

Temperaturabhängige Charakterisierung
der Sauerstoff- und Effektorbindung
an das Hämocyanin
des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*)

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

vorgelegt von
Ariane Pott
(geborene Bauer)
aus Hilden

Düsseldorf, 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber

Korreferent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	9
2.1	Versuchstiere	9
2.2	Gewinnung von Hämocyanin	9
2.3	Bestimmung des Aggregationszustands	10
2.4	Elektrophoretische Trennung	11
2.5	Sauerstoffbindungsstudien	11
2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie	12
2.7	Analyse der Bindungskurven	14
2.7.1	Sauerstoffbindung	14
2.7.2	Kalorimetrische Bindungskurven	19
2.8	Chemikalien	23
2.9	Statistische Auswertung	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Gewinnung von Hämocyanin	25
3.2	Sauerstoffbindungsstudien	27
3.2.1	Analyse der Sauerstoffbindungskurven	29
3.3	Isotherme Titrationskalorimetrie	37
3.3.1	Temperaturabhängige Effektorbindung unter normoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein	37
3.3.2	Temperaturabhängige Effektorbindung unter hypoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein	48
3.3.3	Modulatorbindungsmodell unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein	49
3.3.4	Temperaturabhängige Bindung der Dimethylxanthine	53
3.3.5	Temperaturabhängige Bindung der Methylxanthine und weiterer Xanthinderivate	55

4	Diskussion	59
4.1	Einfluss von Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindung	59
4.2	Temperaturabhängige Bindung von Urat und Koffein	68
4.3	Bindung der Xanthinderivate	72
4.4	Charakterisierung der Uratbindungsstelle	73
4.4.1	Bindung von Xanthinderivaten	73
4.4.2	Thermodynamische Analyse der Effektorbindung	75
4.5	Allosterische Modellvorstellungen	81
4.6	Physiologische Betrachtungen	83
5	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	90
6	Anhang	101

1M	Ligand 1-Methylxanthin
3M	Ligand 3-Methylxanthin
7M	Ligand 7-Methylxanthin
α	Bezeichnung der Einzel-Konformation des Makromoleküls nach dem Three-State-Modell: S, R, T
$\alpha\beta$	Bezeichnung der einzelnen Konformationszustände des Makromoleküls nach dem Nested-MWC-Modell: rT, tT, rR, tR
Da	Dalton
f_α	Konformationsverteilungen nach dem Three-State-Modell
$f_{\alpha\beta}$	Konformationsverteilungen nach dem Nested-MWC-Modell
F_{an}	anfängliche Sättigung
$F_{\alpha\beta}^{\text{eff}}$	Einflussfaktoren der Konformation $\alpha\beta$ nach dem Nested-MWC-Modell
F_{in}	finale Sättigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
$k_{\alpha\beta}^{\text{eff}}$	mikroskopische Bindungskonstanten des jeweiligen Effektors an das Makromolekül
k_n	mikroskopische Bindungskonstante des n -ten Bindungsschrittes
$k_{\alpha\beta}$	Sauerstoffbindungskonstante
L_f	freie Ligandenkonzentration
l_R, l_T, Λ	Gleichgewichtskonstanten nach dem Nested-MWC-Modell
L_S, L_T	Gleichgewichtskonstanten nach dem Three-State-Modell
M_t	Makromolekülkonzentration
n	Anzahl an Bindungsstellen
n	Stichprobenumfang
n_b	Konzentration an besetzten Bindungsstellen
n_f	Konzentration an freien Bindungsstellen
n_t	Gesamtzahl der Bindungsstellen
P	Bindungspolynom
P_{50}	Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Sättigung
Parax	Ligand Paraxanthin
P_{all}^N	allgemeines Bindungspolynom des Nested-MWC-Modells
P_{all}^T	allgemeines Bindungspolynom des Three-State-Modells
q	Wärmefreisetzung im kalorimetrischen Experiment
SD	Standardabweichung
S_{20}, w	Sedimentationskoeffizient bei 20°C in Wasser, angegeben in Svedberg (S)
T	absolute Temperatur
Theob	Ligand Theobromin

Theop	Ligand Theophyllin
TMH	Ligand 1,3,7-Trimethylharnsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volumen der ITC-Messzelle
W_T, W_S	Einflussfaktoren der Konformation α nach dem Three-State-Modell
$\overline{X}$	Sättigung des Makromoleküls
x	Ligandenkonzentration
$\overline{X}_{\text{gem}}$	gemessene Sättigung des Makromoleküls
$\overline{X}_r$	relative Sättigung des Makromoleküls
$\overline{X}_{\text{reg}}$	Sättigung des Makromoleküls unter Berücksichtigung einer 3% igen Abweichung
Θ	Sättigung des Makromoleküls
ΔG^0	Änderung der freien Enthalpie (freie Bindungsenthalpie)
ΔH^0	Änderung der Enthalpie (Bindungsenthalpie)
ΔS^0	Änderung der Entropie (Bindungsentropie)

1

Einleitung

Biologische Makromoleküle können hochspezifisch mit kleinen wie großen Molekülen interagieren. Solche Interaktionen spielen bei der Enzymkatalyse, Antikörperbindung und weiterer Protein-Liganden-Beziehungen eine essentielle Rolle. Eine der bekanntesten Protein-Liganden-Wechselwirkungen ist die zwischen einem Atmungspigment und Sauerstoff. Der Transport von Sauerstoff zu den Organen und seine Aufnahme in den Zellen ist substantiell für den aeroben Metabolismus der Tiere. Folglich haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Proteine entwickelt, um Sauerstoff im Organismus zu transportieren. Ihre Hauptvertreter sind die Hämoglobine, die im Stamm der Vertebraten, aber auch in den unterschiedlichsten Invertebraten-Stämmen (z. B. Anelliden, Arthropoden, Mollusken) weit verbreitet sind. Zu der Gruppe der Hämoglobine gehören ebenfalls die Chlorocruorine und Erythrocruorine der Anneliden, die extrazellulär vorliegen. Neben dem Hämoglobinen existieren jedoch noch weitere Sauerstofftransportproteine, wie Hämerythrine (z. B. Sipunculiden, Brachipoden) und Hämocyanine (z. B. Arthropoden, Mollusken) (Hardison, 1996; van Holde und Miller, 1995; Lamy et al., 1996).

Die Gruppe der Hämocyanine gehört zu den Typ-3-Kupferproteinen, zu denen auch die Phenoloxidasen, Tyrosinasen, Catecholoxidasen, Pseudo-Hämocyanine und Hexamerine zählen. Sie alle entstammen vermutlich einem ursprünglichen Typ-3-Kupferprotein, von welchem sich primitive Kupfer-3a-Proteine (Tyrosinasen) sowie Kupfer-3b-Proteine (Phenoloxidasen) in getrennten Ästen abzweigten. Als sich vor etwa 700-800 Millionen Jahren die großen Stämme der Metazoen zu entwickeln begannen, entstanden auch die Vorläufer der Hämocyanine der Mollusken (3a-Kupferprotein) und Arthropoden (3b-Kupferprotein) (van Holde et al., 2001; Burmester, 1999; Linzen et al., 1985).

