n_{Mg^{2+}} = 49,8 \pm 3,0$ Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas* (vgl. Tabelle 3.5 u. Abb. 4.4 A (gemeinsame Bindungsplätze)). Die Bindungskonstanten beider divalenten Kationen waren, wie in Abb. 4.4 B (gemeinsame Bindungsplätze) dargestellt, mit $k_{Ca^{2+}} = 0,16 \pm 0,01$ mM⁻¹ für Ca²⁺ und $k_{Mg^{2+}} = 0,15 \pm 0,01$ mM⁻¹ für Mg²⁺ identisch. In Abb. 4.5 (gemeinsame Bindungsplätze) sind die berechneten Enthalpie- und Entropiewerte für die Bindung

der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen veranschaulicht. Bei Bindung der Ca^{2+} -Ionen an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* konnte eine signifikant höhere Enthalpie beobachtet werden ($\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^0 = -4,39 \pm 0,27 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{Mg}^{2+}}^0 = -2,93 \pm 0,23 \text{ kJ mol}^{-1}$), bei Mg^{2+} -Anlagerung war die Entropie signifikant höher ($T\Delta S_{\text{Mg}^{2+}}^0 = 9,35 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^0 = 7,94 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die freie Reaktionsenthalpie war bei Bindung der divalenten Kationen identisch ($\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^0 = -12,33 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{Mg}^{2+}}^0 = -12,28 \text{ kJ mol}^{-1}$). Eine Erklärung hierfür wird über die thermodynamische Analyse der Ligandenbindungen in Kapitel 4.5 erfolgen. Die Regression der Bindungsisotherme mit dem Multisite-Interacting-Modell war nicht möglich, da die Anzahl der variablen Parameter bei $n_{\text{Ca}^{2+}} = 61,0 \pm 2,8$ bzw. $n_{\text{Mg}^{2+}} = 49,8 \pm 3,0$ zu hoch ist für eine mathematisch genaue Berechnung der mikroskopischen Bindungskonstanten und Bindungsenthalpien der einzelnen Bindungsstellen. Dementsprechend kann keine Aussage über ein homotrop allosterisches Verhalten der Liganden getroffen werden. Die ITC-Verdrängungsexperimente zeigten, dass die untersuchten divalenten Kationen die gleichen Bindungsplätze am Hämocyanin der Europäischen Languste einnehmen. So konnten die Mg^{2+} -Ionen an mit Ca^{2+} -Ionen gesättigtem Pigment nicht mehr binden (vgl. Abb. 3.13).

Bei Injektion von Ca^{2+} -Ionen in mit Mg^{2+} -Ionen gesättigtem Hämocyanin konnte hingegen eine Wärmetönung aufgezeichnet werden. Die Auswertung der Bindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell ergab $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = 3,65 \pm 0,27$ Bindungsstellen mit einer signifikant erhöhten Bindungskonstante von $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Mg}} = 4,69 \pm 0,53 \text{ mM}^{-1}$. Auch die Werte der Bindungsenthalpie, der Entropie und der freien Enthalpie waren mit $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{0\text{Mg}} = -33,47 \pm 2,99 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{0\text{Mg}} = -12,77 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{0\text{Mg}} = -20,71 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant erhöht bzw. vermindert (siehe Tabelle 3.6). Die gemeinsamen Bindungsstellen für Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen waren, da das Hämocyanin mit Mg^{2+} -Ionen gesättigt vorlag, durch Mg^{2+} besetzt. Hierdurch hatte sich das Hämocyanin in seiner Struktur dergestalt verändert, dass vier spezifische Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen gebildet wurden. Ein direkter Vergleich der Bindungsparameter für die Bindung der Ca^{2+} -Ionen an seine unterschiedlichen Bindungsplatztypen ist in Abb. 4.4 u. Abb. 4.5 dargestellt. Eine Verdrängung der Mg^{2+} -Ionen von den gemeinsamen Bindungsplätzen durch die Ca^{2+} -Ionen kann ausgeschlossen werden, da die divalenten Kationen, wie zuvor schon ausgeführt, die gleiche Bindungsaffinität zu den gemeinsamen Bindungsstellen aufweisen. Die hier gemessene Bindungskonstante war hingegen um das 30-fache erhöht.

Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen können identische Bindungsplätze am Hämocyanin einnehmen. Die Auswertung der ITC-Versuche ergab jedoch eine differierende Anzahl an Bindungsstellen für beide Kationen, was auf die unterschiedliche Ionengröße zurückzuführen ist. Im nichthydrierten Zustand ist das Mg^{2+} -Ion mit einem effektiven Durchmesser von $0,9 \text{ \AA}$ kleiner als das Ca^{2+} -Ion mit einem Durchmesser von $1,4 \text{ \AA}$. Hydriert hingegen ist Ca^{2+} mit einem effektiven Durchmesser von $6,3 \text{ \AA}$ kleiner als Mg^{2+} mit $7,0 \text{ \AA}$ (Kielland,

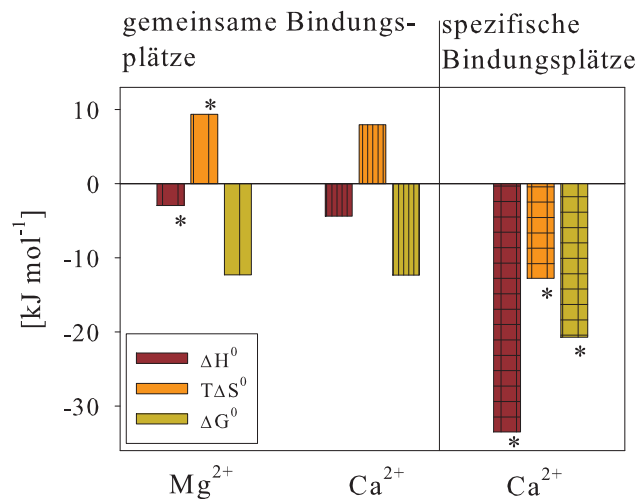


Abbildung 4.5: Bindungsenthalpie (ΔH^0), Bindungsentropie ($T\Delta S^0$) und freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) der Bindung von Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen an das Hämocyanin von *Palinurus elephas*, das gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) dialysiert wurde (gemeinsame Bindungsplätze) und an Hämocyanin, das gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) + 50 mM $MgCl_2$ dialysiert wurde (spezifische Bindungsplätze). Die Auswertung der Bindungsisotherme erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell. ($X \pm SD$). *: Signifikanter Unterschied der Bindungsparameter zu denen, die für die Ca^{2+} -Bindung an die gemeinsamen Bindungsplätze bestimmt wurden.

1937). In Lösung konkurrieren beide Kationen um dieselben Bindungsstellen am hexameren Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien Hämocyanin von *Palinurus elephas*, wobei das Mg^{2+} -Ion aufgrund seiner Größe und der hiermit verbundenen sterischen Behinderungen nur $n_{Mg^{2+}} = 49,8 \pm 3,0$ Bindungsplätze einnehmen kann.

Da für die Europäische Languste keine entsprechenden Literaturwerte zur Verfügung stehen, wurden zum Vergleich die für die Kalifornische Languste (*Panulirus interruptus*) dokumentierten Werte herangezogen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die unterschiedlichen Gattungen schon vor ca. 100 Millionen Jahren in ihrer Entwicklung trennten und dass das hexamere Hämocyanin von *Panulirus interruptus* aus Untereinheiten des α - und γ -Typs besteht (Markl et al., 1986), *Palinurus elephas* hingegen weist ausschließlich Untereinheiten des α -Typs auf (Markl, 1986). Andersson et al. (1982) beobachteten am Hämocyanin der Kalifornischen Languste ebenfalls, dass die divalenten Kationen um dieselben Bindungsplätze konkurrieren. Die Stöchiometrie der Ca^{2+} -Bindungsplätze am hexameren Sauerstofftransportprotein der Kalifornischen Languste bezifferten sie mit eins pro Untereinheit für eine Bindungsstelle mit hoher Affinität und mit 10 ± 7 pro Untereinheit für eine niedrigaffine Bindungsstelle. Letztere liegt in der Größenordnung der Stöchiometrie, die für den gemeinsamen Bindungsplatztyp der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* bestimmt wurde.

Kalorimetrische Versuche, für die das eingesetzte Hämocyanin gegen einen mit 500 mM NaCl angereicherten Tris-Puffer dialysiert wurde (siehe Tabelle 2.2 d und e), zeigten, dass die gemeinsamen Bindungsplätze der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zudem vom monovalenten

Na^+ -Ion besetzt werden können. Die Injektion von Mg^{2+} -Ionen in eine entsprechend vorbereitete Hämocyaninlösung erzeugte keine messbaren Wärmesignale (siehe Abb. 3.13). Die Bindungsplätze für Mg^{2+} -Ionen waren durch Na^+ schon besetzt. Falls Ca^{2+} -Ionen in die mit NaCl angereicherte Hämocyaninlösung titriert wurden, konnte hingegen eine Wärmetönung aufgezeichnet werden (siehe Abb. 3.14). Die Regression mit dem Non-Interacting-Site-Modell ergab eine Bindungskonstante von $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}} = 1,98 \pm 0,17 \text{ mM}^{-1}$. Die Anzahl der Bindungsplätze lag bei $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{Na}} = 1,69 \pm 0,44$, die Bindungsenthalpie betrug $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{ONa}} = -55,18 \pm 15,49 \text{ kJ mol}^{-1}$, die Entropie wurde mit $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{ONa}} = -36,70 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die freie Enthalpie mit $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{ONa}} = -18,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet (siehe Tabelle 3.6). Alle Parameter wichen signifikant von denen ab, die für die gemeinsamen Bindungsstellen der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* ermittelt wurden. Somit sind auch die Na^+ -Ionen in der Lage, wie zuvor schon für die Mg^{2+} -Bindung beschrieben, durch Bindung an die gemeinsamen Bindungsplätze der Kationen die Struktur des Hämocyanins dergestalt zu verändern, dass für Ca^{2+} -Ionen spezifische Bindungsplätze gebildet werden. Ein Konkurrenzverhalten der Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen um dieselben Bindungsplätze am Hämocyanin wurde auch von Kuiper et al. (1979) und Norne et al. (1979) für die Kalifornischen Languste beschrieben. Andersson et al. (1982) beobachteten, dass zudem das Mg^{2+} -Ion die Na^+ - und Ca^{2+} -Bindungsstellen am Hämocyanin von *Panulirus interruptus* besetzen kann.

Ca^{2+} -Ionen spezifische Bindungsplätze

Die Ca^{2+} -Ionen konkurrieren mit den Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen um dieselben Bindungsplätze am hexameren Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Anhand der ITC-Versuche konnte gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -Ionen zusätzlich noch spezifische Bindungsstellen am Protein besetzen. So wurden bei Titration von Ca^{2+} -Ionen in Hämocyaninlösungen, die zuvor gegen mit Na^+ - und/oder Mg^{2+} -Ionen angereicherten Tris-Puffern dialysiert worden waren, Wärmetönungen aufgezeichnet (siehe Abb. 3.14). Die Regression der Bindungsisotherme erfolgte mit dem Non-Interacting-Site-Modell. In allen Fällen waren die berechneten Bindungsparameter signifikant höher als die der gemeinsamen Kationenbindungsplätze. Hier war ein neuer, für Ca^{2+} -Ionen spezifischer Bindungsplatztyp entstanden. Die gemeinsamen Bindungsplätze am Hämocyanin waren durch die Na^+ - und/oder Mg^{2+} -Ionen besetzt. Durch die Anlagerung dieser Kationen erfuhr das hexamere Aggregat eine Strukturveränderung dergestalt, dass sich spezifische Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen bildeten. Die Kationen ergänzten sich hierbei in ihrer strukturverändernden Wirkung (vgl. Tabelle 3.6). Die Anzahl an spezifischen Bindungsstellen für Ca^{2+} betrug $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 4,36 \pm 0,34$ mit einer Bindungskonstanten von $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 2,88 \pm 0,28 \text{ mM}^{-1}$. Die Bindungsaffinität der Ca^{2+} -Ionen für ihren spezifischen Bindungsplatztyp war um das 18-fache höher als ihre Affinität zu dem Bindungsplatztyp, an dem auch Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen binden ($k_{\text{Ca}^{2+}} = 0,16 \pm$

0,01 mM⁻¹). Die Bindungsenthalpie lag bei $\Delta H_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{0MgNa}} = -41,73 \pm 3,95 \text{ kJ mol}^{-1}$, die Entropie bei $T\Delta S_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{0MgNa}} = -22,34 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die freie Energie wurde mit $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{0MgNa}} = -19,39 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet. Für die Mg²⁺-Ionen konnten keine spezifischen Bindungsplätze am Hämocyanin nachgewiesen werden. Die Titration von Mg²⁺ in Hämocyaninlösungen, die zuvor gegen mit Na⁺- und/oder Ca²⁺-Ionen angereichertem Tris-Puffer dialysiert worden waren, führte zu keinen messbaren Wärmesignalen (siehe Abb. 3.13). Die gemeinsamen Bindungsplätze waren in diesen Fällen schon von den anderen Kationen besetzt. Ein zusätzlicher Bindungsplatztyp für die Mg²⁺-Ionen war nicht entstanden.

4.2.2 Monomeres Hämocyanin

Die ITC-Versuche mit monomerem Hämocyanin zeigten auch hier ein differierendes Bindungsverhalten der Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen (vgl. Abb. 3.15). So wurden bei den ersten Injektionen von Ca²⁺-Ionen in monomere Hämocyaninlösungen Wärmeenergien von ca. 30 kJ mol⁻¹ erzeugt. Die Bindung erfolgte exotherm. Die ersten Injektionen von Mg²⁺-Ionen in monomeres Hämocyanin offenbarten, dass dieser Bindungsprozess, im Unterschied zur Ca²⁺-Bindung, endotherm verläuft. Die verbrauchte Wärmeenergie lag bei ca. 0,6 kJ mol⁻¹.

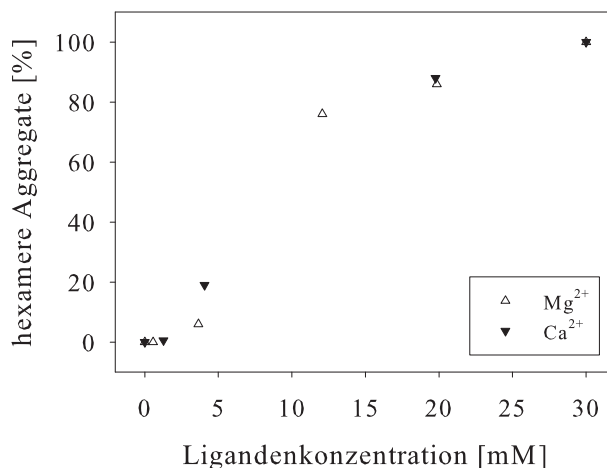


Abbildung 4.6: Injektion einer 200 mM Ca²⁺-Ionenlösung (▼) und einer 200 mM Mg²⁺-Ionenlösung (△) in eine 0,68 mM monomere Hämocyaninlösung. Die jeweiligen ITC-Versuche wurden an markanten Punkten der Bindungskurve abgebrochen (vgl. Abb. 3.16). Der zum jeweiligen Zeitpunkt des Abbruchs des ITC-Versuchs vorliegende prozentuale Anteil an hexameren Aggregaten wurde gegen die jeweilige zum Abbruch des ITC-Versuchs vorliegende Konzentration an Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen aufgetragen.

Im Verlaufe der ITC-Versuche mit monomeren Hämocyaninlösungen in die Ca²⁺- bzw. Mg²⁺-Ionen injiziert wurden, lagerten sich die monomeren Untereinheiten zu hexameren Komplexen zusammen. Anhand von kalorimetrischen Versuchen, in denen monomere Hämocyaninuntereinheiten in einen Tris-Puffer (pH 8,0) titriert und so hexamere Aggregate

in der Reaktionskammer erzeugt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung ein endothermer Vorgang ist (vgl. Abb. 3.17). Die durch die Bindung der Ca^{2+} -Ionen an die monomeren Untereinheiten erzeugte exotherme Energiefreisetzung wurde so im Laufe der stetigen endothermen Komplexbildung kompensiert. Entsprechend wurden auch die durch die Mg^{2+} -Bindung an monomeres Hämocyanin erzeugten Wärmetönungen von der endothermen Komplexbildung überlagert. Da eine Auswertung der integrierten Daten mit den zur Verfügung stehenden Regressionsmodellen somit nicht möglich war (vgl. Kapitel 3.2.4), wurden die ITC-Versuche an markanten Punkten der aufgezeichneten Bindungskurven abgebrochen und der jeweilige Aggregationsstatus bestimmt (vgl. Abb. 3.16).

In Abb. 4.6 ist der prozentuale Anteil an hexameren Aggregaten gegen die eingesetzte Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionenkonzentration aufgetragen. Für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an monomeres Hämocyanin erfolgte der erste Versuchsabbruch bei einer Wärmeenergie von $-0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Zu diesem Zeitpunkt waren $1,27 \text{ mM Ca}^{2+}$ in die Reaktionskammer injiziert und $0,6 \%$ der monomeren Untereinheiten hatten sich zu hexameren Aggregaten zusammengelagert. Demnach resultierte die bei den ersten Injektionen von Ca^{2+} -Ionen in die monomeren Hämocyaninlösungen freigesetzte Wärmeenergie von 30 kJ mol^{-1} allein aus dem exothermen Bindungsprozess. Desgleichen bezieht sich die bei den ersten Injektionen von Mg^{2+} -Ionen in monomere Hämocyaninlösungen verbrauchte Wärmeenergie von $0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ auf die Bindung des Kations. Bei Abbruch des ITC-Versuchs bei einer Wärmeenergie von $0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ und Injektion von $0,57 \text{ mM Mg}^{2+}$ hatten sich noch keine hexameren Aggregate gebildet. Aus Abb. 4.6 ist zudem ersichtlich, dass die durch Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen induzierte Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten linear verlief bis ca. 80% als hexamere Aggregate vorlagen. Bei Einsatz von $19,77 \text{ mM Ca}^{2+}$ konnten 88% zu Hexameren aggregieren, $19,85 \text{ mM Mg}^{2+}$ wurden benötigt, um 86% Hexamere zu erzeugen. Damit sich 100% der Monomeren zu Hexameren zusammenlagerten, musste $31,82 \text{ mM Ca}^{2+}$ oder $32,26 \text{ mM Mg}^{2+}$ eingesetzt werden. Alle Angaben beziehen sich auf eine $0,68 \text{ mM}$ Hämocyaninlösung.

Die Durchführung der kalorimetrischen Versuche unter hypoxischen Bedingungen zeigte, dass der Sauerstoff keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Ionenbindung an monomeres Hämocyanin ausübte (vgl. Abb. 3.18). Andersson et al. (1982) und Kuiper et al. (1979) beobachteten am hexameren Hämocyanin von *Panulirus interruptus* kein unterschiedliches Bindungsverhalten der Ca^{2+} -Ionen an Desoxy- und Oxyhämocyanin. Im Unterschied zur Ca^{2+} -Anlagerung an monomeres Hämocyanin wird die Mg^{2+} -Ionenbindung durch Sauerstoff beeinflusst. Unter Hypoxie wurde bis zu $0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ mehr Wärme verbraucht (vgl. Abb. 3.19).

4.3 Einfluss der Liganden auf die Sauerstoffbindung

4.3.1 Affinität und Kooperativität

Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-Ionen

Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins kann durch anorganische Ionen, wie Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻ und Na⁺ beeinflusst werden (Larimer und Riggs, 1964; Brouwer et al., 1978; Norne et al., 1979; Ellerton et al., 1983). Die Steigerung der Sauerstoffaffinität durch eine erhöhte Ca²⁺- oder Mg²⁺-Konzentration wurde beim Hämocyanin diverser Crustaceen beobachtet (Hogben, 1926; Truchot, 1975; Arisaka und van Holde, 1979; Bonaventura und Bonaventura, 1980). Die von Brouwer et al. (1983) mit dem Hämocyanin von *Limulus polyphemus* durchgeführten Sauerstoffbindungsstudien ließen zudem erkennen, dass die Erhöhung der Ca²⁺-Ionenkonzentration neben der Affinitätssteigerung auch eine Zunahme in der Kooperativität der Sauerstoffbindung bewirkt.

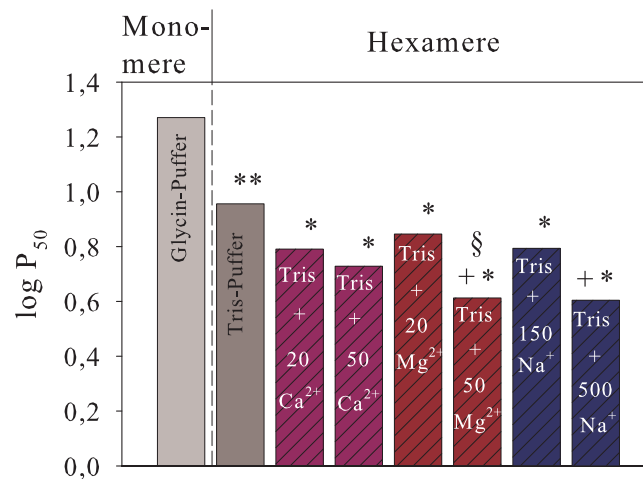


Abbildung 4.7: Logarithmierte Halbsättigungswerte (P₅₀) für die Bindung von Sauerstoff an monomeres und hexameres Hämocyanin der Europäischen Languste. In den Balken ist die Zusammensetzung des Puffers aufgeführt, gegen den das Hämocyanin dialysiert wurde. Die angegebenen Ziffern bezeichnen die Ionenkonzentration in mM. Die Ionen wurden als Cl⁻-Lösungen dem jeweiligen Puffer zugegeben. Als Puffersubstanzen wurden 100 mM Glycin/NaOH pH 9,5 eingestellt bei 20 °C und 100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C eingesetzt. *: signifikanter Unterschied zum P₅₀ des Hämocyanins, das gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde. **: signifikanter Unterschied zum P₅₀ von monomerem Hämocyanin. +: signifikanter Unterschied zum P₅₀ von Hämocyanin, das gegen den jeweiligen Tris-Puffer mit geringerer Ionenstärke dialysiert wurde. §: signifikanter Unterschied zum P₅₀ des Hämocyanins, das gegen einen Tris-Puffer mit 50 mM Ca²⁺-Ionen dialysiert wurde.

Hingegen führte die Erhöhung der Cl⁻-Ionenkonzentration nicht immer zu einer höheren Sauerstoffaffinität. Bei *Penaeus setiferus* (Brouwer et al., 1978) und *Carcinus maenas* (Truchot, 1975) konnte eine Affinitätszunahme dokumentiert werden, bei anderen Spezies wie z.B. beim *Limulus polyphemus* (Brouwer et al., 1977) wird durch Zugabe von Cl⁻-Ionen die Sauerstoffaffinität vermindert. Von der Cl⁻-Ionenkonzentration unbeeinflusst blieb der Halbsättigungswert des Hämocyanins der Kalifornischen Languste (Kuiper

et al., 1979). Auch beim Hämocyanin der Europäischen Languste trat kein nachweisbarer Cl^- -Ioneneffekt auf. Abbildung 4.7 zeigt, dass eine Verdrei- bzw. Verfünffachung der Cl^- -Ionenkonzentration keine Auswirkung auf den Halbsättigungsdruck hatte. Die berechneten Werte bei Zugabe von 50 mM MgCl_2 oder 500 mM NaCl zur Hämocyaninlösung wichen nicht signifikant voneinander ab ($P_{50}^{50\text{Mg}} = 4,10 \pm 0,17$ Torr; $P_{50}^{500\text{Na}} = 4,02 \pm 0,32$ Torr). Gleiches galt für die P_{50} -Werte bei Anreicherung des Tris-Puffers mit 20 mM CaCl_2 oder 150 mM NaCl ($P_{50}^{20\text{Ca}} = 6,18 \pm 0,25$ Torr; $P_{50}^{150\text{Na}}$ auf $6,22 \pm 0,11$ Torr).

Sämtliche Versuche mit dem Hämocyanin von *Palinurus elephas* wurden im Tris-Puffer unter Zugabe der verschiedenen Modulatoren durchgeführt. Dass der Tris-Puffer selbst als allosterischer Effektor agiert, konnte nur für das 24-mer Hämocyanin der Tarantel *Eurypelma californicum* gezeigt werden (Sterner et al., 1994). Ein Einfluss des gewählten Tris-Puffers auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des hexameren Hämocyanins von *Palinurus elephas* ist hingegen in der Literatur nicht dokumentiert.

Die Sauerstoffaffinität von in seine monomeren Untereinheiten zerfallenem Hämocyanin der Europäischen Languste ist mit einem Halbsättigungswert von $P_{50}^{\text{mono}} = 18,65 \pm 1,96$ Torr sehr gering. Die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten zu hexameren Aggregaten führte zu einer signifikanten Verminderung des P_{50}^r auf $9,61 \pm 1,24$ Torr (vgl. Tabelle 3.10). Beim Vergleich der reinen Zahlenwerte ist der Einfluss des pH-Werts zusätzlich noch zu berücksichtigen. Generell nimmt die Sauerstoffaffinität mit Erhöhung des pH-Werts zu (Hogben, 1926; Zeis, 1994; Menze, 2001). Die Sauerstoffbindungsdaten des monomeren Hämocyanins wurden bei pH 9,5 und die des hexameren Hämocyanins bei pH 8,0 aufgenommen. Der P_{50} -Wert, der nach Dialyse von hexamerem Hämocyanin gegen einen Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien Tris-Puffer erhalten wurde, wich mit $P_{50} = 9,04 \pm 0,36$ Torr nicht signifikant vom P_{50}^r ab. So konnten die Sauerstoffbindungseigenschaften des Moleküls durch die Dialyse der monomeren Untereinheiten gegen den Tris-Puffer wiederhergestellt werden. Die Dialyse der monomeren Untereinheiten gegen einen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ -ionenhaltigen Tris-Puffer hingegen führte zu hexameren Aggregaten, deren Sauerstoffaffinität mit $P_{50}^{r+K} = 7,61 \pm 0,78$ Torr signifikant geringer war als die von nativen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ -haltigen Hexameren ($P_{50} = 6,48 \pm 0,21$ Torr). Bei Reaggregation in Anwesenheit der Kationen sind dementsprechend noch weitere Faktoren nötig, um die Voraussetzungen zur Bildung von Hexameren zu schaffen, die in ihrer Struktur und Funktion den nativen Molekülen entsprechen.

An das in seine monomeren Untereinheiten zerfallene Hämocyanin band der Sauerstoff nicht kooperativ ($n_H^{\text{mono}} = 1,11 \pm 0,11$). Gleiches konnten auch Molon et al. (2000) bei ihren Untersuchungen mit dem Hämocyanin der Königskrabbe (*Paralithodes camtschaticae*) beobachten. Die Sauerstoffbindung an das Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreie Hämocyanin von *Palinurus elephas* erfolgte hingegen kooperativ (vgl. Abb. 4.8). Die berechneten Hill-Koeffizienten lagen bei $n_H^r = 2,34 \pm 0,07$ und $n_H = 2,44 \pm 0,10$ (vgl. Tabelle 3.10).

Wajcman et al. (1977) zeigten am Hämocyanin von *Cancer magister*, wie schon Kuiper et al. (1975) bei *Panulirus interruptus*, dass auch in Abwesenheit der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} die Sauerstoffbindung an das aggregierte Hämocyanin kooperativ erfolgt.

Die Bindung von Ca^{2+} -, Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* bewirkte eine signifikante Erhöhung der Sauerstoffaffinität gegenüber dem Ca^{2+} -, Mg^{2+} und Na^+ -ionenfreien Transportprotein. Wie aus Abb. 4.7 zu ersehen ist, hing die Minderung des P_{50} vom Liganden und von dessen Konzentration ab. Bei gesonderter Betrachtung der unterschiedlichen Liganden kann generell die Tendenz festgestellt werden, dass durch Erhöhung der Ionenstärke die Sauerstoffaffinität des Pigments gesteigert wurde. Ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Liganden zeigt, dass die berechneten P_{50} -Werte für Ca^{2+} und Mg^{2+} bei einer Ionenstärke von 20 mM noch nicht signifikant unterschiedlich waren (vgl. Tabelle 3.8). Die Anlagerung beider Kationen bewirkte eine Steigerung der Affinität um ca. 25 % auf $P_{50}^{20\text{Ca}} = 6,18 \pm 0,25$ Torr bzw. $P_{50}^{20\text{Mg}} = 7,01 \pm 0,36$ Torr gegenüber dem Ca^{2+} -, Mg^{2+} - oder Na^+ -ionenfreien hexameren Pigment. Bei Erhöhung der Ionenstärke auf 50 mM hingegen lag die affinitätssteigernde Wirkung von Mg^{2+} mit $P_{50}^{50\text{Mg}} = 4,10 \pm 0,17$ Torr um ca. 15 % signifikant über der der Ca^{2+} -Ionen ($P_{50}^{50\text{Ca}} = 5,35 \pm 0,30$ Torr). Der $P_{50}^{50\text{Ca}}$ hatte sich jedoch nicht signifikant im Vergleich zum $P_{50}^{20\text{Ca}}$ verändert. Dieses Phänomen kann auf die unterschiedlichen Bindungsplatztypen für Ca^{2+} und Mg^{2+} zurückgeführt werden (vgl. Kapitel 4.2). Die divalenten Kationen besitzen einen gemeinsamen Bindungsplatztyp am hexameren Hämocyanin, dessen Besetzung eine gesteigerte Affinität für Sauerstoff zur Folge hat. Zusätzlich wird das Hämocyanin durch die Bindung der Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen in seiner Struktur dergestalt verändert, dass ein weiterer für Ca^{2+} -Ionen spezifischer Bindungsplatztyp entsteht. Die Besetzung dieser speziellen Ca^{2+} -Bindungsstellen reduziert die Affinität des Hämocyanins für Sauerstoff. Bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} oder Mg^{2+} zum Hämocyanin wurden zuerst die gemeinsamen Bindungsplätze belegt. Die Erhöhung der Ionenstärke auf 50 mM führte dazu, dass zuerst alle noch freien gemeinsamen Plätze besetzt wurden. Hierdurch verminderte sich der $P_{50}^{50\text{Mg}}$ signifikant. Anschließend konnten die noch nicht gebundenen Ca^{2+} -Ionen ihre spezifischen Bindungsplätze belegen und so die Sauerstoffaffinität im Vergleich zum mit Mg^{2+} gesättigtem Hämocyanin wieder reduzieren.

Die Anlagerung von ausschließlich Ca^{2+} - oder Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen an das hexamere Hämocyanin bewirkte keine signifikante Änderung in der Kooperativität der Sauerstoffbindung im Vergleich zum Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien hexameren Pigment (vgl. Abb. 4.8). Erst die Bindung weiterer, differierender Kationen konnte, wie Abb. 4.9 zeigt, das kooperative Verhalten signifikant erhöhen (vgl. Tabelle 3.9). Der Hill-Koeffizient stieg von $n_H = 2,44 \pm 0,10$ für Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -freies Hämocyanin auf Werte von bis zu $n_H^{20\text{Ca}50\text{Mg}} = 2,79 \pm 0,04$ an. Auch die Sauerstoffaffinität wurde durch die Anlagerung weiterer Kationen signifikant beeinflusst. Abb. 4.10 zeigt, dass die zusätzliche Anlagerung

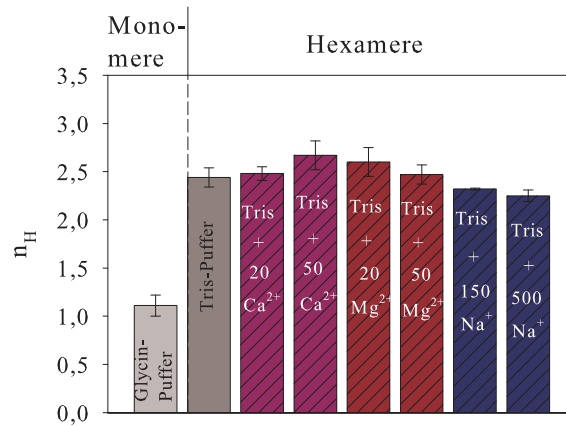


Abbildung 4.8: Hill-Koeffizienten (n_H) für die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin der Europäischen Languste. In den Balken ist die Zusammensetzung des Puffers aufgeführt, gegen den das Hämocyanin dialysiert wurde. Die angegebenen Ziffern bezeichnen die Ionenkonzentration in mM. Die Ionen wurden als Cl^- -Lösungen dem jeweiligen Puffer zugegeben. Als Puffersubstanzen wurden 100 mM Glycin/NaOH pH 9,5 eingestellt bei 20 °C und 100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C eingesetzt.

von Ca^{2+} -Ionen eine Verminderung in der Affinität des Hämocyanins gegenüber dem Sauerstoff bewirkte. Der P_{50} erhöhte sich um 50 % auf $P_{50}^{20\text{Ca}50\text{Mg}} = 6,18 \pm 0,01$ Torr bei der Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen im Vergleich zum berechneten Halbsättigungswert bei ausschließlicher Sättigung des Proteins mit Mg^{2+} -Ionen ($P_{50}^{50\text{Mg}} = 4,10 \pm 0,17$ Torr). Desgleichen wies eine Hämocyaninlösung mit 500 mM NaCl ($P_{50}^{500\text{Na}} = 4,02 \pm 0,32$ Torr) einen niedrigeren Halbsättigungsdruck auf als eine Pigmentlösung, die zusätzlich zu den 500 mM NaCl noch 20 mM CaCl_2 ($P_{50}^{20\text{Ca}500\text{Na}} = 5,10 \pm 0,29$ Torr) beinhalten. Im Unterschied hierzu veränderte sich die Sauerstoffaffinität mit $P_{50}^{50\text{Mg}500\text{Na}} = 3,57 \pm 0,21$ Torr bei Bindung von Na^+ - und Mg^{2+} -Ionen im Vergleich zum Hämocyanin, an das nur Na^+ ($P_{50}^{500\text{Na}} = 4,02 \pm 0,32$ Torr) oder Mg^{2+} ($P_{50}^{50\text{Mg}} = 4,10 \pm 0,17$ Torr) gebunden waren, nicht signifikant. Eine Verminderung der Sauerstoffaffinität durch die zusätzliche Bindung von Ca^{2+} -Ionen beobachteten auch Kuiper et al. (1979) am Hämocyanin der Kalifornischen Languste. Sie fügten einer Proteinlösung, die 500 mM NaCl enthielt, 25 mM CaCl_2 zu.

Aus den isothermen titrationskalorimetrischen Versuchen ist bekannt, dass die Anlagerung der Mg^{2+} - und/oder Na^+ -Ionen an das Hexamer eine Molekülstrukturveränderung bewirkt, durch die spezifische Bindungsplätze für Ca^{2+} -Ionen gebildet werden. Die Besetzung dieser spezifischen Bindungsplätze führt demnach, wie zuvor schon erwähnt, zur Verminderung der Sauerstoffaffinität. So konnte erwartungsgemäß, wie in Abb. 4.10 dargestellt, eine signifikante Reduzierung der Sauerstoffaffinität von einer Hämocyaninlösung, die zusätzlich zu den Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen noch Ca^{2+} -Ionen beinhalten, beobachtet werden ($P_{50}^{20\text{Ca}50\text{Mg}500\text{Na}} = 5,61 \pm 0,19$ Torr; $P_{50}^{50\text{Mg}500\text{Na}} = 3,57 \pm 0,21$ Torr). Gleichzeitig wurde die Kooperativität der Sauerstoffbindung von $n_H^{50\text{Mg}500\text{Na}} = 2,65 \pm 0,13$ auf $n_H^{20\text{Ca}50\text{Mg}500\text{Na}} = 3,07 \pm 0,16$ nicht signifikant erhöht (vgl. Abb. 4.9).

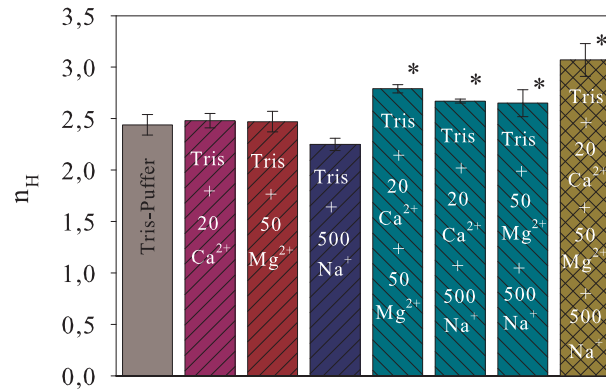


Abbildung 4.9: Hill-Koeffizienten (n_H) für die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin der Europäischen Languste. In den Balken ist die Zusammensetzung des Puffers aufgeführt, gegen den das Hämocyanin dialysiert wurde. Die angegebenen Ziffern bezeichnen die Ionenkonzentration in mM. Die Ionen wurden als Cl^- -Lösungen dem jeweiligen Puffer zugegeben. Als Puffersubstanz wurde 100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C eingesetzt. *: Signifikanter Unterschied zum n_H des Hämocyanins, das gegen 100 mM Tris/HCl dialysiert wurde.

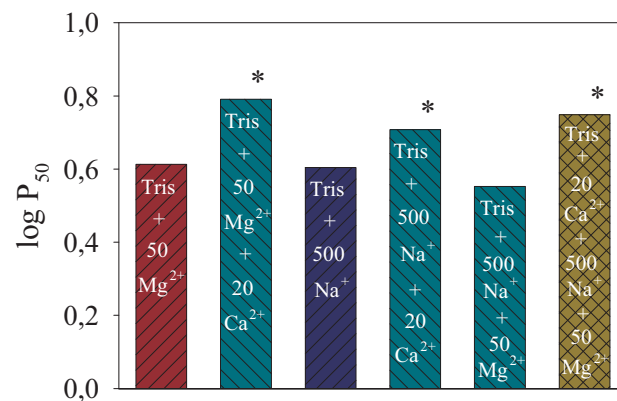


Abbildung 4.10: Logarithmierte Halbsättigungswerte (P_{50}) für die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin der Europäischen Languste. In den Balken ist die Zusammensetzung des Puffers aufgeführt, gegen den das Hämocyanin dialysiert wurde. Die angegebenen Ziffern bezeichnen die Ionenkonzentration in mM. Die Ionen wurden als Cl^- -Lösungen dem jeweiligen Puffer zugegeben. Als Puffersubstanz wurde 100 mM Tris/HCl pH 8,0 eingestellt bei 20 °C eingesetzt. *: signifikanter Unterschied zum P_{50} der jeweiligen Hämocyaninlösung ohne Ca^{2+} -Ionen.