Die Pigmente beider Stämme binden Sauerstoff zwischen zwei Kupferatome, die infolgedessen aus dem reduzierten Cu(I)-Zustand in den oxidierten Cu(II)-Zustand überführt werden. Durch die Oxidation ändern die Hämocyanine ihre Farbe von farblos zu blau. Die Kupferbindedomäne, die nahe am N-Terminus des Moleküls zu finden ist, bezeichnet man als die sogenannte A-Seite (CuA), die nahe am C-Terminus des Moleküls liegt als die B-Seite (CuB). Die Kupferatome werden über drei Histidine koordiniert (Magnus et al.,

1994; Bonaventura und Bonaventura, 1980).

Die kleinste funktionelle Einheit des Arthropodenhäemocyanins ist das Hexamer, das aus sechs Polypeptidketten mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 75 kDa zusammengesetzt ist. Abhängig von der Art gibt es unterschiedliche Assoziationsstufen des Häemocyanins, vom Hexamer bis zum Oligohexamer (Magnus et al., 1994; Linzen et al., 1985). Die Untereinheiten assoziieren über nicht kovalente Bindungen als auch über Disulfid-Brücken (van Holde und Miller, 1995). Zum Zusammenschluss der Untereinheiten sind zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und/oder Ca^{2+} erforderlich (Mangum, 1983). Im Vergleich dazu besteht das Molluskenhäemocyanin aus funktionellen Untereinheiten von ca. 50 kDa, die sich zu linearen Sequenzen von 7-8 Polypeptidketten zusammenschließen und so ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 350 bis zu 450 kDa bilden (Lieb et al., 1999). Die multimere Struktur der Häemocyanine erlaubt sowohl eine kooperative Bindung als auch eine allosterische Regulation der bindenden Liganden. Die Sauerstoffbindung an das Atmungspigment erfolgt hochgradig kooperativ mit Hill-Koeffizienten (Hill, 1910) von 2 bis zu 11 (Bonaventura und Bonaventura, 1980; Robert et al., 1987).

Die Sauerstoffbindung an das Häemocyanin der Arthropoden wird durch zahlreiche allosterische Effektoren und Modulatoren beeinflusst. So reagiert das Sauerstoffbindungsverhalten des Häemocyanins hochsensitiv auf einen veränderten pH-Wert. Das Häemocyanin unterliegt dabei dem klassischen Bohr-Effekt: Mit steigender Protonenkonzentration sinkt die Sauerstoffaffinität des Häemocyanins (Mangum, 1983; Truchot, 1975). Werden Crustaceen einer veränderten Salinität ausgesetzt, so beeinflusst diese ebenfalls die Sauerstoffaffinität des Häemocyanins. In Abhängigkeit von den Ca^{2+} , Mg^{2+} und Cl^{-} -Konzentrationen ändert sich die Affinität für Sauerstoff (Truchot, 1975). Zudem können niedrige Salinitätsniveaus die Zusammensetzung der Häemocyanin-Untereinheiten ändern, woraus eine Erniedrigung der Sauerstoffaffinität resultiert (Mason et al., 1982; Mangum, 1983). In schwefelwasserstoffreichen Habitaten kommt es häufig zu Thiosulfatbildung. Taylor et al. (1999) konnte für die Schlammkrabbe *Calocaris macandreae* Bell zeigen, dass die Sauerstoffaffinität durch große Mengen an Thiosulfat reduziert wird. Im Falle des Häemocyanins von *Crangon crangon* konnte jedoch kein Einfluss des Thiosulfats auf die Sauerstoffaffinität nachgewiesen werden (Hagerman und Vismann, 1999). Schließlich führt auch eine Erhöhung der Temperatur zu einer Erniedrigung der Sauerstoffaffinität des Häemocyanins (Truchot, 1975).

Neben den hier aufgeführten anorganischen Modulatoren der Sauerstoffaffinität des Häemocyanins der Crustaceen gibt es organische Moleküle, die einen Einfluss auf die Sauerstoffaffinität nehmen können. Als metabolische Effektoren konnten Morris und McMahon (1989) zahlreiche Neurohormone charakterisieren. Dopamin zeigte dabei den größten positiven Effekt auf die Sauerstoffbindung von *Cancer magister*. L-Laktat akkumuliert als glykolytisches Endprodukt unter Anaerobiose in der Hämolymphe von *Cancer magister*, *Callinectes sapidus*, *Homarus vulgaris* und weiterer dekapoder Krebse. Truchot (1980)

konnte an den Krabben *Carcinus maenas* und *Cancer pagurus* zeigen, dass L-Laktat einen positiven konzentrationsabhängigen Effekt auf die Sauerstoffbindung hat. Es erniedrigt den Halbsättigungswert und die Kooperativität der Sauerstoffbindung (Lallier et al., 1987; Truchot, 1980; Bouchet und Truchot, 1985). L-Laktat bindet dabei stereospezifisch, was auf das chirale C-Atom zurückzuführen ist. D-Laktat zeigt eine deutlich geringere Bindungsaffinität an das Hämocyanin als L-Laktat (Graham et al., 1983; Graham, 1985).

Urat akkumuliert ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen in der Hämolymphe dekapoder Krebse. Im Purinstoffwechsel werden Purinnukleotide über mehrere Schritte zum Xanthin abgebaut, das durch die Xanthin-Oxidase zur Harnsäure oxidiert wird. Anschließend öffnet die Uricase den Purinring und es bildet sich Allantoin. Da die Uricase jedoch Sauerstoff als Co-Substrat benötigt, ist sie in Sauerstoffmangelsituationen nicht aktiv und Urat sammelt sich in der Hämolymphe an (Dyken, 1991). Morris et al. (1985) zeigten am Dohlenkrebs *Austropotamobius pallipes*, dass Urat die Sauerstoffaffinität des Krebs-hämocyanins erhöht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Purinanaloga auf die Sauerstoffbindung untersucht, und es konnte auch durch Koffein und Theobromin eine erhöhte Sauerstoffaffinität nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen an diversen Crustaceenarten folgten (Lallier et al., 1987; Bridges, 1990).

Zeis et al. (1992) konnte am Europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*) zeigen, dass die Bindung von Urat mit einer Verringerung der Kooperativität der Sauerstoffbindung einhergeht. Verdrängungsexperimente mit verschiedenen Purinanaloga, wie Koffein, Theophyllin, Hypoxanthin, Adenin und Allantoin zeigten, dass der Purinring eine Voraussetzung für die Bindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers ist. Zudem konnte ein additiver Effekt von L-Laktat und Urat auf die Sauerstoffbindung beobachtet werden. Es wurden zunächst 2 Bindungsplätze mit eventuell vorhandenen unspezifischen Bindungen postuliert (Nies et al., 1992). Menze et al. (2000) konnte mittels isothermaler Titrationskalorimetrie die Bindung des Urats an das Hämocyanin des Europäischen Hummers in Abhängigkeit des pH-Wertes bei Messungen unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen durch zwei Bindungsplätze charakterisieren. Schließlich konnten Menze et al. (2005) ein Modell mit zwei verschiedenen Bindungsplatztypen formuliert werden.

Die von Menze et al. (2000) verwendete isothermale Titrationskalorimetrie ist eine Methode zur thermodynamischen Charakterisierung von Makromolekül-Liganden-Interaktionen. Sie gewährt neue Einblicke in das thermodynamische Bindungsverhalten der Liganden an das Hämocyanin und wurde daher auch in dieser Arbeit verwendet. Während des Experiments wird die Wärmetönung der jeweiligen Reaktion aufgezeichnet, integriert und über eine nicht-lineare Regressionanalyse ausgewertet, so dass die Bindungskonstante K , die Reaktionsenthalpie ΔH^0 und die Anzahl der Bindungsstellen n identifiziert werden können. Basierend auf der Gibbs-Helmholtz-Gleichung

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

können die abhängigen Parameter Entropie ΔS^0 und freie Energie ΔG^0 bestimmt werden. Hierbei ist R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Die Bindungskonstante K charakterisiert die Stärke der Interaktion zwischen zwei Molekülen. Der Vergleich von konkurrierenden Bindungspartnern oder verschiedenen Zuständen der Bindungspartner definiert die Spezifität der Wechselwirkung der Interaktionspartner und damit ihre physiologische Bedeutung. Darüber hinaus ermöglichen die gemessenen Enthalpie- und berechneten Entropieänderungen Rückschlüsse auf die molekularen Wechselwirkungen.

Als weitere thermodynamische Größe kann die Änderung der Wärmekapazität mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmt werden. Die Wärmekapazität ΔC_p^0

$$\Delta C_p^0 = \frac{\partial \Delta H^0}{\partial T} \quad (1.2)$$

lässt sich über die Temperaturabhängigkeit von ΔH^0 bestimmen, wobei ΔH^0 [kJ mol⁻¹] die freie Bindungsenthalpie und T die Temperatur [K] darstellt. Im Falle einer bi-molekularen Interaktion verändert sich ΔH^0 linear mit der Temperatur, d. h. die Wärmekapazität ist unabhängig von der Temperatur. Ein nicht-lineares Verhalten der Enthalpie kann in Zusammenhang sowohl mit einer thermalen Denaturierung als auch einer Umlagerung von Makromolekül-Komplexen stehen. Zudem kann über die Wärmekapazität die Interaktion des Liganden mit Wasser und der Bindungstasche untersucht werden (Wiseman et al., 1989; Indyk und Fisher, 1998; O'Brien et al., 2000; Eftink und Biltonen, 1980).

Die Form der Bindungsisotherme und die daraus resultierende Auswertbarkeit, sind gegenüber dem sogenannten Wiseman-Faktor (c-Wert) sehr empfindlich. Im Fall des einfachsten Bindungsmodells (Non-Interacting-Site-Modell, siehe Kapitel 2.7.2) ist der c-Wert

$$c = nK[M_t] \quad (1.3)$$

das Produkt aus der mikroskopischen Bindungskonstante K , der Anzahl der Bindungsplätze n und der Konzentration des Makromoleküls in der Versuchskammer $[M_t]$. Um die Bindungskonstante präzise zu bestimmen, sind moderate c-Werte zwischen 1 und 1000 erforderlich; nur dann ist eine optimale Auswertung der Kurve gewährleistet (Wiseman et al., 1989). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch in Fällen von niedrigen c-Werten (0,1 – 1) die Bindungsisotherme mit einer korrekten Bestimmung von K ausgewertet werden können, wenn die Anzahl der Bindungsplätze konstant gesetzt wird (Turnbull und Daranas, 2003).

Die Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie wurde bereits in zahlreichen Arbeiten angewendet. So konnten Inobe et al. (2001) zeigen, dass ATP an das molekulare Chaperon GroEL kooperativ bindet. Kaspar et al. (1999) charakterisierten die Bindungseigenschaften der periplasmatischen Domäne der Histidinautokinase CitA aus *Klebsiella pneumoniae* und Arnaud und Bouteiller (2004) untersuchten die Zusammenlagerung von

supramolekularen Polymeren mittels isothermaler Titrationskalorimetrie. Auch insbesondere Interaktionen von Hämocyaninen mit ihren Liganden wurden anhand dieser Methode beschrieben. So konnte Hellmann et al. (2001) die Urat- und Koffeinbindung an das Hämocyanin von *Astacus leptodactylus* charakterisieren.

Die Charakterisierung der Bindung von Liganden und Modulatoren ist bedeutend für das Verständnis der Funktion des Moleküls und kann unter anderem Aufschluss über die Strukturierung der Bindungsstelle geben. Daher interessierte man sich schon frühzeitig für Sauerstoffbindungsproteine (Hill, 1910). Der Ausgangspunkt aller allosterischer Systeme liegt in der homeotropen kooperativen Bindung von Sauerstoff an das multimere Makromolekül Hämoglobin (Adair, 1925). Eine homeotrope Interaktion stellt dabei den Einfluss des Liganden auf seine Bindung dar, eine heterotrope Interaktion hingegen beschreibt den Effekt eines zweiten Liganden auf die Bindung des Anderen. Nach weiteren Untersuchungen konnte 1965 das allosterische System durch ein spezifisches Modell von Monod, Wyman und Changeux gefestigt werden. Das so genannte MWC-Modell (Monod et al., 1965) basiert auf einem Gleichgewicht zwischen zwei Makromolekül-Formen, der R- und der T-Form, und beruht auf den strukturellen Veränderungen des untersuchten Moleküls. Dabei stellt R die Referenzform dar.