Urat und Koffein

Als weitere Modulatoren für die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyans wurden Urat, das unter Hypoxie in der Hämolymphe dekapoder Crustaceen akkumuliert (Lallier et al., 1987; Lallier und Truchot, 1989a), und sein Strukturanalogon Koffein betrachtet. Die Auswertung der ITC-Versuche ergab für Urat und Koffein zwei identische Bindungsplätze am hexameren Hämocyans von *Palinurus elephas*. Aus Abb. 4.11 A ist ersichtlich, dass die Bindung von Urat oder Koffein ans hexamere Hämocyans eine signifikante Erhöhung in der Sauerstoffaffinität hervorruft. Der Halbsättigungsdruck verminderte sich um 46 % auf $P_{50}^{\text{Urat}} = 3,50 \pm 0,08$ Torr bei Anlagerung von Urat und um ca. 55 % auf $P_{50}^{\text{Koffein}} = 2,90 \pm 0,16$ bei Bindung von Koffein (vgl. Tabelle 3.7). Einen stärkeren Einfluss auf die Sauerstoffaffinität durch den artifiziiellen Effektor Koffein konnte auch Menze (2001) am Hämocyans von *Homarus vulgaris* beobachten. Die Anlagerung von Urat oder Koffein bewirkte zudem eine signifikante Verminderung in der Kooperativität der Sauerstoffbindung (vgl. Abb. 4.11 B). Der Hill-Koeffizient reduzierte sich von $2,80 \pm 0,25$ auf $n_H^{\text{Urat}} = 2,31 \pm 0,04$ bzw. $n_H^{\text{Koffein}} = 1,71 \pm 0,14$. Die Werte für n_H^{Urat} und n_H^{Koffein} wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität und gleichzeitige Verminderung der Kooperativität durch Anlagerung von Urat wurde ebenfalls beim Hämocyans von *Homarus vulgaris* beschrieben (Nies et al., 1992; Zeis et al., 1992).

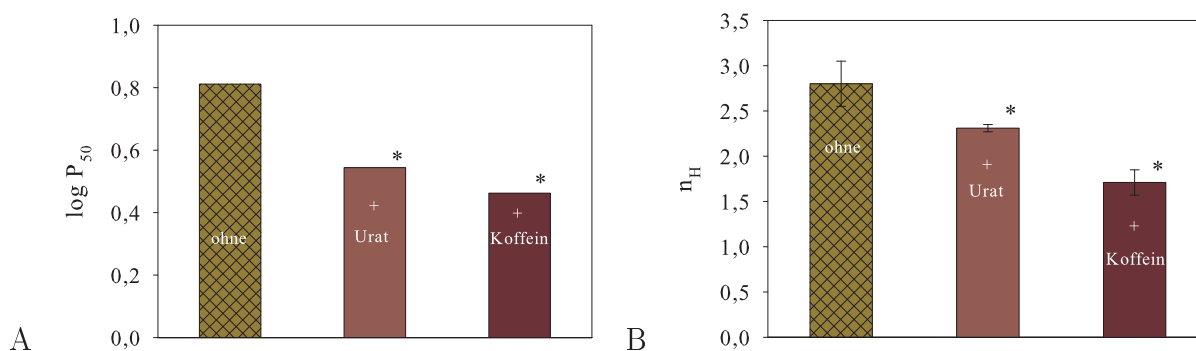


Abbildung 4.11: A: Logarithmierte Halbsättigungswerte und B: Hill-Koeffizienten für die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyans der Europäischen Languste in An- und Abwesenheit der Effektoren Urat und Koffein. Die Hämocyanslösungen wurde gegen einen Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 pH 8,0 eingestellt bei 20 °C) dialysiert. Die Effektoren wurden in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. *: Signifikanter Unterschied zum Referenzwert ohne Effektor.

4.3.2 MWC-Modell und Three-State-MWC-Modell

Eine zusätzliche Analyse der Sauerstoffbindungskurven über ein allosterisches Modell führt zum besseren Verständnis der Sauerstoff- und Effektorinteraktion. Da das Hämocyans der Europäischen Languste aus hexameren Aggregaten besteht, wurden die

Sauerstoffbindungsdaten einer nichtlinearen Regression mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell unterzogen. So zeigten Dainese et al. (1998) am Hämocyanin von *Carcinus aestuarii*, dass die Sauerstoffbindung an den hexameren Anteil des Hämocyanins durch das MWC-Modell beschrieben werden kann. Auch Connelly et al. (1989) interpretierten die Sauerstoffbindungsdaten für das hexamere Hämocyanin von *Panulirus interruptus* mit dem MWC-Modell.

Beltramini et al. (2005) arbeiteten mit dem Hämocyanin der Black Tiger Crevetten (*Penaeus monodon*), das zum überwiegenden Teil aus hexameren Aggregaten besteht. Sie beschrieben die Sauerstoffbindung an das hexamere Hämocyanin mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell. Ein Vergleich beider Modelle ergab, dass die Daten durch das Three-State-MWC-Modell besser erfasst wurden. Ebenso benannte Makino (1986), der die Sauerstoffaffinität des hexameren Hämocyanins der Japanischen Languste (*Panulirus japonicus*) betrachtete, das Three-State-MWC-Modell als das Modell, mit dem die Bindung am besten dargestellt werden konnte.

Als kleinste allosterische Einheit wurde in den vorgestellten Arbeiten das Hämocyaninmolekül in der Form eines Hexamers beschrieben. Desgleichen betrachteten Richey et al. (1985), Robert et al. (1987) und Menze et al. (2005), die mit dodekamerem Hämocyanin arbeiteten, das Hexamer als die kleinste allosterische Einheit.

Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem MWC-Modell und dem Three-State-MWC-Modell erfolgte in sechs Analysegruppen (vgl. Tabelle 2.4). Die Zusammensetzung der Analysegruppen I bis V resultierte aus den Ergebnissen der isothermen titrationskalorimetrischen Untersuchungen. Die ITC-Versuche zeigten, dass die Bindung von Mg^{2+} oder Na^+ an das Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreie Hämocyanin zu einer Strukturveränderung führte, aus der neue Ca^{2+} -spezifische Bindungsplätze resultierten. Bei der Zusammensetzung der Analysegruppen wurde davon ausgegangen, dass eine solche Strukturveränderung auch Auswirkungen auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Moleküls hat, die nur mit einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen den allosterischen Konformationen nicht mehr begründet werden können. So wurden in Analysegruppe I die Sauerstoffbindungskurven zusammengefasst, die mit Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreiem Hämocyanin aufgenommen wurden. Hämocyanin, das entweder Ca^{2+} -, Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen gebunden hatte, wurde in die Analysegruppen II bis IV aufgeteilt. Analysegruppe V enthielt Sauerstoffbindungskurven von Hämocyanin, das mit zwei unterschiedlichen Kationen gesättigt war und in Analysegruppe VI wurden die Sauerstoffbindungskurven des Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenhaltigen Hämocyanins mit und ohne die Effektoren Urat und Koffein zusammengefasst. Zur Beurteilung der Güte der Regression wurde der χ^2 -Wert berechnet. Die Regression mit dem MWC-Modell führte in allen Analysegruppen zu einem höheren χ^2 -Wert als die Auswertung mit dem Three-State-MWC-Modell (vgl. Tabellen 3.11, 3.15, 3.16 und 3.17). Die Messdaten konnten somit durch eine nichtlineare Regres-

sion mit dem Three-State-MWC-Modell besser erfasst werden. Die weitere Analyse der Sauerstoffbindungsdaten bezieht sich dementsprechend nur noch auf die Regression mit dem Three-State-MWC-Modell. Innerhalb der einzelnen Analysegruppen wurden die Sauerstoffbindungskonstanten (k_{R_3} , k_{T_3} , k_{S_3}) unabhängig von der Effektorbindung bestimmt. Nach Wyman (1972) wird der Einfluss des Effektors lediglich über die Gleichgewichtskonstanten ($L_{T_3}^0$, $L_{S_3}^0$) und die Einflussfaktoren ($W_{T_3}^{\text{eff}}$, $W_{S_3}^{\text{eff}}$) beschrieben.

Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem Three-State-MWC-Modell ergab für die Analysegruppen I bis VI keine signifikanten Unterschiede in den Bindungskonstanten k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} der verschiedenen Konformationen (vgl. Tabellen 3.11, 3.16 und 3.17). Hierbei muß jedoch bedacht werden, dass die Parameter der Analysegruppe I nur mit hohen Ungenauigkeiten bestimmt werden konnten. In allen Analysegruppen band der Sauerstoff an die *R*-Konformation mit der höchsten Affinität. Die Bindungskonstanten lagen zwischen $k_{R_3}^I = 1,074 \pm 0,784 \text{ Torr}^{-1}$ und $k_{R_3}^V = 1,822 \pm 0,395 \text{ Torr}^{-1}$. An die *T*-Konformation band Sauerstoff mit der geringsten Affinität. Hier lagen die Werte zwischen $k_{T_3}^II = 0,015 \pm 0,025 \text{ Torr}^{-1}$ und $k_{T_3}^{IV} = 0,043 \pm 0,016 \text{ Torr}^{-1}$. k_{S_3} , die Konstante für die Bindung an die *S*-Konformation, wies Werte von $k_{S_3}^I = 0,090 \pm 0,036 \text{ Torr}^{-1}$ bis $k_{S_3}^{VI} = 0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$ auf. Dass der Sauerstoff, bei Interpretation der Bindungsdaten mit dem Three-State-MWC-Modell, an die *R*-Konformation mit der höchsten und an die *T*-Konformation mit der niedrigsten Affinität bindet, wurde schon von diversen Autoren berechnet (Richey et al., 1985; Beltramini et al., 2005; Menze et al., 2005; Pott, 2006).

Der Einfluss der Effektoren Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins von *Palinurus elephas* kann demgemäß über die Gleichgewichtskonstanten ($L_{T_3}^0$, $L_{S_3}^0$) und die Einflussfaktoren ($W_{T_3}^{\text{eff}}$, $W_{S_3}^{\text{eff}}$) beschrieben werden. Die Vermutung, eine Strukturveränderung des Hämocyanins führe auch zu unterschiedlichen k_{R_3} , k_{T_3} und k_{S_3} -Werten, konnte nicht bestätigt werden.

Die effektorspezifischen Gleichgewichtskonstanten ($L_{S_3}^{\text{eff}}$, $L_{T_3}^{\text{eff}}$) konnten nur mit großen Ungenauigkeiten über die nichtlineare Regression bestimmt werden (vgl. Gleichung 2.17). Auch Menze et al. (2005) und Pott (2006) wiesen darauf hin, dass die mit dem Three-State-MWC-Modell bestimmten Gleichgewichtskonstanten mit großen Fehlern behaftet waren. Über die Sauerstoffbindungskonstanten (k_{R_3} , k_{T_3} , k_{S_3}) und die effektorspezifischen Gleichgewichtskonstanten konnte dennoch der Einfluss von Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindung berechnet werden (siehe Tabelle 3.13). Ferner konnten die unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen vorliegenden Konformationsverteilungen des Hämocyanins von *Palinurus elephas* bei Bindung von Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen und bei Bindung der Modulatoren Urat und Koffein bestimmt werden (siehe Formeln 2.22). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass als Berechnungsgrundlage die mit hohen Unsicherheiten versehenen Gleichgewichtskonstanten dienten und die Parameter während der Bestimmung der Einflussfaktoren zur Korrelation neigten.

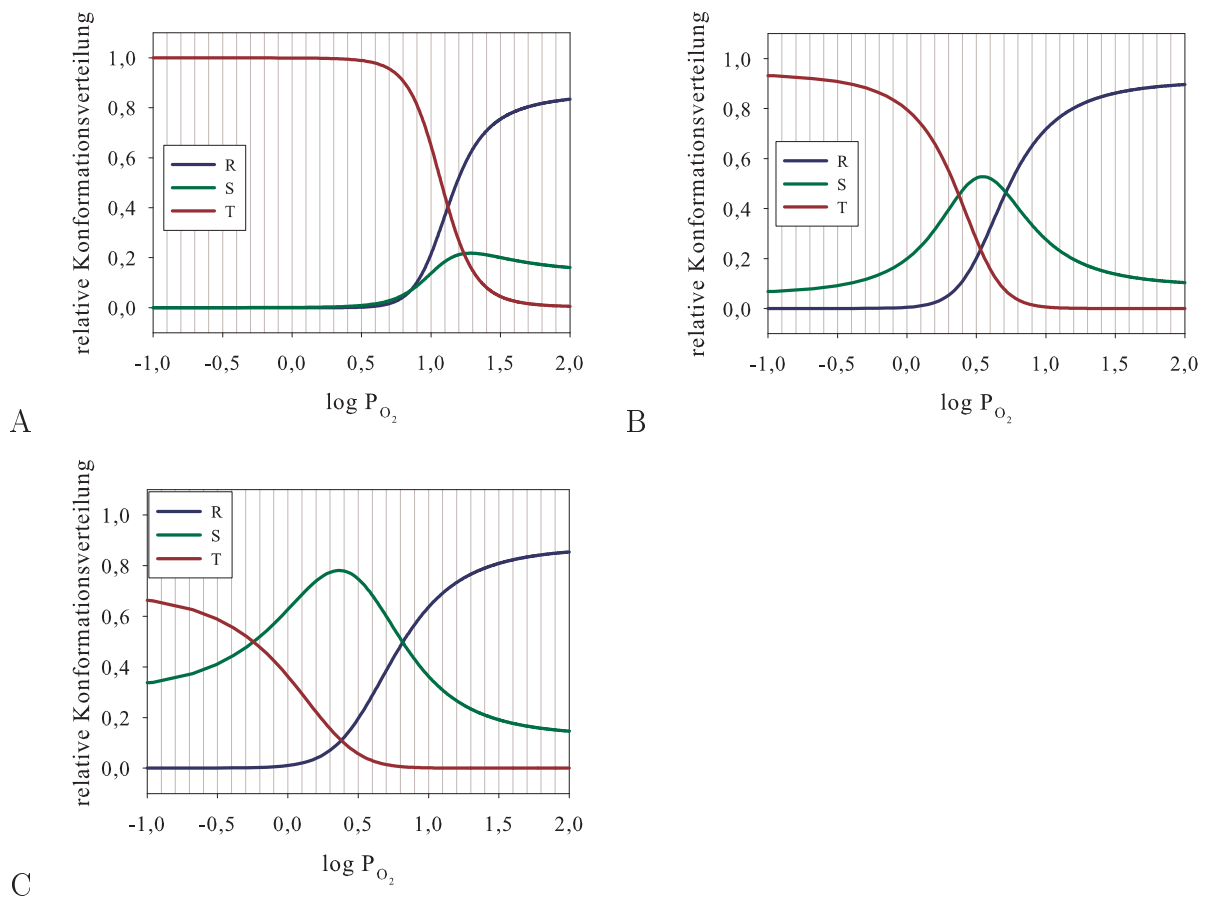


Abbildung 4.12: Relative Konformationsverteilung des Hämocyansins der Europäischen Languste in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Analysegruppe VI. A: ohne Ligand, B: mit Urat und C: mit Koffein. Konformation R = blau; Konformation S = grün; Konformation T = rot

Die kontinuierliche Änderung der relativen Konformationsverteilung bei zunehmender Sauerstoffkonzentration ist für das Hämocyansin mit und ohne die Liganden Urat und Koffein -Analysegruppe VI- in Abb. 4.12 dargestellt. Bei geringer Sauerstoffkonzentration lag das Hämocyansin ohne die Effektoren Urat und Koffein zum überwiegenden Teil im T -Zustand vor. Mit Erhöhung der Sauerstoffkonzentration ging das Transportpigment in den R - und zu einem geringen Teil in den S -Zustand über, die T -Konformation war in sauerstoffgesättigter Atmosphäre nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 4.12 A). Durch die Bindung des natürlichen Modulators Urat an das Hämocyansin lag bei geringer Sauerstoffkonzentration ein Teil der Moleküle auch in der S -Konformation vor (vgl. Abb. 4.12 B). Im Unterschied zum uratfreien Hämocyansin begann die Umlagerung vom T in den R - und S -Zustand bei geringerem Sauerstoffpartialdruck. Im Bereich von 2,5 Torr bis 5 Torr dominierte die S -Konformation. Unter normoxischen Bedingungen war die Konformationsverteilung des Hämocyansins mit und ohne Urat identisch. Die Anlagerung des artifiziellen Effektors Koffein an das Hämocyansin von *Palinurus elephas* führte im Bereich geringer Sauerstoffkonzentration zu einer weiteren Verminderung der T -Form zu-

gunsten der *S*-Konformation. Letztere wurde im Bereich von 0,6 Torr bis 6,3 Torr zur dominierenden Form (vgl. Abb. 4.12 C). Bei hoher Sauerstoffkonzentration entsprach die prozentuale Verteilung der verschiedenen Konformationen vom Hämocyanin mit Koffein der des Hämocyanins ohne die Bindung von Koffein oder Urat (vgl. Tabelle 3.12). Der Umlagerungsprozess von der *T*- zur *R*-Konformation als die Dominierende begann schon bei einem geringeren Sauerstoffpartialdruck beim mit Koffein gesättigten Hämocyanin als beim mit Urat gesättigten Hämocyanin. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den allosterischen Untereinheiten durch die Bindung des natürlichen Modulators Urat und des artifiziellen Effektors Koffein konnten Menze et al. (2005) und Pott (2006) auch am Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) nachweisen.

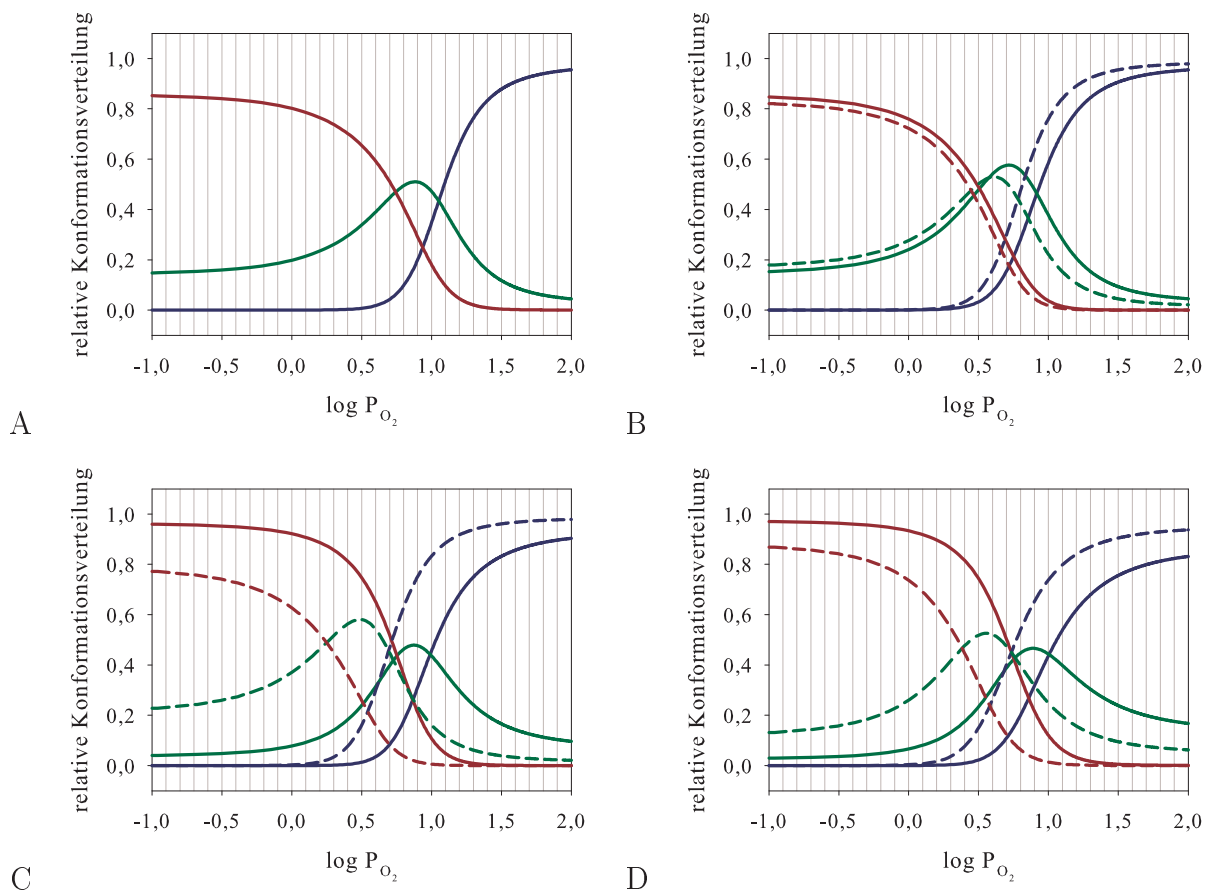


Abbildung 4.13: Relative Konformationsverteilung des Hämocyanins der Europäischen Languste in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Analysegruppen I bis IV. A: ohne Ligand; B: mit 20 mM Ca^{2+} (durchgezogene Linien) und mit 50 mM Ca^{2+} (gestrichelte Linien); C: mit 20 mM Mg^{2+} (durchgezogene Linien) und mit 50 mM Mg^{2+} (gestrichelte Linien); D: mit 150 mM Na^+ (durchgezogene Linien) und mit 500 mM Na^+ (gestrichelte Linien). Konformation *R* = blau; Konformation *S* = grün; Konformation *T* = rot

Abb. 4.13 zeigt die kontinuierliche Veränderung der relativen Konformationsverteilung bei zunehmender Sauerstoffkonzentration für die Analysegruppen I bis IV. Bei geringem Sauerstoffpartialdruck lag das Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreie Hämocyanin - Ana-

lysegruppe I - zu über 80 % in der *T*-Konformation vor (vgl. Abb. 4.13 A). Die *R*-Konformation war nicht vorhanden und auf die *S*-Konformation entfiel ein Anteil von ca. 18 %. Bei zunehmender Sauerstoffkonzentration lagerte sich das Hämocyanin dergestalt um, dass unter normoxischen Bedingungen die *T*-Konformation nicht mehr vorhanden war. Zur dominierenden Konformation wurde der *R*-Zustand mit ca. 90 %. Die restlichen 10 % entfielen auf die *S*-Konformation.

Die Anlagerung der Ca^{2+} -Ionen - Analysegruppe II - bewirkte keine Änderung in der relativen Konformationsverteilung bei geringer und hoher Sauerstoffkonzentration (vgl. Abb. 4.13 B). Durch die Bindung von Ca^{2+} an das Hämocyanin der Europäischen Languste wurde lediglich der Wert des für die Konformationsumlagerung benötigten Sauerstoffpartialdrucks beeinflusst. Wie der Vergleich der Abb. 4.13 A und B zeigt, begann die Umlagerung unter Ca^{2+} -Ioneneinfluss bei einer geringeren Sauerstoffkonzentration von ca. 0,6 Torr. Ohne Zugabe von Ca^{2+} -Ionen lag der Wert bei 1 Torr. Der Unterschied in der Konformationsverteilung bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} (durchgezogene Linien) und 50 mM Ca^{2+} (gestrichelte Linien) zur Hämocyaninlösung war gering. Die unterschiedliche Ionenstärke wirkte sich nur auf den P_{O_2} aus, bis zu dem ca. 90 % der Hämocyaninmoleküle in die *R*-Konformation umgelagert wurden. Der Wert betrug bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} 50 Torr und bei 50 mM Ca^{2+} 30 Torr.

Die Auswirkung der Mg^{2+} -Bindung an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* - Analysegruppe III - auf die relative Konformationsverteilung war hingegen von der eingesetzten Ionenstärke abhängig (vgl. Abb. 4.13 C). Bei Zugabe einer 20 mM MgCl_2 -Lösung zum Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien Hämocyanin (durchgezogene Linien) lagen unter einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck über 90 % der Makromoleküle in der *T*- und ein Anteil von unter 10 % in der *S*-Konformation vor. Die Erhöhung der Ionenstärke auf 50 mM Mg^{2+} (gestrichelte Linien) bewirkte eine Erhöhung des Anteils der *S*-Konformation auf ca. 22 % und eine entsprechende Verminderung der *T*-Konformation auf ca. 78 %. Ein Anstieg des P_{O_2} führte auch hier zur Verschiebung der relativen Konformationsverteilung zugunsten des *R*-Zustandes. Die Umlagerung des Hämocyanins setzte bei einer Ionenstärke von 50 mM schon bei einem geringeren Sauerstoffpartialdruck ein als bei 20 mM Mg^{2+} . Die *S*-Form erreichte bei Zugabe von 50 mM MgCl_2 zur Hämocyaninlösung und einem Sauerstoffpartialdruck von 3 Torr ihr Maximum. Bei Zugabe von 20 mM MgCl_2 zur Hämocyaninlösung wurde das Maximum für die *S*-Konformation erst bei einem P_{O_2} von ca. 7,9 Torr erreicht. Im Bereich von ≥ 150 Torr war bei beiden eingesetzten Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen die *T*-Konformation nicht mehr vorhanden. Der Prozentanteil der *R*-Konformation lag bei über 90 und die restlichen Moleküle lagen in der *S*-Konformation vor.

Auch die Zugabe von Na^+ in verschiedenen Ionenstärken zum Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien Hämocyanin - Analysegruppe IV - hatte unterschiedliche Auswirkungen auf

die relative Konformationsverteilung. Aus Abb. 4.13 D ist abzulesen, dass bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck und Zugabe von 150 mM NaCl (durchgezogene Linien) das Hämocyanin zu ca. 95 % in der *T* und zu ca. 5 % in der *S*-Konformation vorlag. Bei hohem P_{O_2} lag das Hämocyanin zu 80 % in der *R* und zu 20 % in der *S*-Konformation vor. Die Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM (gestrichelte Linien) bewirkte eine Veränderung in der prozentualen Zusammensetzung und der Beginn der Umlagerung erfolgte bei einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck. Das Hämocyanin lag bei niedrigem P_{O_2} zu ca. 85 % in der *T* und zu ca. 15 % in der *S*-Konformation vor. Das Verhältnis verschob sich bei hohem P_{O_2} zugunsten der *R*-Konformation (ca. 95 %). Die restlichen 5 % entfielen auf die *S*-Konformation.

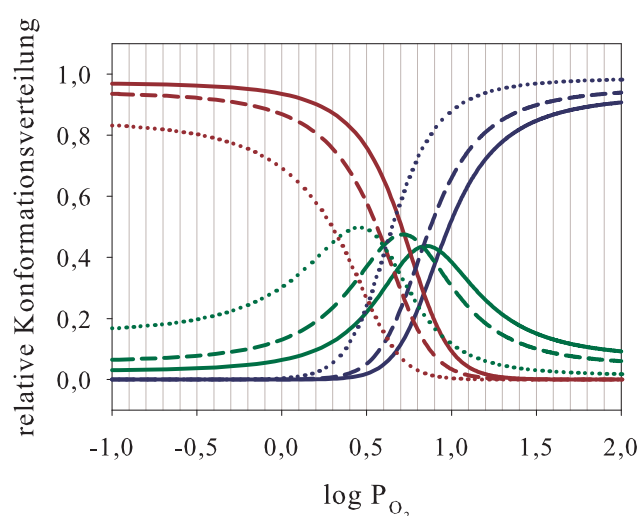


Abbildung 4.14: Relative Konformationsverteilung des Hämocyanins der Europäischen Languste in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Analysegruppe V: Hämocyaninlösung mit 20 mM Ca^{2+} + 50 mM Mg^{2+} (durchgezogene Linien); Hämocyaninlösung mit 20 mM Ca^{2+} + 500 mM Na^+ (gestrichelte Linien); Hämocyaninlösung mit 50 mM Mg^{2+} + 500 mM Na^+ (gepunktete Linien). Konformation *R* = blau; Konformation *S* = grün; Konformation *T* = rot

In Abb. 4.14 ist die relative Konformationsverteilung in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks für die Analysegruppe V dargestellt. In dieser Analysegruppe sind die Hämocyaninlösungen zusammengefasst, denen jeweils zwei unterschiedliche Ligandenkombinationen zugegeben waren (vgl. Tabelle 2.4). Bei allen Varianten dominierte die *T*-Konformation im Bereich geringer Sauerstoffkonzentrationen. Die *R*-Konformation überwog bei hohen Sauerstoffpartialdrücken. Das Verhältnis der Konformationen zueinander war von der jeweiligen Ionenzusammensetzung der Hämocyaninlösung abhängig. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck und Zugabe von 20 mM Ca^{2+} und 50 mM Mg^{2+} zur Hämocyaninlösung (durchgezogene Linien) betrug das prozentuale Verhältnis der *T*-Konformation zur *S*-Konformation 95 : 5, bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} und 500 mM Na^+ (gestrichelte Linien) 90 : 10 und bei Zugabe von 50 mM Mg^{2+} und 500 mM Na^+ (gepunktete Linien) 82 : 18. Bei hoher Sauerstoffkonzentration war die *T*-Konformation bei

allen Varianten nicht mehr vorhanden. Das prozentuale Verhältnis der *R*-Konformation zur *S*-Konformation betrug 90 : 10 bei einer mit 20 mM Ca^{2+} und 50 mM Mg^{2+} angereicherten Hämocyaninlösung, 95 : 5 bei einer mit 20 mM Ca^{2+} und 500 mM Na^+ und 100 : 0 bei einer mit 50 mM Mg^{2+} und 500 mM Na^+ angereicherten Hämocyaninlösung. Auch der für den Umlagerungsprozess benötigte Sauerstoffpartialdruck wurde von der Ionenzusammensetzung der Hämocyaninlösung beeinflusst. Die Zugabe von 50 mM Mg^{2+} und 500 mM Na^+ zum Hämocyanin bewirkte, dass ab einem Sauerstoffpartialdruck von ca. 0,4 Torr die Umlagerung der Hämocyaninmoleküle von der *T* in die *S*-Konformation begann. Die *S*-Konformation erreichte ihr Maximum bei einem Sauerstoffpartialdruck von 2,5 Torr und ab ca. 20 Torr lagen die Moleküle zu über 98 % in der *R*-Konformation vor. Wie in Abb. 4.14 gezeigt, bewirkte die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen eine Verschiebung des Umlagerungsprozesses hin zu höheren Sauerstoffpartialdrücken. So lagerte sich die *T*-Konformation bei Zugabe von 20 mM Ca^{2+} und 500 mM Na^+ zur Hämocyaninlösung erst ab einem P_{O_2} von ca. 0,6 Torr und in Anwesenheit von 20 mM Ca^{2+} und 50 mM Mg^{2+} ab ca. 1,25 Torr in die *S*-Konformation um. Die *S*-Konformation wurde bei einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 3,9 Torr und 6,3 Torr (Hämocyanin mit 20 mM Ca^{2+} + 500 mM Na^+) bzw. 5,6 Torr und 8,9 Torr (Hämocyanin mit 20 mM Ca^{2+} + 50 mM Mg^{2+}) die dominierende Konformation. In beiden Fällen war der Umlagerungsprozess hin zur *R*-Konformation erst bei ca. 35 Torr beendet.

Die ITC-Versuche zeigten, dass die Ca^{2+} -, die Mg^{2+} und die Na^+ -Ionen um einen Bindungsplatztyp am Ca^{2+} -, Mg^{2+} und Na^+ -ionenfreien hexameren Hämocyanin von *Palinurus elephas* konkurrieren. Zudem wird ein zusätzlicher Bindungsplatztyp für die Ca^{2+} -Ionen erst durch die Anlagerung der Mg^{2+} und/oder Na^+ -Ionen gebildet. Die Kombination dieser Ergebnisse mit denen aus den Sauerstoffbindungsstudien weist darauf hin, dass die Besetzung der beiden unterschiedlichen Bindungsplatztypen durch Ca^{2+} -Ionen entgegengesetzte Auswirkungen auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins hat. Im Rahmen der allosterischen Modellvorstellungen erfolgt hierzu eine nähere Erörterung.

4.4 Allosterische Modellvorstellungen

Die Ergebnisse der isothermen titrationskalorimetrischen Versuche und der Sauerstoffbindungsstudien deuten auf ein komplexes allosterisches Bindungsverhalten zwischen Sauerstoff, dem Effektor Urat, den divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} und dem Hämocyanin von *Palinurus elephas* hin. Nach der Idee des Three-State-MWC-Modells kann das Sauerstofftransportpigment in drei unterschiedlichen allosterischen Konformationen - *R*, *S* und *T* - vorliegen. Die Bindungsstudien zeigten, dass die Sauerstoffaffinität zum *R*-Zustand am größten ist, an die *T*-Konformation bindet der Sauerstoff mit der niedrigsten Affinität. Die prozentuale Verteilung der Konformationen ist vom Sauerstoffpartialdruck und von

den am Hämocyanin gebundenen Liganden abhängig. Sie konnte durch die Sauerstoffbindungsstudien bestimmt werden.

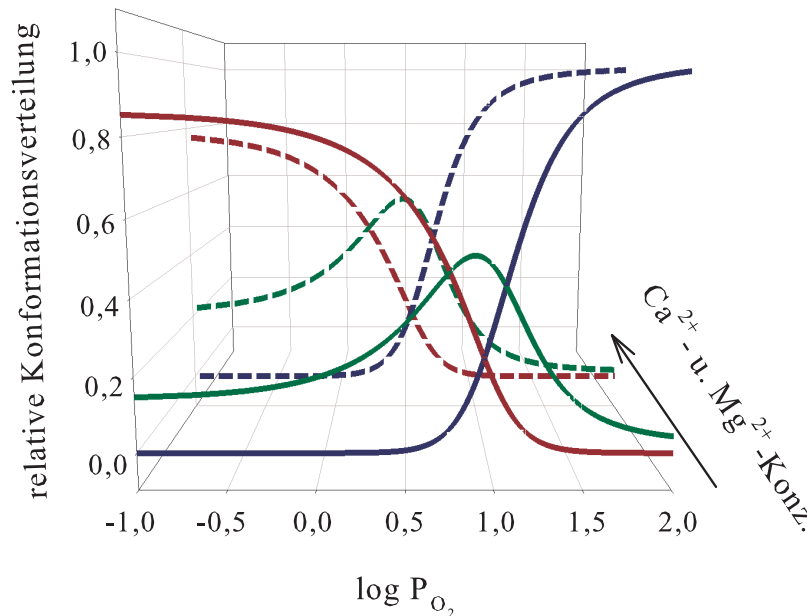


Abbildung 4.15: Allosterisches Modell des Bindungsverhaltens der Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen an das hexamere, Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-ionenfreie Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*). Auftragung der relativen Konformationsverteilung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration in An- und Abwesenheit der Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen. Durchgezogene Linien: ohne Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen; gestrichelte Linien: mit Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen. R-Konformation = blau; S-Konformation = grün; T-Konformation = rot

Anhand der ITC-Versuche wurde nachgewiesen, dass die divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ um einen Bindungsplatztyp am hexameren, Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-ionenfreien Hämocyanin von *Palinurus elephas* konkurrieren. Die Ca²⁺-Ionen können zusätzlich noch an einen weiteren spezifischen Bindungsplatztyp am hexameren Hämocyanin binden. Letzterer entsteht jedoch erst durch eine Strukturänderung des Hämocyanins, die durch Besetzung der gemeinsamen Bindungsstellen für Kationen induziert wird. Um dieses Ergebnis in die allosterische Modellvorstellung mit einzubeziehen, werden beide Situationen getrennt betrachtet. Abb. 4.15 zeigt ein aus den Daten dieser Arbeit gewonnenes allosterisches Modell für die Bindung der divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ an die gemeinsamen Bindungsplätze. Wie im vorhergehenden Kapitel dargestellt, verändert das Hämocyanin seine Konformation bei zunehmendem Sauerstoffpartialdruck. Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem Three-State-MWC-Modell ergab desweiteren, dass die Konformation von den am Hämocyanin gebundenen Liganden abhängig ist. So liegt bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 0,3 Torr, wie in Abb. 4.15 dargestellt, das hexamere, Ca²⁺-, Mg²⁺- und Na⁺-ionenfreie Hämocyanin (durchgezogene Linien) zu ca. 80 % in der T- und zu ca. 20 % in der S-Konformation vor. Die Anlagerung der Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen an

die gemeinsamen Bindungsplätze (gestrichelte Linien) führt zu keiner Veränderung in der relativen Konformationsverteilung. Die Sauerstoffbindungskonstante für die Bindung an die T -Konformation beträgt $k_{T_3}^I = 0,020 \pm 0,017 \text{ Torr}^{-1}$. An die S -Konformation bindet Sauerstoff mit einer um das 4,5-fache erhöhten Bindungskonstante ($k_{S_3}^I = 0,090 \pm 0,036 \text{ Torr}^{-1}$). Erst bei einer Sauerstoffkonzentration ab ca. 0,3 Torr bewirkt die Anlagerung von Ca^{2+} und/oder Mg^{2+} an das Hämocyanin eine Konformationsänderung von der T - in die S - bzw. von der S - in die R -Konformation. Die relative Verteilung zwischen den Konformationen ist vom Sauerstoffpartialdruck abhängig und verschiebt sich bei Erhöhung der Sauerstoffkonzentration zugunsten der R -Konformation. Die R -Konformation besitzt die höchste Sauerstoffaffinität. Die Bindungskonstanten betragen $k_{R_3}^{II} = 1,284 \pm 0,423 \text{ Torr}^{-1}$ bei Besetzung der gemeinsamen Bindungsstellen mit Ca^{2+} -Ionen und $k_{R_3}^{III} = 1,764 \pm 0,442 \text{ Torr}^{-1}$ bei Bindung von Mg^{2+} -Ionen. Wie in Kapitel 3.3.4 ausgeführt unterscheiden sich $k_{R_3}^{II}$ und $k_{R_3}^{III}$ nicht signifikant voneinander. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck wird somit die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins, durch Bindung von Ca^{2+} und Mg^{2+} an ihren gemeinsamen Bindungsplätzen und eine hiermit einhergehende Konformationsänderung hin zu höheraffinen Formen, erhöht. Bei einem Sauerstoffpartialdruck von über 100 Torr hat die Bindung der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen keine Auswirkung mehr auf die relative Konformationsverteilung des Hämocyanins. Es liegt dann mit und ohne die Bindung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu über 95 % in der R -Konformation vor.