Ist die Struktur eines Makromoleküls bekannt, so erleichtert dies die Charakterisierung des allosterischen Systems. Das menschliche Hämoglobin ist ein aus vier Untereinheiten bestehendes Tetramer, das in jeder Untereinheit mit einer Häm-Gruppe ausgestattet ist. Demnach bindet jede Untereinheit ein Sauerstoffmolekül, nach dem oben erwähnten allosterischen Mechanismus (MWC-Modell). Die kleinste funktionelle Einheit des Arthropodenhämocyanins ist ein Hexamer. 1986 konnten Gaykema et al. mit dem Hämocyanin der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus*) die erste Struktur eines Arthropodenhämocyanins analysieren. Jede Untereinheit besteht aus drei Polypeptid-Domänen, wobei nur eine der Domänen eine Sauerstoffbindungsstelle besitzt. Derweil sind einige weitere DNA-Sequenzen von Arthropodenhämocyaninen bekannt, u. a. von *Homarus americanus* (Kusche und Burmester, 2001), *Palinurus elephas* (Kusche et al., 2003), *Pacifastacus leniusculus* (Lee et al., 2004). Die Erforschung von Sauerstoffbindungsproteinen ermöglicht die Entwicklung von neuen komplexeren Bindungsmodellen wie z. B. das Nested-MWC-Modell (Wyman, 1972; Robert et al., 1987; siehe Kapitel 2.7.1) als auch deren Anwendung auf weitere Systeme.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bindung des Urats an das dodekamere Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) in Abhängigkeit von der Temperatur zu charakterisieren und die daraus resultierende Anpassung des Hummers an die Umgebungstemperatur zu analysieren. Koffein wurde als Modell-Ligand verwendet, da es nach Zeis (1994) und Menze (2001) mit Urat um die Bindungsstellen konkurriert. Dabei wurde zunächst der Einfluss der Effektoren auf die Sauerstoffbindung in Zusammenhang mit Temperaturänderungen untersucht. Weiterhin wurde eine thermodynamische Cha-

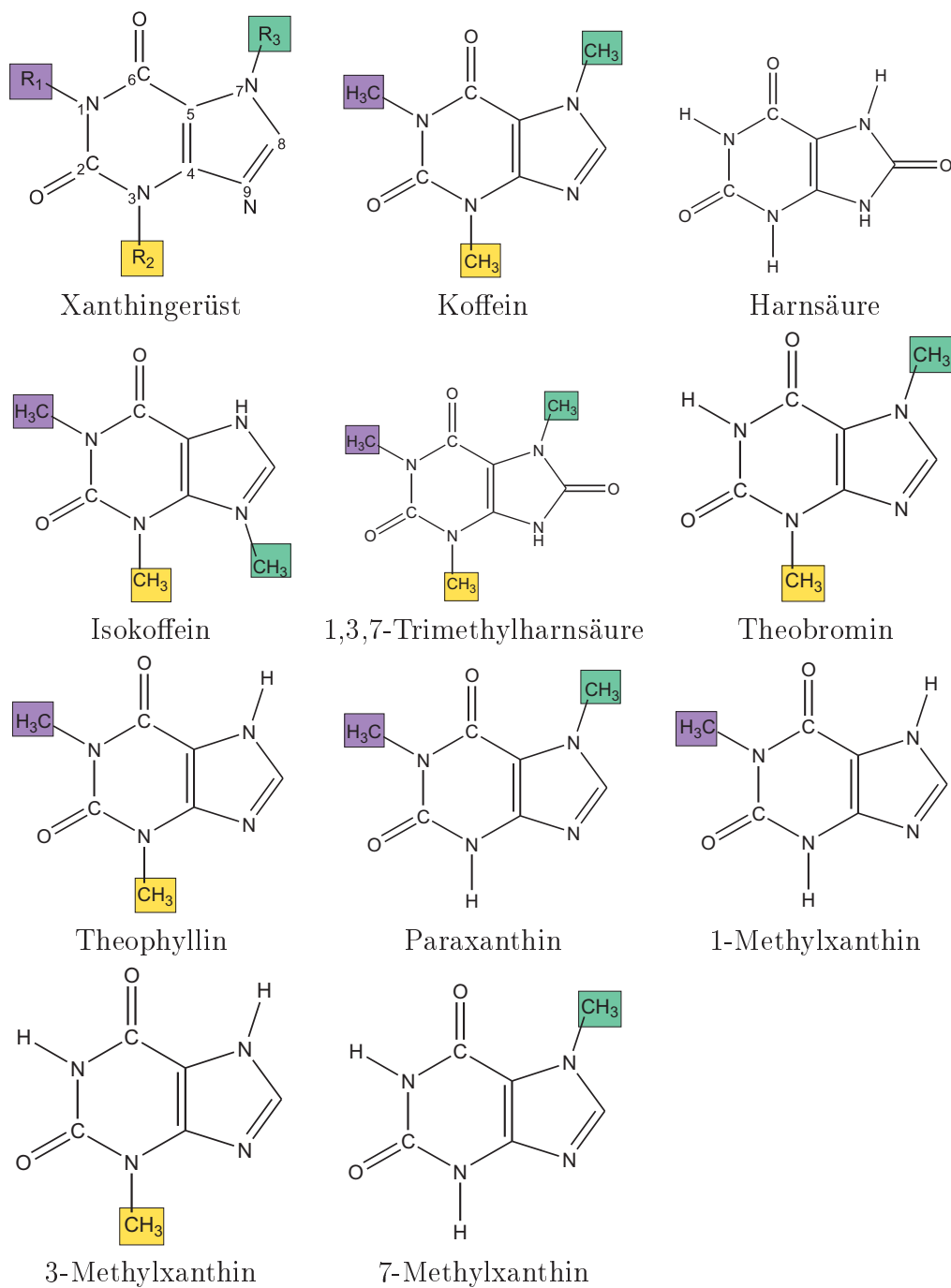


Abbildung 1.1: Strukturformeln der verwendeten Liganden und Effektoren. R = Methylrest

rakterisierung der Bindungsparameter der Effektoren unter normoxischen wie unter hypoxischen Bedingungen vorgenommen, da unter Hypoxie andere Molekülkonformationen dominieren als unter normoxischen Bedingungen (Menze et al., 2005). Die Effektorbindung wurde thermodynamisch über ein Temperaturspektrum von 10 bis 40°C untersucht und mit allosterischen Modellvorstellungen ausgewertet.

Um zu prüfen, welche funktionellen Gruppen mit dem Hämocyanin des Europäischen Hummers interagieren, wurden ebenfalls thermodynamische Bindungsstudien mit unterschiedliche Xanthinderivaten (siehe Abb. 1.1) durchgeführt. Zudem wurde der Einfluss der einzelnen Xanthinderivate auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins untersucht. Die Bindung der Dimethylxanthine, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin wurde bei verschiedenen Temperaturen charakterisiert, um diese mit dem natürlichen Modulator Urat und dem artifiziellen Effektor Koffein zu vergleichen. Eine Temperaturänderung in der Makromolekülumgebung kann eine Umlagerung im Konformationsgleichgewicht des Makromoleküls hervorrufen. Die Untersuchungen der Sauerstoff- und der Effektorbindung unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen können über die Art der thermodynamischen Wechselwirkungen Aufschluss geben und ob und in welcher Form eine Umlagerung auf Grund der Ligandenbindung stattfindet.

2

Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Männliche und weibliche Versuchstiere der Art *Homarus vulgaris* (Edwards, 1837) wurden über Hummergrosshändler (Hummer Pedersen, Hamburg und Le Viviers, Roscoff, Frankreich) bezogen und in einem Seewasser-Aquarium bei $15 \pm 1^\circ\text{C}$ gehältert. Das Wasser wurde mit Meersalz (Wiegandt, Krefeld) versetzt, um eine Dichte von $1,026 \text{ g cm}^{-3}$ zu erreichen. Der pH-Wert des Seewassers lag bei $7,8 \pm 0,1$. Die Tiere wurden einmal pro Woche mit Tintenfischen gefüttert.

2.2 Gewinnung von Hämocyanin

In einem Abstand von mindestens vier Wochen wurde den Versuchstieren je ca. 7 ml Hämolymphe mit einer vorgekühlten 20 ml Einmalspritze an der Gelenkhaut des vorletzten Peraeopoden entnommen und bei 4°C 15 Minuten bei 17.900 g in 2 ml Eppendorfgläsern zentrifugiert (C5417 R, Eppendorf, Hamburg), um Zellen und Zellfragmente abzutrennen. Die Hämolymphe der männlichen und weiblichen Tiere wurde immer gesondert aufbewahrt. Der Überstand wurde über Nacht in HEPES-Puffer (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 ; pH 8 bei 20°C eingestellt) dialysiert (Dialysehäusche von Medicell, London). Um denaturierte Proteine abzutrennen, wurde erneut bei 4°C für 10 min bei 17.900 g zentrifugiert. Zur Sedimentation des dodekameren Hämocyanins wurde die Hämolymphe bei 170.000 g 3,5 Stunden bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, DuPont, Bad Homburg). Die Hämocyaninassoziate haben ein apparentes Molekulargewicht von 900.000 Dalton ($S_{20,W} = 24 \text{ S}$). Das blaue Pellet wurde in einem HEPES-Puffer (100 mM HEPES; 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , pH 8 bei 20°C eingestellt) oder für die spätere Reinigung über den Anionen-Austauscher in einem TRIS-Puffer (20 mM TRIS-HCl, 40 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CaCl_2 pH 8,0 bei 20°C eingestellt) resuspendiert. Anschließend wurde die Probe, um denaturierte Proteine abzusondern, nochmals bei 4°C für 10 min bei 17.900 g zentrifugiert. Die

Konzentration des Hämocyanins wurde durch einen Wellenlängen-Scan zwischen 250 – 450 nm an einem Photometer (Uvikon 941, Kontron München) bestimmt. Zur Berechnung der Hämocyaninkonzentration wurde die optische Absorption bei $\lambda = 334$ nm ($\epsilon = 0,269 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$) verwendet (Nickerson und van Holde, 1971). Die Reinheit des Hämocyanins wurde durch ein Absorptionsverhältnis $\lambda = 280 \text{ nm} / \lambda = 334 \text{ nm}$ geprüft (Markl et al., 1979). Lag der Quotient bei 4,8 bestand das Hämocyanin zu 95 % aus Dodekameren und zu 5 % aus höher assoziierten Aggregaten. Für eine weitere Reinigung wurde das mit TRIS-HCl-Puffer (s. o.) resuspendierte Hämocyanin auf eine Resource-Q6-Anionen-Austauscher-Säule (GE Healthcare, München) (16 mm Innendurchmesser x 30 mm, 6 ml) aufgebracht. Diese war an eine Fast-Performance-Liquid-Chromatographie-Anlage (FPLC; ÄKTA Chromatographie-System, GE Healthcare, München) angeschlossen. Die Säule wurde mit 2 ml der erhaltenen Proteinlösung (40 mg Gesamtprotein) beladen. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 24 ml TRIS-HCl-Puffer (s. o.) bei einer Flussrate von 6 ml min^{-1} gespült, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden mit einer linear ansteigenden NaCl-Konzentration (NaCl-Gradient: 40 bis 500 mM innerhalb von 120 ml) in TRIS-HCl-Puffer (s. o.) von der Säule eluiert. Die Absorption der Durchflusslösung wurde bei 280 nm (Protein) und 334 nm (Hämocyanin) aufgezeichnet. Die mit dem Laufmittel eluierten Proteine wurden in einem Fraktionssammler in Volumen zu 3 ml gesammelt und das Hämocyanin anhand seiner Absorption bei 334 nm identifiziert. Die im Absorptionsmaxima liegenden Fraktionen (fünf bis sechs) wurden vereinigt. Die vereinigten Proben mehrerer Läufe wurden für 5 h bei 170.000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, DuPont, Bad Homburg) und in einer ausreichenden Menge HEPES-Puffer (s. o.) resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 17.900 g für 10 min bei 4°C (C5417 R, Eppendorf, Hamburg) wurde die Konzentration und der Aggregationszustand durch photometrische Messungen (s. o.) sowie durch Gelpermeationschromatographie (siehe Kapitel 2.3) bestimmt (Menze, 2001). Die Reinheit der Hämocyaninlösung wurde zudem durch die Trennung auf Polyacrylamid-Gelen überprüft (siehe Kapitel 2.4).

2.3 Bestimmung des Aggregationszustands

Die Zusammensetzung des Hämocyanins sowie dessen Aggregationszustand wurden weiterhin mittels Gelpermeationschromatographie überprüft. Hierzu wurde eine Superose-6 HR-Säule (16 mm Innendurchmesser x 500 mm, 100 ml) (GE Healthcare, München) verwendet, die an ein ÄKTA Chromatographiesystem (GE Healthcare, München) angeschlossen war. Das aufgetragene Probenvolumen betrug $50 \mu\text{l}$ und die Proteinmenge ca. 1 mg. Die Säule wurde mit einem HEPES-Puffer (100 mM HEPES; 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , pH 8 bei 20°C eingestellt) equilibriert und die Probe mit diesem Puffer bei einer Flussrate von $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ eluiert. Die Absorption der Durchflusslösung

wurde bei 280 nm und 334 nm aufgezeichnet (siehe Kapitel 2.2). Die Säule wurde mit den Markerproteinen Ovalbumin (MG 45.000), Aldolase (MG 158.00), Katalase (MG 232.000), Ferritin (MG 440.000) und Thyreoglobulin (MG 669.000) kalibriert.