In Abb.4.16 ist das aus den Daten dieser Arbeit gewonnene allosterische Modell für die Bindung der Ca^{2+} -Ionen an ihre spezifischen Bindungsplätze am Hämocyanin von *Palinurus elephas* dargestellt. Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven mit dem Three-State-MWC-Modell zeigte, dass die relative Konformationsverteilung auch durch die Bindung der Ca^{2+} -Ionen an ihre spezifischen Bindungsplätze beeinflusst wird. Im Unterschied zur Bindung der Ca^{2+} -Ionen an die zuvor erörterten Bindungsplätze, die ebenso von Mg^{2+} -Ionen besetzt werden können, erzeugt die Anlagerung der Ca^{2+} -Ionen an die spezifischen Bindungsstellen eine Konformationsänderung, die zu einer Abnahme der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins führt. Bei geringem Sauerstoffpartialdruck und unbesetzten Ca^{2+} -spezifischen Bindungsstellen liegt das Hämocyanin von *Palinurus elephas* zu ca. 80 % in der T - und zu ca. 20 % in der S -Konformation vor. Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen bewirkt, wie Abb. 4.16 zeigt, eine Umlagerung von der S - zur T -Konformation, so dass 100 % der Hämocyaninmoleküle in der niederaffinen T -Konformation vorliegen. Die Sauerstoffbindungskonstante der T -Konformation beträgt $k_{T_3}^V = 0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$, die der S -Konformation $k_{S_3}^V = 0,186 \pm 0,044 \text{ Torr}^{-1}$. Die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks bewirkt beim Hämocyanin, dessen Ca^{2+} -spezifische Bindungsstellen nicht besetzt sind, eine vermehrte Umlagerung der T - in die S -Konformation. Ab einem Sauerstoffpartialdruck von ca. 2,5 Torr geht das Molekül zunehmend von der T - über die S - in die R -Konformation über, letztere liegt bei hohem P_{O_2} zu 100 % vor. Die R -Konformation besitzt mit einer Bindungskonstante von $k_{R_3}^V = 1,822 \pm 0,395 \text{ Torr}^{-1}$ die höchste Sauerstoffaffini-

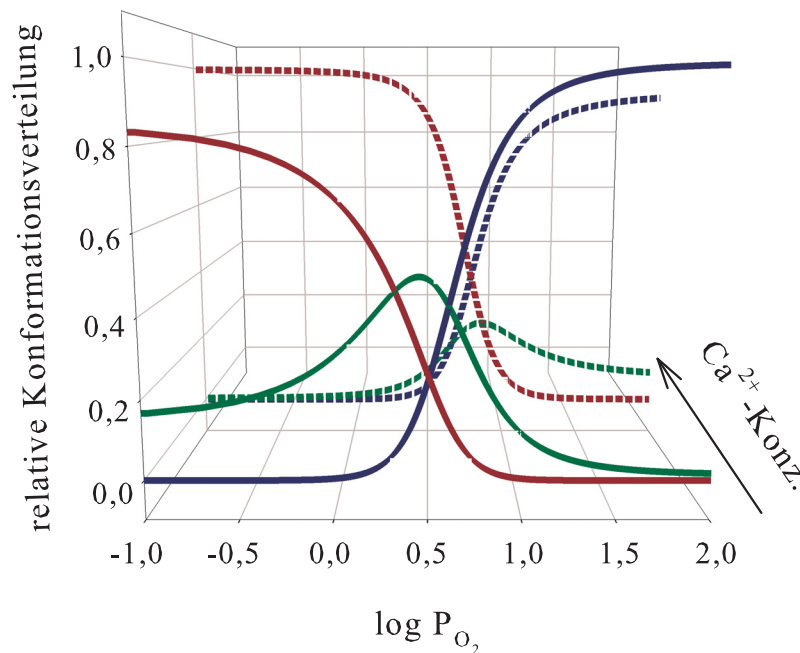


Abbildung 4.16: Allosterisches Modell des Bindungsverhaltens der Ca^{2+} -Ionen an die spezifischen Bindungsplätze am hexameren Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*). Auftragung der relativen Konformationsverteilung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration in An- und Abwesenheit der Ca^{2+} -Ionen. Durchgezogene Linien: ohne Ca^{2+} -Ionen; gestrichelte Linien: mit Ca^{2+} -Ionen. R -Konformation = blau; S -Konformation = grün; T -Konformation = rot

tät. Die Besetzung der spezifischen Bindungsstellen durch Ca^{2+} -Ionen bewirkt bei einem in der R -Konformation vorliegenden Molekül eine Änderung zur S -Konformation und bei einem in der S -Konformation befindlichen die Umlagerung in die T -Konformation, wobei die Quantität der Umlagerung mit zunehmendem Sauerstoffpartialdruck abnimmt. Wie Abb. 4.16 zeigt, treten bei hoher Sauerstoffkonzentration durch die Ca^{2+} -Ionenbindung noch ca. 10 % der im R -Zustand befindlichen Hämocyaninmoleküle in die S -Konformation über.

In Abb. 4.17 ist das aus den Daten der vorliegenden Arbeit gewonnene allosterische Bindungsmodell für die Bindung des Effektors Urat an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* dargestellt. Die relative Verteilung der R -, T - und S -Konformation ist vom Sauerstoffpartialdruck abhängig. Bei geringem P_{O_2} liegt das Hämocyaninmolekül in der T -Konformation vor, an die Sauerstoff mit einer Bindungskonstante von $k_{T_3}^{\text{O}_2} = 0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$ bindet. Urat, das zwei Bindungsplätze am Hämocyanin besitzt, bindet an die T -Konformation mit geringer Affinität, die Bindungskonstante beträgt $k_{\text{hyp}}^{\text{Urat}} = 16,13 \pm 2,90 \text{ mM}^{-1}$ (siehe Tabelle 3.14). Hierdurch erfährt das Makromolekül eine Umlagerung von der T - in die S - und R -Konformation. Die relative Verteilung zwischen der S - und der R -Konformation ist in diesem Bereich vom Sauerstoffpartialdruck abhängig und ver-

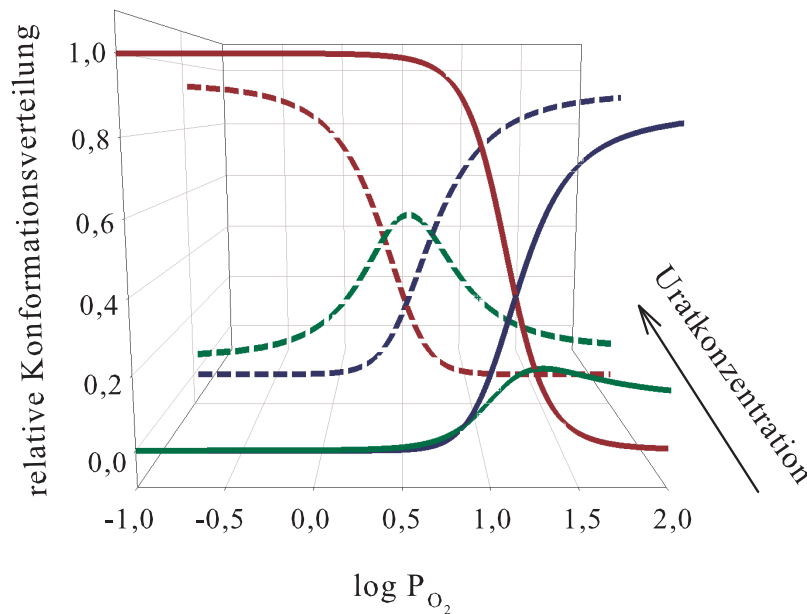


Abbildung 4.17: Allosterisches Modell des Bindungsverhaltens von Urat an das Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*). Auftragung der relativen Konformationsverteilung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration in An- und Abwesenheit des Modulators. ohne Urat: durchgezogene Linien; mit Urat: gestrichelte Linien. *R*-Konformation = blau; *S*-Konformation = grün; *T*-Konformation = rot

schiebt sich bei Erhöhung der Sauerstoffkonzentration zugunsten der *R*-Konformation. Die Sauerstoffbindungskonstanten der *S*- und *R*-Konformationen sind mit $k_{S_3}^{VI} = 0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$ und $k_{R_3}^{VI} = 1,792 \pm 0,427 \text{ Torr}^{-1}$ um das 10- bzw. 45-fache höher als die der *T*-Konformation. Durch die Bindung von Urat und die dadurch induzierte Umlagerung wird somit die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck erhöht. Bei hoher Sauerstoffkonzentration liegt das Hämocyanin mit und ohne Urat zu über 80 % in der *R*-Konformation vor. Der restliche prozentuale Anteil entfällt auf die *S*-Konformation. Die Bindung des natürlichen Modulators Urat an das Hämocyanin bewirkt hier keine Änderung in der Hämocyaninkonformation. Eine durch Urat induzierte Konformationsänderung beschrieb auch Pott (2006) beim Hämocyanin des Europäischen Hummers.

4.5 Thermodynamische Analyse der Ligandenbindungen

Die Bestimmung der Reaktionsenthalpie (ΔH^0) und der Reaktionsentropie (ΔS^0) für die Bindung der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie des natürlichen Modulators Urat und seines Strukturanalogons Koffein an das Hämocyanin der Europäischen Languste er-

folgte anhand der isothermen titrationskalorimetrischen Versuche. Aus diesen Parametern kann die freie Gibbs'sche Energie ΔG^0 (freie Reaktionsenthalpie) berechnet werden, die sich aus enthalpischen und entropischen Anteilen zusammensetzt und die Gleichgewichtslage einer Reaktion angibt (siehe Formel 1.1).

Die Auswertung der Bindungsisotherme für die Anlagerung des natürlichen Modulators Urat an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Hämocyaninkonformation mit dem Non-Interacting-Site-Modell ergab eine Entropie von $T\Delta S_{\text{Urat}}^0 = -11,09 \pm 2,36$ kJ mol⁻¹ und eine Enthalpie von $\Delta H_{\text{Urat}}^0 = -36,01 \pm 1,98$ kJ mol⁻¹. Die Bindung war enthalpiegetrieben, da sie trotz des ungünstigen Entropiebeitrages durch den negativeren Enthalpiewert begünstigt war. Gleiches galt für die enthalpiebegünstigte Bindung des artifiziellen Effektors Koffein. Die berechneten Entropie- und Enthalpiewerte wichen jedoch von den für Urat bestimmten signifikant ab ($\Delta H_{\text{Koffein}}^0 = -57,07 \pm 2,42$ kJ mol⁻¹, $T\Delta S_{\text{Koffein}}^0 = -30,42 \pm 2,53$ kJ mol⁻¹). Der entropische Beitrag zur Ligandenbindung war bei Koffein um das Dreifache niedriger als bei Urat. Durch die höhere Bindungsaffinität des Koffeins zum Hämocyanin, die in einem höheren Enthalpiewert zum Ausdruck kommt, wird die Rotationsfreiheit des Liganden stärker eingeschränkt als bei der Uratbindung und die Entropie entsprechend vermindert (Eftink et al., 1983).

Die freie Reaktionsenthalpie wies bei Bindung von Urat oder Koffein an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation nur einen geringen Unterschied auf. Sie betrug für Urat $\Delta G_{\text{Urat}}^0 = -24,92 \pm 0,39$ kJ mol⁻¹ und für Koffein $\Delta G_{\text{Koffein}}^0 = -26,63 \pm 0,18$ kJ mol⁻¹. Als Ursache hierfür kann die schon häufig beschriebene Entropie-Enthalpie-Kompensation gesehen werden (Lumry und Rajender, 1970; Eftink et al., 1983; McPhail und Cooper, 1997; Baxa et al., 2001). So besitzen ΔS^0 und ΔH^0 die Tendenz sich zu kompensieren. In Abb. 4.18 ist dieses Phänomen für die berechneten Werte dieser Arbeit graphisch verdeutlicht. Eine Begründung der häufig auftretenden Entropie-Enthalpie-Kompensation lieferten Cooper et al. (2001). Sie erkannten, dass die ITC-Messungen typischerweise in einem für die freie Energie begrenzten Versuchsfenster durchgeführt werden, wodurch ΔG^0 relativ konstant bleibt und die lineare Abhängigkeit zwischen Entropie und Enthalpie aus der Formel 1.1 abzuleiten ist. Demgemäß wies auch die freie Reaktionsenthalpie für die Bindung von Urat bzw. Koffein an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation mit $\Delta G_{\text{hypUrat}}^0 = -23,65 \pm 0,46$ kJ mol⁻¹ und $\Delta G_{\text{hypKoffein}}^0 = -25,98 \pm 0,17$ kJ mol⁻¹ keine signifikanten Unterschiede zu den unter normoxischen Bedingungen bestimmten Werte auf.

Bei Bindung von Urat oder Koffein an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Hämocyaninkonformation verminderte sich die den Bindungsprozess initiiierende Enthalpieänderung auf $\Delta H_{\text{hypUrat}}^0 = -13,20 \pm 0,21$ kJ mol⁻¹ für Urat und $\Delta H_{\text{hypKoffein}}^0 = -27,89 \pm 1,04$ kJ mol⁻¹ für Koffein. Die bindungsbedingte Entropieänderung wurde mit Werten von $T\Delta S_{\text{hypKoffein}}^0 = -1,91 \pm 1,04$ kJ mol⁻¹ für Koffein und $T\Delta S_{\text{hypUrat}}^0 = 10,45 \pm 0,59$

kJ mol^{-1} für Urat günstiger (vgl. Tabelle 3.2 und 3.4). Die Bindung von Urat an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation war somit entropie- und enthalpiegetrieben. Hingegen wurde für die Koffeinbindung die günstige Entropie durch die hohe Reaktionsenthalpie kompensiert, sodass die Bindung insgesamt enthalpiegetrieben war. Wie in Kapitel 4.4 ausgeführt, bewirkte die Bindung der beiden Effektoren an das Hämocyanin von *Palinurus elephas* unter hypoxischen Bedingungen eine Konformationsänderung, die vermutlich zu einer Freisetzung von Wassermolekülen und zu einer weniger dichten Molekülstruktur führte. Die hieraus resultierende Erhöhung der Freiheitsgrade des Hämocyanins führt zu der Erhöhung des entropischen Bindungsbeitrages (Eftink und Biltonen, 1980; Griko und Remeta, 1999).

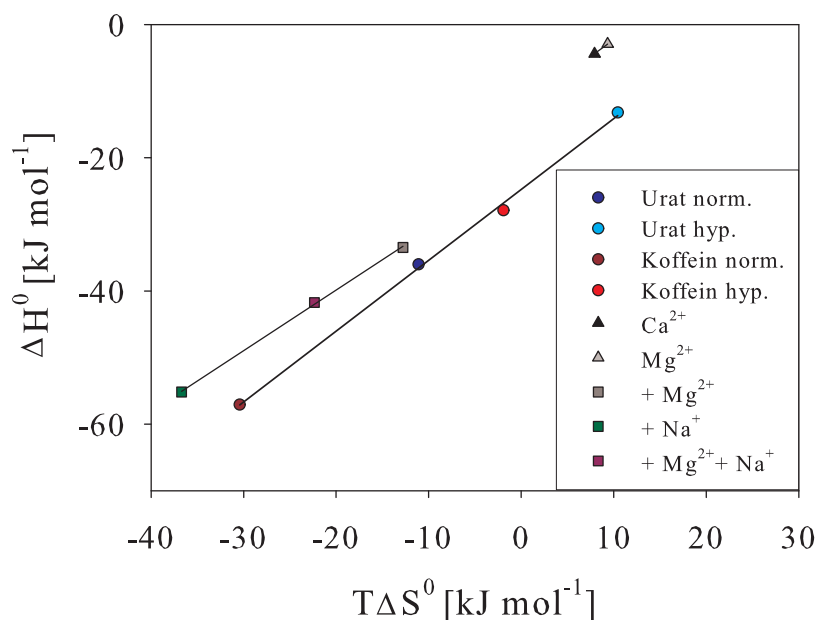


Abbildung 4.18: Entropie-Enthalpie-Kompensation: ●- der Urat- und Koffeinbindung an die unter normoxischen (norm.) und hypoxischen (hyp.) Bedingungen dominierende Konformation; △- der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionenbindung an Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -freies hexamerer Hämocyanin; ■ - der Ca^{2+} -Ionenbindung an Mg^{2+} -haltiges (grau) bzw. Na^+ -haltiges (grün) bzw. Mg^{2+} - und Na^+ -haltiges (violett) hexamerer Hämocyanin der Europäischen Languste. - Lineare Regression

Für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an hexamerer Hämocyanin der Europäischen Languste existieren zwei verschiedene Bindungsplatztypen. Wie in Kapitel 4.2 erörtert, können an einem der beiden Bindungsplatztypen auch Mg^{2+} -Ionen binden. An den zweiten Bindungsplatztyp, der erst durch die Anlagerung von Na^+ - und/oder Mg^{2+} -Ionen und der damit einhergehenden Strukturveränderung des Hämocyanins gebildet wird, binden ausschließlich Ca^{2+} -Ionen. In Abb. 4.18 ist die Entropie-Enthalpie-Kompensation für beide Bindungsplatztypen gezeigt. Sie weisen unterschiedliche Energieniveaus auf. So liegt die Bindung an den Bindungsplatztyp, um den Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen konkurrieren (Abb. 4.18: △), in einem höheren Energiebereich als die Bindung an den Ca^{2+} -spezifischen Bin-

dungsplatztyp (Abb. 4.18: ■). Die Besetzung beider Bindungsplatztypen erfolgte exotherm.

Entropie- und enthalpiebegünstigt war die Bindung der divalenten Kationen an ihren gemeinsamen Bindungsplatztyp (vgl. Tabelle 3.5), wobei $T\Delta S^0$ für Mg^{2+} mit $T\Delta S_{Mg^{2+}}^0 = 9,35 \text{ kJ mol}^{-1}$ höher war als der entsprechende Wert der Ca^{2+} -Ionen ($T\Delta S_{Ca^{2+}}^0 = 7,94 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die den Bindungsprozess initiiierende Enthalpieänderung lag hingegen für die Ca^{2+} -Bindung mit $\Delta H_{Ca^{2+}}^0 = -4,39 \pm 0,27 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant über der der Mg^{2+} -Bindung ($\Delta H_{Mg^{2+}}^0 = -2,93 \pm 0,23 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die divalenten Kationen sind in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben. Durch die Anlagerung von Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen an das Hämocyanin werden vermutlich Wassermoleküle freigesetzt, was zu der positiven Entropieänderung führt (Tanokura und Yamada, 1993; Gilli et al., 1998). Die Wassermoleküle stammen zum überwiegenden Teil von der das Ion umgebenden Hydrathülle und zu einem geringen Teil vom Hämocyaninmolekül (Kuroki et al., 1992). Da die Mg^{2+} -Ionen in wässriger Lösung von einer größeren Hydrathülle umgeben sind (Kielland, 1937), wird durch deren Anlagerung mehr Wasser freigesetzt und eine höhere Entropieänderung hervorgerufen. Die freie Enthalpie der Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Bindung unterschied sich aufgrund der schon zuvor beschriebenen Entropie-Enthalpie-Kompensation nicht voneinander ($\Delta G_{Ca^{2+}}^0 = -12,33 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{Mg^{2+}}^0 = -12,28 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Die Bindung der Ca^{2+} -Ionen an ihren spezifischen Bindungsplatztyp am Hämocyanin von *Palinurus elephas* war enthalpiegetrieben (vgl. Tabelle 3.6). Im Vergleich zur Bindung an die unspezifischen Bindungsplätze wurde der enthalpische Beitrag signifikant erhöht und die Entropieänderung signifikant vermindert. Entsprechend der gebundenen Kationen und der dadurch hervorgerufenen Strukturänderung des Hämocyanins lag die Enthalpie bei $\Delta H_{Ca^{2+}}^{0Mg} = -33,47 \pm 2,99 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{Ca^{2+}}^{0MgNa} = -41,73 \pm 3,95 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{Ca^{2+}}^{0Na} = -55,18 \pm 15,49 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Entropie verminderte sich auf Werte von $T\Delta S_{Ca^{2+}}^{0Mg} = -12,77 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{Ca^{2+}}^{0MgNa} = -22,34 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S_{Ca^{2+}}^{0Na} = -36,70 \text{ kJ mol}^{-1}$. Durch die Bindung von Na^+ und/oder Mg^{2+} -Ionen wird zum einen das Hämocyanin in seiner Struktur derart verändert, dass ein zusätzlicher Bindungsplatztyp für Ca^{2+} -Ionen gebildet wird. Zum anderen wird das Molekül wahrscheinlich enthalpisch stabilisiert und die durch die Ca^{2+} -Ionenbindung bewirkte Freisetzung von Wassermolekülen auf die das Ion umgebende Hydrathülle beschränkt (Kuroki et al., 1992). Wie Abb. 4.18 zeigt, konnte auch hier eine Entropie-Enthalpie-Kompensation beobachtet werden (■).