2.4 Elektrophoretische Trennung

Nach der letzten präparativen Zentrifugation der Hämocyaninlösung wurde eine Probe zur Kontrolle der Reinheit über ein Polyacrylamid-Gel getrennt. Es wurde die Disk-Elektrophorese nach (Ornstein, 1964) und (Davis, 1964) verwendet. Hierfür wurde das horizontale Elektrophoresesystem Multiphor II (GE Healthcare, München) eingesetzt. Mit dem dazugehörigen Kühlaggreat wurden die SDS-Gele auf 15°C gekühlt. Das Trenn- und Sammelgel wurde mittels einer gebrauchsfertigen Acrylamid- und Bisacrylamidlösung (Roth, Karlsruhe) hergestellt. Alle Gele wurden auf einem Trägerfilm "Gelbond PAG-Film" (GE Healthcare, München) gegossen. Die diskontinuierlichen SDS-Porengradienten-Gele (Rothe und Purkhanbaba, 1982) wurden mit einem 4%igen Sammelgel (Quervernetzung: 3 %), das 0,125 ml l⁻¹ TRIS/HCL, pH 6,8, enthielt, und einem 6-9 %igen Trenngel (Quervernetzung: 3 %), das mit 0,375 ml l⁻¹ TRIS/HCL, pH 8,8, versetzt war, gegossen. Für das Trenngel ergab sich so ein linearer Gradient. Das Sammelgel war mit 37 % und das Trenngel mit 25 % Glycerin versetzt. Als Laufpuffer diente 25 mmol l⁻¹ TRIS/HCL, 192 mmol l⁻¹ Glycin, pH 8,3 und 0,5 % (w/v) SDS. Die aufzutragende Probe wurde im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer (62,5 mmol l⁻¹ TRIS/HCL, pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % Mercaptoethanol, 2 % SDS) versetzt. Bei den SDS-Gelen wurde ein molekularer Größenmarker der Firma Invitrogen (BenchMark Protein Ladder) aufgetragen. Er enthielt künstliche Proteine der Größen 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 und 10 kDa. Es wurden ca. 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden zunächst für 2 Stunden im Sammelgel konzentriert. Es wurde eine Spannung von 150 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 350 V erhöht. Die darauf folgende Trennung dauerte weitere 1,5 bis 2 Stunden. Anschließend wurden die Proteine durch eine Coomassie Brilliant Blue R Färbung sichtbar gemacht. Die Proteine wurden zunächst mit einer 20%igen TCA in den Gelen ausgefällt und im nächsten Schritt mit einer ca. 50°C warmen Coomassie-Lösung (0,02% (w/v) PhastGel Blue R (Coomassie R 350), 10% (v/v) Essigsäure) angefärbt. Die Färbung dauert ca 60 Minuten. Im Anschluss wurde die Hintergrundfärbung mit 10% Essigsäure (v/v) ausgewaschen.

2.5 Sauerstoffbindungsstudien

Die Sauerstoffbindungsstudien wurden in einer Diffusionskammer durchgeführt (Methode nach (Sick und Gersonde, 1969), modifiziert nach (Lykkeboe und Johansen, 1975), (Bridges et al., 1979) und (Bridges et al., 1984)). Eine 20 µl Probe Hämocyanin einer

Konzentration von 25 – 60 μM wurde in den Strahlengang eines Photometers (Eppendorf, Hamburg) gebracht. Anschließend wurde die Probe mit einem wasserdampfgesättigten Gasstrom equilibriert, der aus variablen Anteilen von N_2 , O_2 (Messer Griesheim, Frankfurt) und Luft bestand, deren Wasserdampf- und CO_2 -Anteil zuvor absorbiert wurde. Der Gasstrom wurde von Gasmischpumpen (Wösthoff, Bochum) variiert und die gesamte Messanordnung auf 20°C temperiert. Die Extinktionsänderung der Hämocyaninlösung durch den veränderten Sauerstoffanteil im Gasstrom wurde bei 365 nm gemessen und im Verhältnis der maximalen Extinktionsänderung der Kalibrierung über eine vollständige Oxidation mit Sauerstoff (Messer Griesheim, Frankfurt) und eine anschließende Reduktion mit Stickstoff (Messer Griesheim, Frankfurt) gesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der verwendeten Liganden bei verschiedenen Temperaturen auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von *Homarus vulgaris* wurde eine 50 μM , in HEPES-Puffer (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 ; pH 8) gelöste Hämocyaninprobe mit einer in HEPES-Puffer gelösten Effektorlösung [2 mM] im Verhältnis 1:2 gemischt. Es wurden Bindungskurven bei 10, 15, 20, 25 und 30°C für Urat und Koffein und bei 20°C mit 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin), 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, 1,3,9-Trimethylxanthin (Isokoffein) und 1,3,7-Trimethylharnsäure gemessen.

2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit einem VP-ITC Titrationskalorimeter (Micro-Cal Inc., Northampton, MA) durchgeführt. Dieses Verfahren der Titrationskalorimetrie verwendet eine Referenz- und eine Messzelle, welche in einen adiabatischen Schirm eingefasst sind. Die Referenzzelle ist mit hochreinem Wasser (Millipore, Eschborn) gefüllt und in die Messzelle wird mit einer 2,5 ml Spritze (Hamilton, Reno, NV) eine sich in Lösung befindliche Komponente des Akzeptor/Liganden-Systems gefüllt. Das Zellvolumen beträgt 1,34 ml. Der adiabatische Schirm wird auf 1°C unterhalb der vorgegebenen Versuchstemperatur gekühlt. Sowohl die Zellen als auch der adiabatische Schirm besitzen getrennte Heiz- und Thermoelemente, die den Temperaturunterschied einerseits zwischen den Zellen untereinander (ΔT_1) und zwischen den Zellen und dem adiabatischen Schirm (ΔT_2) messen und regeln (siehe Abbildung 2.1). Die zweite Komponente des zu untersuchenden Systems wird mittels einer automatischen Dosiereinrichtung in die Messzelle injiziert. Die durch Injektion induzierte Reaktion kann eine exotherme oder endotherme Wärmebilanz aufweisen. Um die Zellen isotherm zu halten, muss den Zellen Energie zugeführt werden. Die sich aus der Differenz ergebene Leistung wird in $\mu\text{cal s}^{-1}$ aufgezeichnet und zur Wärmebilanz integriert. Die Kontrolle der Messapparatur erfolgt über einen Computer. Bei exothermen Reaktionen zeigt die ITC ein negatives Signal an, da die Messzelle eine geringere Wärmezufuhr erhält als die Referenzzelle. Für die Versuche wurde gereinigtes Hämocyanin in HEPES-Puffer (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 ,

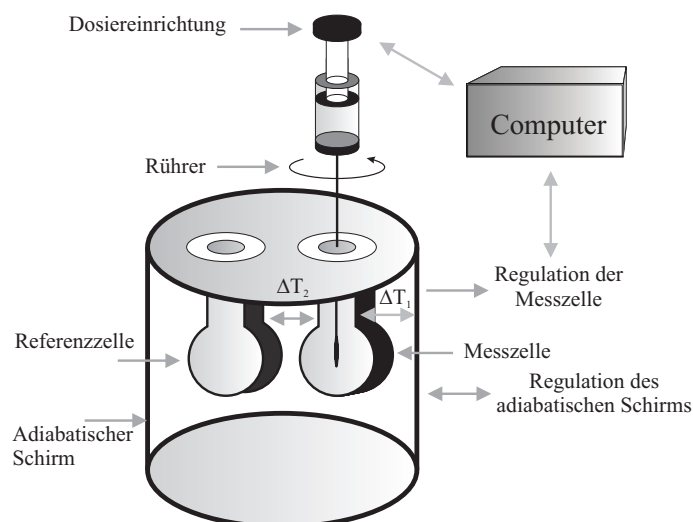


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters. Die Referenz- und die Messzelle sind in einen adiabatischen Schirm eingelassen, dessen Temperatur immer 1°C unterhalb der Versuchstemperatur liegt, so dass den Zellen kontinuierlich Wärme zugeführt werden muss. Die automatische Injektion führt zu einer Änderung der freien Enthalpie, so dass eine entsprechende höhere oder niedrigere Wärmemenge zugeführt wird.

ΔT_1 = Temperaturunterschied zwischen der Referenz- und der Messzelle; ΔT_2 = Temperaturunterschied zwischen dem adiabatischen Schirm und der Messzelle

20 mM MgCl_2 ; pH 8) der Konzentration $25\ \mu\text{M}$ eingesetzt. Vor Beginn des Experiments wurden Makromolekül- und Ligandenlösung in einer temperierten Vakuumpumpe (MicroCal Inc., Northampton, MA) entgast. Das Protein wurde in die Messzelle gegeben und der Ligand mit dem Injektor in die Zelle eingespritzt. Die Ligandenlösungen hatten eine Konzentration von 1 mM. Für die Versuche wurden folgende Liganden verwendet: Koffein, Urat, 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin), 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin), 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Hypoxanthin, 1,3,9-Trimethylxanthin (Isokoffein) und 1,3,7-Trimethylharnsäure. Es wurden 25 Injektionen bei jedem Versuch vorgenommen. Zwischen den einzelnen Injektionen war ein Zeitraum von 250 Sekunden vorgegeben und die Injektionsdauer betrug 20 Sekunden. Es wurden $10\ \mu\text{l}$ pro Injektion eingespritzt. Die Dosiereinrichtung rotierte mit einer Geschwindigkeit von 310 Umdrehungen pro Minute. Zur Korrektur der Messwerte wurden diese um die Temperaturunterschiede zwischen Injektionsspritze und Reaktionskammer (Titration von Puffer in Puffer) und der Verdünnungswärme (Titration des jeweiligen Liganden in Puffer) berichtigt. Es wurde jedem Liganden ein entsprechender Leerwert zugeordnet. Die Messungen am isothermen Titrationskalorimeter wurden sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Während der hypoxischen Versuche, die nach (Menze, 2001) durchgeführt wurden, befand sich die ITC in einem geschlossenen Kunststoffzelt, dem kontinuierlich Stickstoff zugeführt wurde. Die Lösung des Makromoleküls und des Liganden wurden vor der Entgasung mit Stickstoff gesättigt. Unter normoxischen Bedingungen wurden für Urat und Koffein Bindungsstu-

dien bei 10, 15, 17,5, 20, 22,5, 25 und 30°C durchgeführt. Für Koffein wurden zusätzliche Bindungsisotherme bei 27,5, 35 und 40°C gemessen, für Urat nur bei 35°C. Die Messungen mit den Effektoren 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin) und 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin) erfolgten bei 10, 15, 20, 25 und 30°C. Für die Liganden 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Hypoxanthin, 1,3,9-Trimethylxanthin (Isokoffein) und 1,3,7-Trimethylharnsäure wurden die Bindungsisothermen nur bei 20°C aufgenommen. Unter hypoxischen Bedingungen wurden für Urat und Koffein Bindungsisotherme bei 10, 15, 20, 25 und 30°C gemessen. Mit den Liganden 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin) und 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin) wurden Bindungskurven bei 20°C bestimmt.

2.7 Analyse der Bindungskurven

2.7.1 Sauerstoffbindung

Die Sauerstoffbindungskurven wurden mit dem Computerprogramm Sigma Plot (SPSS Inc. Chicago, IL) unter Verwendung verschiedener Bindungsmodelle analysiert. Jedes Modell wird durch das Bindungspolynom P beschrieben. Die Ligandenbindungskurve erhält man durch die logarithmische Ableitung von $\ln P$ in Abhängigkeit von $\ln x$

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

$\bar{X}$ stellt dabei die Sättigung des Makromoleküls bei einer bestimmten Ligandenkonzentration x dar. Dabei ergibt sich die relative Sättigung $\bar{X}_r$ einer Bindung aus

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

n definiert die Anzahl der Bindungsplätze pro Makromolekül. Um in der Regression der Daten $\bar{X}_{reg}$ (2.5) Unregelmäßigkeiten im anfänglichen und abschließenden Sättigungsniveau auszugleichen, wurden die Parameter F_{fin} für die finale Sättigung und F_{an} für die anfängliche Sättigung eingeführt. Unter idealen Bedingungen gilt

$$F_{\text{fin}} = 0 \quad (2.3)$$

$$F_{\text{an}} = 1. \quad (2.4)$$

Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die jeweiligen Sättigungen niemals genau 0 bzw. 1 erreichen. Um diese Schwankungen während der Regression zu berücksichtigen, wurde für F_{fin} und F_{an} bei jeder Regression eine Abweichung von 3% zugelassen. $\bar{X}_{reg}$ ergibt sich somit wie folgt:

$$\bar{X}_{reg} = (F_{\text{fin}} - F_{\text{an}})\bar{X} + F_{\text{an}}. \quad (2.5)$$

Die Regression aller verwendeten Modelle basiert auf einer Levenberg-Marquardt-Routine des Computerprogramms Sigma Plot 9.0 (SPSS Inc. Chicago, IL). Die Güte der Approximation an die Messung wurde mit

$$\chi^2 = \frac{\sum (\bar{X}_{gem} - \bar{X}_{reg})^2}{FG} \quad (2.6)$$

bestimmt, wobei $\bar{X}_{gem}$ den gemessenen Sättigungsgrad darstellt und $\bar{X}_{reg}$ der nach dem jeweiligen Modell berechnete Sättigungsgrad ist. FG steht für den Freiheitsgrad der Regression, der sich aus der Differenz zwischen der Anzahl der Datenpunkte und der Anzahl der freien Parameter des Modells ergibt.