4.6 Physiologische Betrachtungen

Die Palinuridae gehören zu den Oxyregulatoren, deren Sauerstoffaufnahme bis zu einem kritischen Sauerstoffpartialdruck (P_c) unabhängig vom Sauerstoffangebot im Habitat ist.

Hingegen ist die Sauerstoffaufnahme der Oxykonformer vom P_{O_2} der Umgebung direkt abhängig (Lockwood, 1968; Winget, 1969). Zu den Oxykonformern wird z.B. die Familie der Homarus gezählt (Thomas, 1954; Wolvekamp und Waterman, 1960). Winget (1969) bestimmte den kritischen Sauerstoffpartialdruck für die kalifornische Languste mit 2,5 Torr. Falls der P_{O_2} des Habitats unter den P_c fällt, wird auch die Languste zum Oxykonformer (Lockwood, 1968). Um eine konstante Stoffwechselrate selbst bei sinkendem äußeren Sauerstoffpartialdruck aufrecht zu erhalten, wurden unterschiedliche Mechanismen entwickelt, die letztendlich nur ein Teil einer komplexen und aufeinander abgestimmten Antwort sind (McMahon, 2001). Hierzu gehört z.B. die Erhöhung des Ventilationsvolumens durch erhöhte Scaphognathittätigkeit (Lockwood, 1968). Auch eine Effektivitätssteigerung in der Sauerstoffaufnahme des Hämocyanins zählt dazu. Letztere kann durch Liganden, wie Urat, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen, die die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen, erreicht werden (McMahon, 2001).

Urat, ein Metabolit des katabolen Purinstoffwechsels, wird durch die Uricase zu Allantoin oxidiert und über die Allantoinsäure und Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut (Claybrook, 1983). Da die Uricase zur Oxidation von Urat Sauerstoff als Co-Substrat benötigt (Dykens, 1991), akkumuliert Urat unter hypoxischen Bedingungen in der Hämolymphe dekapoder Crustaceen (Lallier et al., 1987; Lallier und Truchot, 1989a). Auch unter normoxischen Bedingungen konnte Urat in der Hämolymphe nachgewiesen werden. So wurde beim Flusskrebs *Astacus leptodactylus* eine Uratkonzentration von $106 \mu\text{M}$ gemessen (van de Meer, 2004). Zeis (1994) bestimmte für den Europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*) eine normoxische Uratkonzentration von ca. $20 \mu\text{M}$ und beim Taschenkreb (*Cancer pagurus*) konnten $25 \mu\text{M}$ Urat nachgewiesen werden (Regnault, 1992). Unter hypoxischen Bedingungen stieg die Uratkonzentration in der Hämolymphe dieser Crustaceen linear an und erreichte nach 8 Stunden beim *Astacus leptodactylus* einen Wert von $369 \mu\text{M}$ (van de Meer, 2004). Der Europäische Hummer wies nach 4-stündiger Hypoxie eine Uratkonzentration von $80 \mu\text{M}$ auf (Zeis, 1994) und bei *Cancer pagurus* wurden nach 6-stündiger Hypoxie $73 \mu\text{M}$ Urat in der Hämolymphe gemessen (Regnault, 1992). Als Antwort auf eine biotopbedingte Hypoxie konnte u.a. in *Carcinus maenas* (Lallier et al., 1987), *Penaeus japonicus* (Lallier und Truchot, 1989b) und *Callinectes sapidus* (DeFur et al., 1990) ein linearer Anstieg der Uratkonzentration in der Hämolymphe nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen dokumentierten auch Huang und Chen (2001) bei Versuchen mit der Japanischen Languste (*Panulirus japonicus*). Unter Normoxie bestimmten sie die Uratkonzentration in der Hämolymphe mit $170 \mu\text{M}$ bei einer Temperatur von 15°C und 25°C . Die Uratkonzentration stieg unter biotopbedingter Hypoxie linear an. Sie betrug nach 48 Stunden und 15°C $470 \mu\text{M}$, bei 24-stündiger Hypoxie und 25°C $1,87 \text{ mM}$.

Diese Studien zeigten, dass unter biotopbedingter Hypoxie die Uratkonzentration in der Hämolymphe dekapoder Krebse ansteigt. Unter funktionsbedingter Hypoxie wurde hingegen beim Flusskrebs *Astacus leptodactylus* kein signifikanter Anstieg der Uratkonzentration in der Hämolymphe nachgewiesen (van de Meer, 2004). Auch Lallier und Walsh (1990) stellten keine Erhöhung der Uratkonzentration in der Hämolymphe der Krabbe *Callinectes sapidus* nach einer 30-minütigen Schwimmphase fest. Für *Palinurus elephas* sind die Uratkonzentrationen in der Hämolymphe weder unter Normoxie noch unter Hypoxie in der Literatur dokumentiert. In der weiteren Betrachtung wird daher davon ausgegangen, dass die Werte denen anderer Palinuridae entsprechen.

Anhand der Ergebnisse der kalorimetrischen Versuche und der Sauerstoffbindungsstudien besteht die Möglichkeit, Simulationen unter physiologischen Bedingungen in Bezug auf die Urat- und Sauerstoffkonzentrationen in der Hämolymphe durchzuführen. In Abb. 4.19 sind diese Simulationen für *Palinurus elephas* unter physiologischen Bedingungen dargestellt. Zur Interpretation der Sauerstoffbindungskurven sind die Sauerstoffpartialdrücke vor und nach der Kiemenpassage erforderlich. Da auch diese Werte für die Europäische Languste in der Literatur nicht dokumentiert sind, werden die P_{O_2} -Werte der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus*) herangezogen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die bei beiden Arten in der Hämolymphe vorherrschenden Sauerstoffpartialdrücke identisch sind. So stimmten die von Wolvekamp und Waterman (1960) gemessenen Werte für den Sauerstoffverbrauch von *Palinurus elephas* mit denen von Winget (1969) für *Panulirus interruptus* dokumentierten überein. Zudem beobachtete Redmond (1955) bei der Kalifornischen Languste, dass die Hämolymphe nach Entnahme an der Luft „blauer“ wurde. Dies führte er auf die unvollständige Sauerstoffsättigung des Hämocyanins nach der Kiemenpassage zurück. Im Rahmen dieser Arbeit trat das gleiche Phänomen auch bei der Hämolymphentnahme bei *Palinurus elephas* auf. Redmond (1955) bestimmte den Sauerstoffpartialdruck vor der Kiemenpassage bei *Panulirus interruptus* mit 3 Torr. Nach der Kiemenpassage lag der P_{O_2} bei 7 Torr.

Die in Abb. 4.19 dargestellte Simulation zeigt, dass das Hämocyanin von *Palinurus elephas* ohne Bindung des natürlichen Modulators Urat vor der Kiemenpassage zu 12 % und nach der Kiemenpassage zu 56 % mit Sauerstoff beladen ist. Die Differenz von 44 % wird an das Gewebe abgegeben (Abb. 4.19 schwarze Bindungskurve). Unter physiologischen Bedingungen liegt in der Hämolymphe eine Uratgrundkonzentration von 0,17 mM vor (Abb. 4.19 blaue Bindungskurve). Hierdurch kommt es zu einer maximalen Entladung des Hämocyanins von 54 %. Die Uratgrundkonzentration ist unter Normoxie und bei einer Temperatur von 20 °C ausreichend, um die Funktion des Hämocyanins als Sauerstofftransportprotein der Europäischen Languste zu gewährleisten. Die Erhöhung der Uratkonzentration unter hypoxischen Bedingungen auf 0,47 mM führt zu einer Verminderung der Entladungskapazität auf 48 % (Abb. 4.19 rote Bindungskurve). Zu bedenken ist, dass die

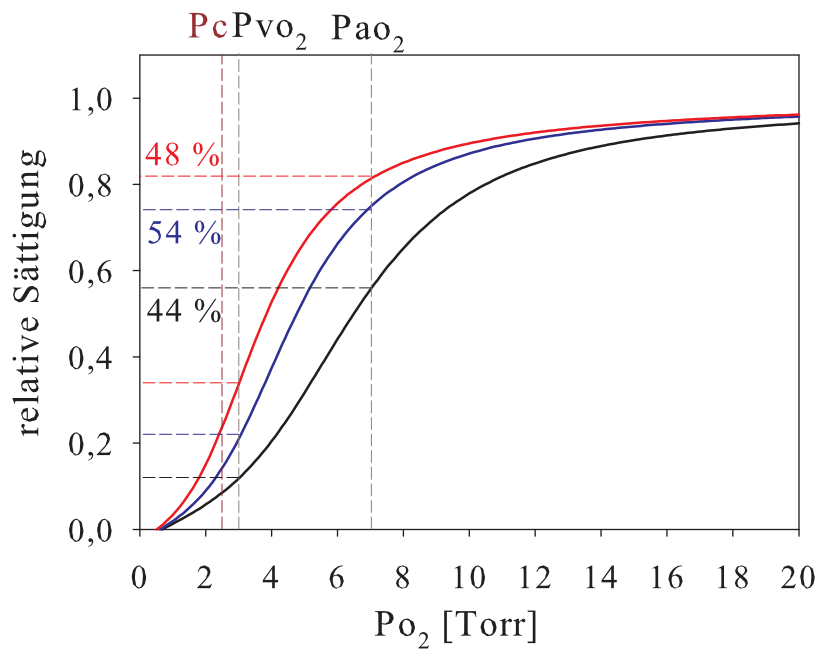


Abbildung 4.19: Sauerstoffbeladungsgrad des Hämocyans der Europäischen Languste unter verschiedenen physiologischen Bedingungen bei 20 °C. Die farbigen Prozentangaben bezeichnen die maximale Sauerstoffentladung des Hämocyans unter den jeweiligen Bedingungen. ohne Urat: schwarze Sättigungskurve; mit 0,17 mM Urat: blaue Sättigungskurve; mit 0,47 mM Urat: rote Sättigungskurve. P_c : kritischer Sauerstoffpartialdruck; P_{vO_2} : Sauerstoffpartialdruck vor der Kiemenpassage; P_{aO_2} : Sauerstoffpartialdruck nach der Kiemenpassage.

Simulation von einer konstanten Hämocyankonzentration in der Hämolymphe ausgeht. Huang und Chen (2001) stellten bei *Panulirus japonicus* jedoch einen temperaturabhängigen linearen Anstieg der Hämocyankonzentration unter Hypoxie fest. Hierdurch könnte die erhöhte Uratkonzentration kompensiert werden, sodass das Hämocyanin auch unter hypoxischen Bedingungen der Europäischen Languste als Sauerstofftransportprotein auf gleich hohem Niveau wie unter Normoxie dient.

Im Unterschied zum Hämocyanin des Europäischen Hummers, das erst unter funktions- oder biotopbedingter Hypoxie an der Sauerstoffversorgung des Tieres beteiligt ist (Menze, 2001), dient das Hämocyanin der Europäischen Languste auch unter Normoxie als Sauerstofftransportprotein. Hier zeigt sich ein Phänomen, das schon des öfteren in der Literatur beschrieben wurde. So nimmt die Bedeutung des Hämocyans für die Sauerstoffversorgung der Gewebe ab, desto höher der Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe nach der Kiemenpassage ist (McMahon und Wilkens, 1983; Truchot, 1992). Der P_{O_2} in der Hämolymphe des *Homarus vulgaris* beträgt nach der Kiemenpassage unter normoxischen Bedingungen ca. 50 Torr (Butler et al., 1978; McMahon et al., 1978). Beim *Panulirus interruptus* wurde an gleicher Stelle nur 7 Torr gemessen (Redmond, 1955).

Die Sauerstoffaffinität des Hämocyans wird zudem durch die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} beeinflusst (Truchot, 1975; Bonaventura und Bonaventura, 1980). In dieser Ar-

beit konnte gezeigt werden, dass die monomeren Untereinheiten des Hämocyanins der Europäischen Languste auch ohne die Anwesenheit von Ca^{2+} und/oder Mg^{2+} -Ionen zu Hexameren aggregieren (siehe Abb. 3.4 A, Tabelle 3.1). Jedoch wird das Pigment erst zu einem effektiven Sauerstofftransportprotein, wenn die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an der Hexamerbildung beteiligt sind. In Abb. 4.20 ist die Sauerstoffbindungskurve des hexameren Ca^{2+} - und Mg^{2+} -ionenfreien Hämocyanins von *Palinurus elephas* aufgetragen (graue Sättigungskurve). Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass das hexamere Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Hämocyanin vor der Kiemenpassage zu 8 % und nach der Kiemenpassage zu 34 % mit Sauerstoff beladen ist. Unter physiologischen Bedingungen wird eine maximale Sauerstoffbeladung von nur 34 % die ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe nicht gewährleisten können. So wurde für das Hämocyanin der Kalifornischen Languste im Ruhezustand schon eine Sauerstoffbeladung nach der Kiemenpassage von 54 % gemessen (Redmond, 1955; Truchot, 1992).

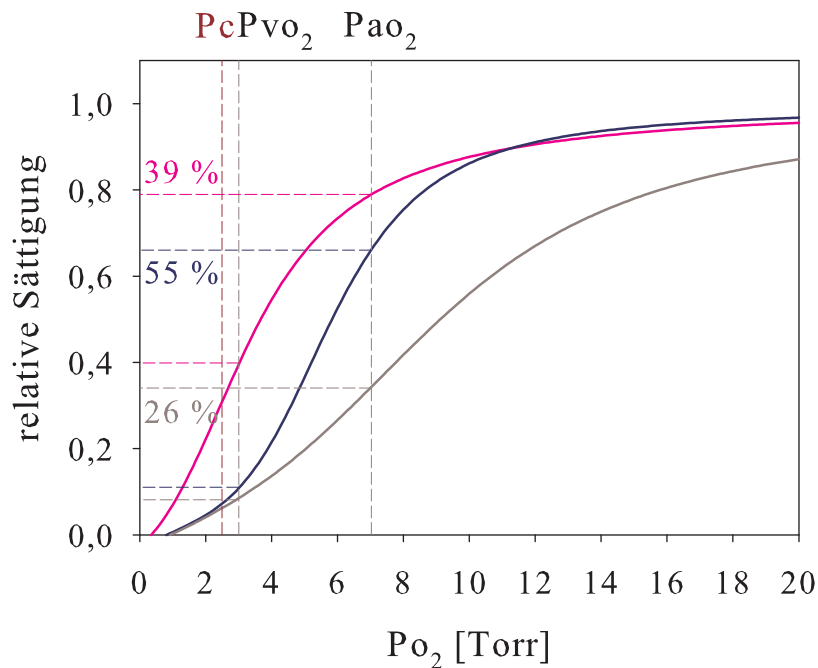


Abbildung 4.20: Sauerstoffbeladungsgrad des Hämocyanins der Europäischen Languste unter verschiedenen physiologischen Bedingungen bei 20 °C. unbesetzte spezifische Ca^{2+} -Bindungsplätze: pinke Sättigungskurve; besetzte spezifische Ca^{2+} -Bindungsplätze: blaue Sättigungskurve; Ca^{2+} - und Mg^{2+} -ionenfreies Hämocyanin: graue Sättigungskurve; Pc: kritischer Sauerstoffpartialdruck; $P_{v\text{O}_2}$: Sauerstoffpartialdruck vor der Kiemenpassage; $P_{a\text{O}_2}$: Sauerstoffpartialdruck nach der Kiemenpassage;

Die ITC-Versuche zeigten, dass die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen um die Bindungsstellen am hexameren Hämocyanin von *Palinurus elephas* konkurrieren. Die Besetzung dieses Bindungsplatztyps durch Ca^{2+} - und/oder Mg^{2+} -Ionen induziert eine Strukturveränderung des Hämocyanins, die Voraussetzung für die Bildung eines weiteren, Ca^{2+} -Ionen spezifischen, Bindungsplatztyps ist (siehe Kapitel 3.2.3). In Abb. 4.20 sind die Sauerstoffbindungskurven für hexameres Hämocyanin, dessen gemeinsame Bindungsstellen für Ca^{2+} - und

Mg²⁺-Ionen besetzt und dessen Ca²⁺-spezifische Bindungsplätze frei sind (Abb. 4.20 pinke Sättigungskurve) und Hämocyanin, an dem beide Bindungsplatztypen gesättigt vorliegen (Abb. 4.20 blaue Sättigungskurve), unter physiologischen Bedingungen simuliert.

Die Bindung der Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen an ihre gemeinsamen Bindungsstellen am Hämocyanin führt im Unterschied zum Ca²⁺- und Mg²⁺-ionenfreien Hämocyanin (Abb. 4.20 graue Sättigungskurve) zu einer erhöhten Sauerstoffbereitstellung für das Gewebe. Das Hämocyanin ist vor der Kiemenpassage zu 40 % und nach der Kiemenpassage zu 79 % mit Sauerstoff beladen (Abb. 4.20 pinke Sättigungskurve). Die Differenz von 39 % wird dem Gewebe zur Verfügung gestellt. Die zusätzliche Bindung von Ca²⁺-Ionen an die spezifischen Bindungsstellen bewirkt eine weitere Erhöhung der Sauerstoffversorgung der Gewebe um ca. 40 % (Abb. 4.20 blaue Sättigungskurve). In diesem Fall ist das Hämocyanin vor der Kiemenpassage mit 11 % und nach der Kiemenpassage zu 66 % mit Sauerstoff beladen. Die Sauerstoffabgabe an das Gewebe beträgt 55 %. Jedoch weisen die Ergebnisse der kalorimetrischen Versuche darauf hin, dass unter normoxischen Bedingungen die Ca²⁺-spezifischen Bindungsstellen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* nicht besetzt sind.

Die Europäische Languste ist ein Osmokonformer (Lucu et al., 2000). In ihrem natürlichen Habitat liegt die Salinität des Wassers bei 3,8 %. Unter diesen Bedingungen konnten Lucu et al. (2000) eine Ca²⁺-Ionenkonzentration von 12,5 mM und eine Mg²⁺-Ionenkonzentration von 34,2 mM in der Hämolymphe nachweisen. Diese Ca²⁺-Konzentration ist nicht ausreichend, um auch die spezifischen Bindungsstellen am Hämocyanin zu belegen.

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Hämocyanin von *Palinurus elephas* zu mehr als 95 % als hexamerer Aggregat vor (Markl et al., 1979). ITC-Versuche mit monomerem Hämocyanin, in das die Ca²⁺- bzw. Mg²⁺-Ionen als Liganden titriert wurden (siehe Kapitel 3.2.4), zeigten, dass die Ca²⁺-Ionen eine höhere Bindungsaffinität zum monomeren Hämocyanin aufweisen als die Mg²⁺-Ionen (siehe Abb. 3.15 A). Jedoch würde eine physiologische Ca²⁺-Ionenkonzentration von 12,5 mM alleine nicht ausreichend sein, um das monomere Hämocyanin zu 100 % zu hexameren Aggregaten zusammenzuschließen. Kalorimetrische Versuche mit monomerem Hämocyanin und Ca²⁺-Ionen als Ligand, die an markanten Stellen unterbrochen und die jeweilige prozentuale Hexamerbildung bestimmt wurde (siehe Abb. 3.16 B), ergaben, dass hierfür eine Ca²⁺-Ionenkonzentration von ca. 32 mM bei einer Hämocyaninkonzentration von 0,68 mM erforderlich ist. Huang und Chen (2001) bestimmten die Hämocyaninkonzentration in der Hämolymphe von *Panulirus japonicus* unter Normoxie mit 0,6 mM. Die physiologische Mg²⁺-Ionenkonzentration von 34,2 mM in der Hämolymphe ist hingegen ausreichend, um alle monomeren Untereinheiten zu Hexameren zusammenzufügen. So wird eine Hämolymphekonzentration von ca. 32 mM Mg²⁺-Ionen benötigt, um 100 % hexamere Aggregate zu erzeugen (siehe Abb.

3.16 A). Aufgrund der höheren Bindungsaffinität zum Hämocyanin kann davon ausgegangen werden, dass zuerst die Ca^{2+} -Ionen an die monomeren Untereinheiten des Pigments binden. Die restlichen gemeinsamen Bindungsplätze werden dann von den Mg^{2+} -Ionen besetzt. Da die spezifischen Ca^{2+} -Bindungsplätze durch die Anlagerung der divalenten Kationen erst entstehen, werden sie unter normoxischen Bedingungen bzw. bei normaler Salinität des Habitats somit nicht besetzt sein.

Bei biotopbedingter Hypoxie konnten Huang und Chen (2001) einen direkten Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Hämolymphe der Japanischen Languste auf Werte bis zu 28 mM nachweisen. Durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration könnten die Ca^{2+} -spezifischen Bindungsstellen besetzt werden. Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins würde, wie in Kapitel 4.3.1 ausgeführt, herabgesetzt und die Sauerstoffabgabe an das Gewebe erleichtert. Zudem würde durch eine Erhöhung des Beladungsgrades an den Kiemen dem Gewebe, wie zuvor dargestellt, 40 % mehr Sauerstoff zur Verfügung gestellt. Die Besetzung der Ca^{2+} -spezifischen Bindungsstellen am Hämocyanin von *Palinurus elephas* und die dadurch hervorgerufene verminderte Sauerstoffaffinität könnte einen direkten Beitrag zur ausreichenden Sauerstoffversorgung unter hypoxischen Bedingungen leisten.

5

Zusammenfassung

Die Sauerstoffbindungseigenschaften des Arthropodenhämocyanins werden über komplexe allosterische Mechanismen reguliert. Bekannt ist, dass eine Vielzahl von Modulatoren die Sauerstoffaffinität des Proteins beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Urat- und Koffein-Bindung an das Hämocyanin der Europäischen Languste (*Palinurus elephas*) mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert. Zudem wurde ihr Einfluss auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Proteins über allosterische Modelle betrachtet und ihre physiologische Bedeutung herausgearbeitet.

Die Sauerstoffaffinität des in seine monomeren Untereinheiten zerfallenen Hämocyanins war mit einem Halbsättigungswert von $P_{50}^{\text{mono}} = 18,65 \pm 1,96$ Torr gering. Durch die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten zu hexameren Aggregaten wurde die Sauerstoffaffinität des Moleküls signifikant erhöht. Die Komplexbildung ist ein endothermer Vorgang, der auch ohne die Beteiligung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen bei pH 8,0 stattfand. Die Sauerstoffbindung an das Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreie Hämocyanin erfolgte kooperativ. Jedoch wurde das Pigment erst zu einem effektiven Sauerstofftransportprotein, wenn die Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen an der Hexamerbildung beteiligt waren.

Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen besetzen identische Bindungsplätze am Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Na^+ -ionenfreien hexameren Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Eine Auswertung mit dem Non-Interacting-Site-Modell ergab für das Ca^{2+} -Ion $n_{\text{Ca}^{2+}} = 61 \pm 2,8$ und für das Mg^{2+} -Ion $n_{\text{Mg}^{2+}} = 49,8 \pm 3,0$ Bindungsplätze. Die differierende Anzahl an Bindungsplätzen kann auf die unterschiedlich großen Hydrathüllen der Ionen zurückgeführt werden. Die Bindungsaffinität war mit $k_{\text{Ca}^{2+}} = 0,16 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$ für Ca^{2+} und $k_{\text{Mg}^{2+}} = 0,15 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$ für Mg^{2+} nicht signifikant unterschiedlich. Die gemeinsamen Bindungsplätze der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen können zudem vom monovalenten Na^+ -Ion besetzt werden. Durch die Besetzung dieser Bindungsplätze wurde die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins signifikant gesteigert und eine Strukturveränderung des hexameren Hämocyanins initiiert, die zur Bildung von $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 4,36 \pm 0,34$ spezifischen Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen mit einer Bindungskonstanten von $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 2,88 \pm 0,28 \text{ mM}^{-1}$ führte. Die Besetzung der

spezifischen Ca^{2+} -Bindungsstellen reduzierte die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins und erhöhte die Sauerstoffversorgung der Gewebe um ca. 40 %.

Die Sauerstoffbindungsdaten konnten mit dem Three-State-MWC-Modell am besten charakterisiert werden. Die Kombination dieser Daten mit den ITC-Daten führte zu der allosterischen Modellvorstellung, dass die Bindung der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen an die gemeinsamen Bindungsplätze unter Hypoxie eine Änderung von der *T*- zur *S*- bzw. von der *S*- zur *R*-Konformation induziert, wodurch die Sauerstoffaffinität erhöht wird. Unter Normoxie führt die Bindung der Ionen zu keiner Konformationsänderung. Hingegen verursacht die Anlagerung der Ca^{2+} -Ionen an die spezifischen Bindungsstellen unter Hypoxie und Normoxie eine entgegengesetzte Konformationsänderung - d.h. von *S*- zur *T*- bzw. *R*- zur *S*-Form - und bewirkt so eine Abnahme in der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins.

Unter Normoxie ist die Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Hämolymphe nicht ausreichend, um die spezifischen Ca^{2+} -Bindungsstellen zu besetzen. Durch eine Konzentrationserhöhung z.B. bei biotopbedingter Hypoxie könnten die Ca^{2+} -spezifischen Bindungsstellen besetzt werden. Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins würde herabgesetzt und eine schnelle Sauerstoffbereitstellung für die Gewebe gewährleistet.

Als weitere Effektoren wurden Urat und sein Strukturanalogon Koffein betrachtet. Sowohl Urat als auch Koffein banden nicht an das monomere Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Erst durch die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten zu hexameren Aggregaten wurden Bindungstaschen ausgebildet, an die beide Modulatoren binden konnten. ITC-Verdrängungsexperimente zeigten, dass Urat und Koffein zwei identische Bindungsplätze besetzen. Die Bindung erfolgte nicht kooperativ.

Die Bindung von Urat an das hexamere Hämocyanin rief eine signifikante Erhöhung in der Sauerstoffaffinität bei gleichzeitiger verminderter Kooperativität hervor. Urat band an die unter Hypoxie dominierende *T*-Konformation mit $k_{\text{hypUrat}} = 16,13 \pm 2,90 \text{ mM}^{-1}$. Hierdurch lagerte sich das Hämocyanin von der *T*- in die *S*-Konformation um und die Sauerstoffaffinität erhöhte sich ($k_{T_3}^{\text{VI}} = 0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$; $k_{S_3}^{\text{VI}} = 0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$). Unter Normoxie dominierte die *R*-Konformation. Die Uratbindung bewirkte keine Konformationsänderung.

Das Hämocyanin dient der Europäischen Languste auch unter Normoxie als Sauerstofftransportprotein. So betrug die maximale Sauerstoffentladung des Hämocyanins an das Gewebe 54 % bei der unter Normoxie vorhandenen Uratgrundkonzentration und einer Temperatur von 20 °C. Die unter biotopbedingter Hypoxie erhöhte Uratkonzentration verursacht keine vermehrte Sauerstoffabgabe ans Gewebe. Die erhöhte Konzentration dient vermutlich dazu, das unter Hypoxie vermehrt vorhandene Hämocyanin mit Urat zu sättigen.

Summary

The characteristics of oxygen binding of arthropod hemocyanin are controlled by complex allosteric mechanisms. It is well-known that a multiplicity of modulators affect the oxygen affinity of the protein. In the present study, the binding of Ca^{2+} , Mg^{2+} , urate and caffeine to the hemocyanin of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) was characterised using isothermal titration calorimetry (ITC). Furthermore, the influence of the oxygen binding of the protein was examined using allosteric models and physiological importance was elaborated.

The oxygen affinity of the hemocyanin which was separated into its monomeric subunits had a low half saturation value of $P_{50}^{\text{mono}} = 18,65 \pm 1,96$ Torr. The aggregation of the monomeric subunits to hexameric molecules significantly enhanced the oxygen affinity. The aggregation is an endothermic process, which occurred without the involvement of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions at pH 8,0. The binding of oxygen to the Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ ion-free hemocyanin was cooperative. However, the pigment only became an effective oxygen carrier when the ions Ca^{2+} or Mg^{2+} were involved in hexamer aggregation.

The Ca^{2+} and Mg^{2+} ions occupy identical binding sites of the Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ free hexameric hemocyanin of *Palinurus elephas*. An analysis with the non-interacting site model showed for the Ca^{2+} ion $n_{\text{Ca}^{2+}} = 61 \pm 2,8$ and for the Mg^{2+} ion $n_{\text{Mg}^{2+}} = 49,8 \pm 3,0$ binding sites. The different number of binding sites can be attributed to differently sized hydration shells. The binding affinity of Ca^{2+} ($k_{\text{Ca}^{2+}} = 0,16 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$) and Mg^{2+} ($k_{\text{Mg}^{2+}} = 0,15 \pm 0,01 \text{ mM}^{-1}$) showed no significant difference. Furthermore, the joint binding sites of the Ca^{2+} and Mg^{2+} can be occupied by the monovalent Na^+ ion. The occupation of these binding sites significantly enhanced the oxygen affinity of the hemocyanin and a structural change of the hexameric hemocyanin was initiated, which lead to the formation of $n_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 4,36 \pm 0,34$ specific binding sites for Ca^{2+} ions with a binding constant of $k_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{MgNa}} = 2,88 \pm 0,28 \text{ mM}^{-1}$. The occupancy of the specific Ca^{2+} binding sites reduced the oxygen affinity of the hemocyanin and increased the oxygen supply of the tissue by approximately 40 %.

The oxygen binding data was characterised best by the three-state MWC model. The combination of this data with the ITC data leads to an allosteric model conception, that the binding of the Ca^{2+} and Mg^{2+} ions to their joint binding sites during hypoxia initiates a conformation change from T to S respectively from S to R , whereby the oxygen affinity is increased. During normoxia the binding of the ions leads to no change in conformation. In contrast to this, the binding of the Ca^{2+} ions to the specific binding sites during hypoxia and normoxia induced a contrary conformation change - i.e. from S to T respectively from R to S - and caused a decrease in the oxygen affinity of hemocyanin.

Under normoxia the Ca^{2+} concentration in the hemolymph is not high enough to occupy all the specific Ca^{2+} binding sites. Through an increase of the concentration, for example during environmental hypoxia, the Ca^{2+} specific binding sites could all be saturated. The oxygen affinity of the hemocyanin would be decreased and a fast oxygen provision for the tissue would be warranted.

As further effectors urate and its structural analogue caffeine were examined. Both urate and caffeine did not bind to the monomeric hemocyanin of *Palinurus elephas*. It was not until the monomeric subunits aggregated to hexameres that a binding pocket was developed, on to which both modulators were able to bind. ITC-displacement tests showed that urate and caffeine occupy two identical binding sites. The binding was not cooperative.

The binding of urate to the hexameric hemocyanin caused a significant increase in oxygen affinity and at the same time a decrease in cooperativity. Urate bound to the during hypoxia dominating *T* conformation with $k_{\text{hypUrat}} = 16,13 \pm 2,90 \text{ mM}^{-1}$. Through this, the hemocyanin transferred from the *T* to the *S* conformation and the oxygen affinity increased ($k_{T_3}^{\text{VI}} = 0,037 \pm 0,008 \text{ Torr}^{-1}$; $k_{S_3}^{\text{VI}} = 0,308 \pm 0,075 \text{ Torr}^{-1}$). During normoxia the *R* conformation dominated. The binding of urate caused no conformation change.

The hemocyanin also serves the European spiny lobster during normoxia as an oxygen carrier. At a basic urate concentration typical for normoxia and a temperature of 20 °C the maximum oxygen released by hemocyanin into the tissue was 54 %. The increased urate concentration during environmental hypoxia caused no increased oxygen release into the tissue. The increased concentration during hypoxia is probably used to saturate the abundantly available hemocyanin with urate.

Literaturverzeichnis

- Adair, G. (1925). The hemoglobin system, VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 63:529–545.
- Altmann, P. L. und Dittmer, D. S. (1971). *Respiration and Circulation*. Bethesda, Maryland: Biological Handbooks. Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Andersson, T., Chiancone, E., und Forsén, S. (1982). Characterization of cation-binding sites on *Panulirus interruptus* hemocyanin by ^{43}Ca and ^{23}Na NMR. *Eur. J. Biochem.*, 125(1):103–108.
- Arisaka, F. und van Holde, K. E. (1979). Allosteric properties and the association equilibria of hemocyanin from *Callinassa californiensis*. *J. Mol. Biol.*, 134:41–73.
- Baxa, U., Cooper, A., Weintraub, A., Pfeil, W., und Seckler, R. (2001). Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein. *Biochemistry*, 40(17):5144–5150.
- Beltramini, M., Colangelo, N., Giomi, F., Bubacco, L., Muro, P. D., Hellmann, N., Jäenicke, E., und Decker, H. (2005). Quaternary structure and functional properties of *Penaeus monodon* hemocyanin. *FEBS J.*, 272(8):2060–2075.
- Bohr, C. (1904a). Die Sauerstoffaufnahme des gemeinen Blutfarbstoffes und des aus dem Blute dargestellten Hämoglobins. *Zentralbl. f. Physiol.*, 23:688–691.
- Bohr, C. (1904b). Theoretische Behandlung der quantitativen Verhältnisse bei der Sauerstoffaufnahme des Hämoglobins. *Zentralbl. f. Physiol.*, 23:682–688.
- Bohr, C., Hasselbalch, K. A., und Krogh, A. (1904). Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Skand. Arch. Physiol.*, 16:402–412.
- Bonaventura, J. und Bonaventura, C. (1980). Hemocyanin: Relationship and their structure, function and assembly. *Amer. Zool.*, 20:7–17.

- Bridges, C. R. (1990). Purines and their interaction with other factors controlling haemocyanin oxygen affinity. In *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Hrsg. G. Preaux und R. Lontie) S. 401-405. Leuven: University Press.
- Bridges, C. R. (2001). Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.*, 204(5):1021–1032.
- Bridges, C. R., Bicudo, J. E. P. W., und Lykkeboe, G. (1979). Oxygen-content measurement in blood containing hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 62(2):457–462.
- Bridges, C. R. und Morris, S. (1986). Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate - a role for other cofactors. In *Invertebrate Oxygen Carriers* (Hrsg. B. Linzen) S. 341-352. Heidelberg: Springer Verlag.
- Bridges, C. R., Morris, S., und Grieshaber, M. K. (1984). Modulation of haemocyanin oxygen affinity in the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke). *Respir. Physiol*, 57(2):189–200.
- Brouwer, M., Bonaventura, C., und Bonaventura, J. (1977). Oxygen binding by *Limulus polyphemus* hemocyanin: allosteric modulation by chloride ions. *Biochemistry*, 16:3897–3902.
- Brouwer, M., Bonaventura, C., und Bonaventura, J. (1978). Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp *Penaeus setiferus*. *Biochemistry*, 17(11):2148–2154.
- Brouwer, M., Bonaventura, C., und Bonaventura, J. (1983). Metal ion interactions with *Limulus polyphemus* and *Callinectes sapidus* hemocyanins: stoichiometry and structural and functional consequences of calcium(II), cadmium(II), zinc(II), and mercury(II) binding. *Biochemistry*, 22(20):4713–4723.
- Burmester, T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol. Biol. Evol.*, 18(2):184–195.
- Burmester, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp. Physiol. B*, 172(2):95–107.
- Butler, P. J., Taylor, E. W., und McMahon, B. R. (1978). Respiratory and circulatory changes in lobster (*Homarus vulgaris*) during long-term exposure to moderate hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 73:131–146.
- Canfield, D. E., Habicht, K. S., und Thamdrup, B. (2000). The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen. *Science*, 288:658–661.

- Claybrook, D. L. (1983). Nitrogen metabolism. In *The Biology of Crustacea (V): Internal anatomy and physiological regulation* (Hrsg. D. E. Bliss), S. 163 - 207. New York: Academic Press.
- Connelly, P. R., Johnson, C. R., Robert, C. H., Bak, H. J., und Gill, S. J. (1989). Binding of oxygen and carbon monoxide to the hemocyanin from the spiny lobster. *J. Mol. Biol.*, 207:829–832.
- Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H., und Nöllmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys. Chem.*, 93(2-3):215–230.
- Cuff, M. E., Miller, K. I., van Holde, K. E., und Hendrickson, W. A. (1998). Crystal structure of a functional unit from octopus hemocyanin 109. *J. Mol. Biol.*, 278(4):855–870.
- Dainese, E., Muro, P. D., Beltramini, M., Salvato, B., und Decker, H. (1998). Subunits composition and allosteric control in *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Eur. J. Biochem.*, 256(2):350–358.
- Davis, B. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404–421.
- Decker, H. und Terwilliger, N. (2000). Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.*, 203(12):1777–1782.
- DeFur, P. L., Mangum, C. P., und Reese, J. E. (1990). Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.*, 178:46–54.
- Depledge, M. H. und Bjerregaard, P. (1989). Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 43:207–223.
- Dietrich, L. E., Tice, M. M., und Newman, D. K. (2006). The co-evolution of life and Earth. *Curr. Biol.*, 16:R395–R400.
- Dykens, J. A. (1991). Purineolytic capacity and origin of hemolymph urate *Carcinus maenas* during hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B(4):579–582.
- Eftink, M. R., Anusiem, A. C., und Biltonen, R. L. (1983). Enthalpy-entropy compensation and heat capacity changes for protein-ligand interactions: general thermodynamic models and data for the binding of nucleotides to ribonuclease A. *Biochemistry*, 22(16):3884–3896.

- Eftink, M. R. und Biltonen, R. L. (1980). Thermodynamics of interacting biological systems; heat capacity studies in biology. In *Biological Microcalorimetry* (Hrsg. A. Beezer), S. 343-449. London: Academic Press.
- Ellerton, H. D., Blazey, N. D., und Robinson, H. A. (1977). Hydrogen ion titration and amino acid analysis of hemocyanin from the spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 495(1):140-150.
- Ellerton, H. D., Ellerton, N. F., und Robinson, H. A. (1983). Hemocyanin—a current perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 41(3):143-248.
- Eriksson-Quensel, I. B. und Svedberg, T. (1936). The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. *Biol. Bull.*, 71:498-547.
- Fisher, H. F. und Tally, J. (1997). Isoergonic cooperativity in glutamate dehydrogenase complexes: a new form of allostery. *Biochemistry*, 36:10807-10810.
- Fredericq, L. (1878). Sur l'hemocyanine, substance nouvelle due sang de poulpe (*Octopus vulgaris*). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 87:996-998.
- Gaykema, W., Hol, W., Vereijken, J., Soeter, N., Bak, H., und Beintema, J. (1984). 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature (London)*, 309:23-29.
- Gaykema, W., Volbeda, A., und Hol, W. (1986). Structure determination of *Panulirus interruptus* haemocyanin at 3.2 Å resolution. Successful phase extension by sixfold density averaging. *J. Mol. Biol.*, 187(2):255-275.
- Gilli, R., Lafitte, D., Lopez, C., Kilhoffer, M. C., Makarov, A., Briand, C., und Haiech, J. (1998). Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. *Biochemistry*, 37:5450-5456.
- Griko, Y. V. und Remeta, D. P. (1999). Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in alpha-lactalbumin. *Protein Sci.*, 8(3):554-561.
- Hogben, L. T. (1926). Some observations on the dissociation of haemocyanin by the colorimetric method. *Brit. J. Exp. Biol.*, 3:225-238.
- Huang, C.-Y. und Chen, J.-C. (2001). Effects of emersion on the haemolymph metabolites of the japanese lobster, *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridea). *Crustaceana*, 74(10):1041-1058.
- Hurtgen, M. T. (2003). Biogeochemistry: Ancient oceans and oxygen. *Nature*, 423:592-593.

- Jekel, P. A., Neuteboom, B., und Beintema, J. J. (1996). Primary structure of hemocyanin from *Palinurus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115B(2):243–246.
- Kielland, J. (1937). Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 59(9):1675–1678.
- Kitajima, N., Fujisawa, K., Fujimoto, C., Moro-oka, Y., Hashimoto, S., Kitagawa, T., Toriumi, K., Tatsumi, K., und Nakamura, A. (1992). A new model for dioxygen binding in hemocyanin. Synthesis, characterization, and molecular structure of the $\mu - \eta^2 : \eta^2$ peroxo dinuclear copper(II) complexes, $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5 - \text{R}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$ (R = *i*-Pr and Ph). *Journal of the American Chemical Society*, 114(4):1277–1291.
- Klotz, I. M. (1997). *Ligand-Receptor-Energetics – A Guide for the Perplexed*. Mill Valley, California: University Science Books.
- Krogh, A. (1941). *The comparative physiology of respiratory mechanisms*. Philadelphia: Univ of Pennsylvania Press.
- Kuiper, H. A., Forlani, L., Chiancone, E., Antonini, E., Brunori, M., und Wyman, J. (1979). Multiple linkage in *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biochemistry*, 18(26):5849–5854.
- Kuiper, H. A., Gaastra, W., Beintema, J. J., van Bruggen, E. F. J., Schepman, A. M. H., und Drenth, J. (1975). Subunit composition, x-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *Panulirus interruptus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, 99:619–629.
- Kuroki, R., Nitta, K., und Yutani, K. (1992). Thermodynamic changes in the binding of Ca^{2+} to a mutant human lysozyme (D86/92). *J. Biol. Chem.*, 267(34):24297–24301.
- Kusche, K., Hembach, A., Milke, C., und Burmester, T. (2003). Molecular characterisation and evolution of the hemocyanin from the european spiny lobster, *Palinurus elephas*. *J. Comp Physiol B*, 173(4):319–325.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 63. *Nature*, 227(259):680–685.
- Lallier, F., Boitel, F., und Truchot, J. P. (1987). The effect of ambient oxygen and temperature on the haemolymph L-lactate and urate concentration in the crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A:255–260.
- Lallier, F. und Truchot, J. P. (1989a). Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respir. Physiol.*, 77(3):323–336.

- Lallier, F. und Truchot, J. P. (1989b). Modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus*. *J. Exp. Biol.*, 147:133–146.
- Lallier, F. H. und Walsh, P. J. (1990). Urate does not accumulate in the hemolymph of exercised blue crabs, *Callinectes Sapidus*. *J. Exp. Biol.*, 154:581–585.
- Larimer, J. L. und Riggs, A. F. (1964). Properties of hemocyanins - I. The effect of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 13:35–46.
- Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A. F., Schneider, H. J., Schartau, W., Moore, M. D., Yokota, E., Behrens, P. Q., Nakashima, H., und Takagi, T. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 229(4713):519–524.
- Lockwood, A. P. M. (1968). *Aspects of the Physiology of Crustacea: Respiration and Metabolism*. Edingburgh and London: Oliver and Boyd.
- Logan, G. A., Hayes, J. M., Hieshima, G. B., und Summons, R. E. (1995). Terminal proterozoic reorganization of biogeochemical cycles. *Nature*, 376:53–56.
- Lucu, C., Devescovi, M., Skaramuca, B., und Kožul, V. (2000). Gill Na,K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 246:163–178.
- Lumry, R. und Rajender, S. (1970). Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers*, 9(10):1125–1227.
- Lykkeboe, G. und Johansen, K. (1975). Comparative aspects of buffering capacity in muscle. *Respir. Physiol*, 25(3):353–361.
- Magnus, K. A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., und Hol, W. G. (1994). Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins*, 19(4):302–309.
- Makino, N. (1986). Analysis of oxygen binding to *Panulirus japonicus* hemocyanin. The effect of divalent cations on the allosteric transition. *Eur. J. Biochem.*, 154:49–55.
- Mangum, C. P. (1983). Oxygen transport in the blood. In *The Biology of Crustacea (V): Internal anatomy and physiological regulation* (Hrsg. D. E. Bliss), S. 373-429. New York: Academic Press.
- Mangum, C. P. (1985). Oxygen transport in invertebrates. *Am. J. Physiol.*, 248:R505–R514.

- Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull. (Woods Hole, MA)*, 171:90–115.
- Markl, J., Hofer, A., Bauer, G., Kempfer, B., Brenzinger, M., und Linzen, B. (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanin: II. Crustacea. *J. Comp. Physiol. B*, 133:167–175.
- Markl, J., Stöcker, W., Runzler, R., und Precht, E. (1986). Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: evolution of a multigene protein family. In *Invertebrate Oxygen Carriers* (Hrsg. B. Linzen), S. 281–292. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- McMahon, B. R. (2001). Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Respiration Physiology*, 128:349–364.
- McMahon, B. R., Butler, P. J., und Taylor, E. W. (1978). Acid-base changes during recovery from disturbance and during long-term hypoxic exposure in lobster *Homarus vulgaris*. *J. Exp. Zool.*, 205(3):361–370.
- McMahon, B. R. und Wilkens, J. L. (1983). Ventilation, perfusion, and oxygen uptake. In *The Biology of Crustacea (V): Internal anatomy and physiological regulation* (Hrsg. D. E. Bliss), S. 289–372. New York: Academic Press.
- McPhail, D. und Cooper, A. (1997). Thermodynamics and kinetics of dissociation of ligand-induced dimers of vancomycin antibiotics. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 93(13):2283–2289.
- Menze, M. A. (2001). Analyse der Regulation von Hämocyanin durch Urat beim Europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*). (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Aachen: Shaker Verlag.
- Menze, M. A., Hellmann, N., Decker, H., und Grieshaber, M. K. (2000). Binding of urate and caffeine to hemocyanin of the lobster *Homarus vulgaris* (E.) as studied by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, 39(35):10806–10811.
- Menze, M. A., Hellmann, N., Decker, H., und Grieshaber, M. K. (2005). Allosteric models for multimeric proteins: oxygen-linked effector binding in hemocyanin. *Biochemistry*, 44(30):10328–10338.
- Minton, A. P. und Imai, K. (1974). The three-state model: a minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(4):1418–1421.
- Mizoue, L. S. und Tellinghuisen, J. (2004). The role of backlash in the “first injection anomaly” in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.*, 326(1):125–127.

- Molon, A., Muro, P. D., Bubacco, L., Vasilyev, V., Salvato, B., Beltramini, M., Conze, W., Hellmann, N., und Decker, H. (2000). Molecular heterogeneity of the hemocyanin isolated from the king crab *Paralithodes camtschaticae*. *Eur. J. Biochem.*, 267:7046–7057.
- Monod, J., Changeux, J. P., und Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.*, 6:306–329.
- Monod, J. und Jacob, F. (1961). General conclusions: Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26:389–401.
- Monod, J., Wyman, J., und Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12:88–118.
- Morimoto, K. und Kegeles, G. (1971). Subunit interactions of lobster hemocyanin. I. Ultracentrifuge studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 142(1):247–257.
- Morris, S. und Bridges, C. R. (1986). Novel non lactate cofactors of haemocyanin oxygen affinity in crustaceans. In *Invertebrate Oxygen Carriers* (Hrsg. B. Linzen), S. 353–356. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Morris, S., Bridges, C. R., und Grieshaber, M. K. (1985). A new role for uric acid: modulator of haemocyanin oxygen affinity in crustacean. *J. Exp. Zool.*, 235:135–139.
- Neuteboom, B., Dokter, W., v. Gijzen, J., Rensink, H., d. Vries, J., und Beintema, J. J. (1989). Partial amino acid sequence of a hemocyanin subunit from *Palinurus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B(3):593–597.
- Nickerson, K. W. und van Holde, K. (1971). A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin - I. Circular dichroism and absorption spectra. *J. Exp. Biol.*, 168:111–124.
- Nies, A., Zeis, B., Bridges, C. R., und Grieshaber, M. K. (1992). Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris* II. Charakterisation of specific effektor binding sites. *J. Exp. Biol.*, 168:111–124.
- Norne, J.-E., Gustavsson, H., Forsen, S., Chiancone, E., Kuiper, H. A., und Antonini, E. (1979). Sodium and calcium binding to *Panulirus interruptus* hemocyanin as studied by ²³Na nuclear magnetic resonance. *Eur. J. Biochem.*, 98:591–595.
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:321–349.
- Phillips, B. F., Cobb, J. F., und George, R. W. (1980). *The biology and management of lobsters*. New York: Academic Press.

- Pott, A. (2006). Temperaturabhängige Charakterisierung der Sauerstoff- und Effektorbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*). (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Redmond, J. R. (1955). The respiratory function of hemocyanin in crustacea. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 46:209–247.
- Regnault, M. (1992). Effect of air exposure on nitrogen metabolism in the crab *Cancer pagurus*. *J. Exp. Zool.*, 264:372–380.
- Richey, B., Decker, H., und Gill, S. J. (1985). Binding of oxygen and carbon monoxide to arthropod hemocyanin: an allosteric analysis. *Biochemistry*, 24(1):109–117.
- Robert, C. H., Decker, H., Richey, B., Gill, S. J., und Wyman, J. (1987). Nesting: hierarchies of allosteric interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84(7):1891–1895.
- Schopf, J. W., Hayes, J. M., und Walter, M. R. (1983). Evolution of earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In *Earth's Earliest Biosphere: its origin and evolution* (Hrsg. J. W. Schopf), S. 361–384. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Shen, Y., Knoll, A. H., und Walter, M. R. (2003). Evidence for low sulphate and anoxia in a mid-Proterozoic marine basin. *Nature*, 423:632–635.
- Sick, H. und Gersonde, K. (1969). The O₂-binding properties of chironomus *Th. thummi* larval hemoglobin. *Eur. J. Biochem*, 7(2):273–279.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., und Mackonkin, T. E. (1996). Multicopper oxygenases and oxygenases. *Chem. Rev.*, 96(7):2563–2606.
- Stöcker, W., Raeder, U., Bijlholt, M. M. C., Wichertjes, T., van Bruggen, E. F. J., und Markl, J. (1988). The quaternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 158:271–289.
- Sterner, R., Bardehle, K., Paul, R., und Decker, H. (1994). Tris: an allosteric effector of tarantula haemocyanin. *FEBS Letters*, 339:37–39.
- Swammerdam, J. (1669). *Historia insectorum generalis ofte algemene verhandelung van de bloedolooze dierkens*. Zitiert nach Bonaventura und Bonaventura, 1980.
- Tanokura, M. und Yamada, K. (1993). A calorimetric study of Ca²⁺ binding by wheat germ calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 268(10):7090–7092.

- Terwilliger, N. B. (1998). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. Exp. Biol.*, 201(8):1085–1098.
- Thomas, H. J. (1954). The oxygen uptake of the lobster, *Homarus vulgaris*. *J. Exp. Biol.*, 31:228–251.
- Truchot, J. (1975). Factors controlling the *in vitro* and *in vivo* oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir. Physiol.*, 24(2):173–189.
- Truchot, J. (1980). Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. *J. Exp. Biol.*, 214:205–208.
- Truchot, J. P. (1992). Respiratory function of arthropod hemocyanins. In *Advances in comparative and environmental physiology: Blood and tissue oxygen carriers* (Hrsg. C. P. Mangum), S. 377-410. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Turnbull, W. B. und Daranas, A. H. (2003). On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.*, 125(48):14859–14866.
- van de Meer, J. (2004). Adenosin und Urat modulieren die Sauerstoffversorgung des Sumpfkrebsees *Astacus leptodactylus*. (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Göttingen: Cuvillier Verlag.
- van Holde, K. E. und Miller, K. I. (1995). Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.*, 47:1–81.
- van Holde, K. E., Miller, K. I., und Decker, H. (2001). Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.*, 276(19):15563–15566.
- Volbeda, A. und Hol, W. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 209:249–279.
- Volbeda, A. und Hol, W. G. J. (1988). Structure of arthropodan hemocyanin. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 274:291–307.
- Wajcman, H., McMahonill, P., und Mason, H. S. (1977). Automatic measurement of the oxygen affinity of *Cancer magister* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57B:139–141.
- Winget, R. R. (1969). Oxygen consumption and respiratory energetics in the spiny lobster, *Panulirus interruptus* (Randall). *Biol. Bull.*, 136:301–312.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., und Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.*, 179(1):131–137.

- Wolvekamp, H. P. und Waterman, T. H. (1960). Respiration. In *The physiology of crustacea. Metabolism and growth* (Hrsg. T. H. Waterman), S. 35–100. New York: Academic Press.
- Wyman, J. (1948). Heme proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 4:407–531.
- Wyman, J. (1972). On allosteric models. *Curr. Top. Cell. Reg.*, 6:209–226.
- Wyman, J. und Gill, S. J. (1990). *Binding and Linkage Functional Chemistry of Biological Macromolecules*. Mill Valley, California: University Science Books.
- Zeis, B. (1994). Einfluss von Urat auf die funktionellen Eigenschaften von Hämocyanin. (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Aachen: Shaker Verlag.
- Zeis, B., Nies, A., Bridges, C. R., und Grieshaber, M. K. (1992). Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris* L. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen-affinity. *J. Exp. Biol.*, 168:93–110.

Anhang A

Tabelle A.1: Allosterische Gleichgewichtskonstanten des MWC-Modells ($L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$) und des Three-State-MWC-Modells ($L_{T_3}^{\text{eff}}$, $L_{S_3}^{\text{eff}}$) für die einzelnen Datengruppen in der Analysegruppe VI. ($X \pm \text{SD}$).

Datengruppe	$L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$	$L_{T_3}^{\text{eff}}$	$L_{S_3}^{\text{eff}}$
VI/ + 20 mM CaCl ₂ + 20 mM MgCl ₂ + 150 mM NaCl	3161 ± 545	2101265 ± 127490	6376 ± 1044
VI/ + 20 mM CaCl ₂ + 50 mM MgCl ₂ + 500 mM NaCl	1546 ± 267	868246 ± 42992	3084 ± 593
VI/ + 20 mM CaCl ₂ + 20 mM MgCl ₂ + 150 mM NaCl + Urat	141 ± 25	61753 ± 5264	3835 ± 413
VI/ + 20 mM CaCl ₂ + 20 mM MgCl ₂ + 150 mM NaCl + Koffein	47 ± 8	13190 ± 2099	5666 ± 454

Tabelle A.2: Allosterische Gleichgewichtskonstanten des MWC-Modells ($L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$) und des Three-State-MWC-Modells ($L_{T_3}^{\text{eff}}$, $L_{S_3}^{\text{eff}}$) für die einzelnen Datengruppen in der Analysegruppe V. ($X \pm \text{SD}$).

Datengruppe	$L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$	$L_{T_3}^{\text{eff}}$	$L_{S_3}^{\text{eff}}$
V/ + 20 mM CaCl ₂ + 50 mM MgCl ₂	17738 ± 759	2371663 ± 142395	67981 ± 5550
V/ + 20 mM CaCl ₂ + 500 mM NaCl	7130 ± 323	682658 ± 49002	42826 ± 3233
V/ + 50 mM MgCl ₂ + 500 mM NaCl	1226 ± 67	66482 ± 6708	12127 ± 944

Tabelle A.3: Allosterische Gleichgewichtskonstanten des MWC-Modells ($L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$) und des Three-State-MWC-Modells ($L_{T_3}^{\text{eff}}$, $L_{S_3}^{\text{eff}}$) für die einzelnen Datengruppen in den Analysegruppen I bis IV. ($X \pm \text{SD}$).

Analysegruppe	$L_{\text{mwc}}^{\text{eff}}$	$L_{T_3}^{\text{eff}}$	$L_{S_3}^{\text{eff}}$
I	1586 ± 59	454739 ± 41504	75511 ± 6804
II/ + 20 mM CaCl ₂	8068 ± 387	191060 ± 23415	32157 ± 2861
II/ + 50 mM CaCl ₂	3905 ± 176	71828 ± 8557	14619 ± 1132
III/ + 20 mM MgCl ₂	14691 ± 763	2996339 ± 211758	115690 ± 11239
III/ + 50 mM MgCl ₂	1097 ± 66	87321 ± 11424	23518 ± 1847
IV/ + 150 mM NaCl	3697 ± 206	660248 ± 49598	17973 ± 2341
IV/ + 500 mM NaCl	477 ± 29	44164 ± 4351	5967 ± 573

Danksagung

Herrn Prof. em. Dr. Manfred K. Grieshaber gebührt mein herzlicher Dank für sein Interesse und seine uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit. Durch seine wohlwollende Förderung, auch unter schwierigen Umständen, und seine stete Diskussionsbereitschaft wurde mir die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Ariane Pott für ihre konstruktiven Anregungen und ihr immer offenes Ohr für meine kleinen und großen Problemchen.

Für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit an und mit unserer ITC danke ich meinen ITC-Teamkolleginnen Frau Dr. Ariane Pott und Frau Dr. Nadine van Os.

Bei Herrn Prof. Dr. Helmut Ritter bedanke ich mich für die uns eingeräumte Möglichkeit, sein Kalorimeter mit zu benutzen, wodurch die Produktivität des ITC-Teams noch gesteigert werden konnte.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Zoophysiology der Grieshaber-Ära danke ich für die mir erwiesene Hilfsbereitschaft und die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Unigeländes, was zum Wohlbefinden erheblich beigetragen hat.

Zu guter Letzt danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt und seinen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme in ihrem Institut und für den mir zur Verfügung gestellten Computerarbeitsplatz nach Auflösung unseres Instituts für Zoophysiology.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, 05.11.2008

Astrid Wänke