Nested MWC Modell

Das Nested MWC Modell (Robert et al., 1987) unterteilt Moleküle und ihre Strukturen in Hierarchien oder Schachtelungen. Hierbei beeinflusst die Konformation einer grossen übergeordneten Struktur des Moleküls die funktionellen Eigenschaften ihrer Untereinheiten (Robert et al., 1987). Ein Molekül besteht dabei immer aus n Monomeren eines Oligomers, die alle unter bestimmten Bedingungen in der gleichen Konformation vorliegen. Für das vorliegende Nested-MWC-Modell wurde $n = 12$ gewählt, da das untersuchte Hämocyanin des Europäischen Hummers aus dodekameren Assoziaten besteht. Das Konzept der allosterischen Schachtelung wurde schon mehrfach auf Hämocyaninmoleküle angewandt (Decker und Sterner, 1990; Hellmann, 2004; Menze et al., 2005; Beltramini et al., 2005), da es eine Erklärung für das stark kooperative Sauerstoffbindungsverhalten dieser multimeren Proteine liefern könnte. Das Bindungspolynom des Nested-MWC Modells des 2x hexameren Hämocyanins des Europäischen Hummers wurde von Robert et al. (1987) dargestellt und von Menze et al. (2005) vertieft. Es lässt vier verschiedene Konformationen des Moleküls zu (siehe Abbildung 2.2): rR, tR, rT und tT.

Das allgemeingültige Bindungspolynom für die Bindung von Sauerstoff und eines Effektors an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* ist definiert als

$$P_{all}^N = (Q_{rR}^{2m} P_{rR}^6 + l_R^0 Q_{tR}^{2m} P_{tR}^6)^2 + \Lambda^0 (Q_{rT}^{2m} P_{rT} + l_T^0 Q_{tT}^{2m} P_{tT})^2. \quad (2.7)$$

wobei das Bindungspolynom der Sauerstoffbindung mit

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

und das des Effektors mit

$$Q_{\alpha\beta} = 1 + k_{\alpha\beta}^{eff} y \quad (2.9)$$

beschrieben ist. Die Bindungsaffinität des jeweiligen Liganden wird durch $k_{\alpha\beta}^{O_2}$ für Sauerstoff und durch $k_{\alpha\beta}^{eff}$ für den Effektor charakterisiert. Für die Gleichgewichtskonstante Λ gilt

$$\Lambda^0 = L \frac{(1 + l_R^0)^2}{(1 + l_T^0)^2}, \quad \alpha\beta \in tT, rT, rR, tR. \quad (2.10)$$

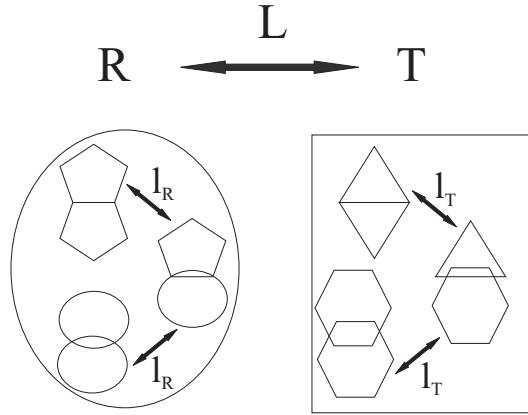


Abbildung 2.2: Nested-MWC-Modell. Jede native hexamere Untereinheit des Hämocyaninmoleküls kann in zwei verschiedenen Quartärstrukturen (R und T) auftreten. Die allosterische Konstante L stellt das Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen dar (Gleichung 2.11). Als weitere allosterische Unterteilung dienen zwei weitere Unterkonformationen: r und t , so dass die allosterischen Untereinheiten in vier verschiedenen Zuständen existieren können: rR , rT , tR und tT . Die Bindungsaffinität zu den Konformationen wird durch die Bindungskonstanten $k_{\alpha\beta}^{O_2}$ für Sauerstoff und durch $k_{\alpha\beta}^{\text{eff}}$ für den Effektor charakterisiert. Das Gleichgewicht zwischen den allosterischen Unterkonformationen ist durch l_R^0 und l_T^0 gegeben.

α und β sind mit $\alpha\beta = tT, rT, rR, tR$ definiert. Sie stellen die verschiedenen Konformationen des Moleküls dar. Die Sauerstoffkonzentration wird mit x und die Effektorkonzentration mit y bezeichnet. Für die vier Konformationen des Nested-MWC Modells ergeben sich somit für jeden Liganden vier Bindungskonstanten $k_{tT}^{O_2}, k_{tR}^{O_2}, k_{rR}^{O_2}$ und $k_{rT}^{O_2}$ für die Sauerstoffbindung, und $k_{tT}^{\text{eff}}, k_{tR}^{\text{eff}}, k_{rR}^{\text{eff}}$ und k_{rT}^{eff} für die Effektorbindung. Die Anzahl der identischen Bindungsplätze pro hexamerem Molekül wird mit m definiert. Die in Gleichung 2.7 dargestellten Gleichgewichtskonstanten l_R^0, l_T^0 und Λ^0 sind unter der Bedingung, dass weder Sauerstoff noch ein Effektor an das Molekül gebunden ist, mit

$$l_R^0 = \frac{[tR_0]}{[rR_0]}, \quad l_T^0 = \frac{[tT_0]}{[rT_0]}, \quad \Lambda^0 = \frac{[rT_0]^2}{[rR_0]^2} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]}. \quad (2.11)$$

definiert (Monod et al., 1965). Die Klammern bezeichnen die Konzentrationen der unterschiedlichen allosterischen Untereinheiten des Modells in Abwesenheit von Sauerstoff und Effektor (siehe Abbildung 2.2). Die Sättigung des Moleküls mit Sauerstoff bzw. Effektor ist somit mit

$$X_{O_2} = \frac{\partial \ln P}{12 \partial \ln x} \quad (2.12)$$

$$X_{\text{eff}} = \frac{\partial \ln P}{2m \partial \ln y} \quad (2.13)$$

definiert. Wenn man davon ausgeht, dass die Sauerstoffbindung immer bei einer konstanten Konzentration des Effektors stattgefunden hat, so ist $Q_{\alpha\beta}$ konstant. Es kann daher in die Gleichgewichtskonstanten des allgemeinen Bindungspolynoms integriert werden. Daraus ergibt sich das vereinfachte Bindungspolynom P_{nes} .

$$P_{\text{nes}} = (P_{rR}^6 + l_R^{\text{eff}} P_{tR}^6)^2 + \Lambda^{\text{eff}} (P_{rT}^6 + l_T^{\text{eff}} P_{tT}^6)^2 \quad (2.14)$$

Die Gleichgewichtskonstanten unter Berücksichtigung des Effektoreinflusses werden mit

$$l_R^{\text{eff}} = l_R^0 F_R^{\text{eff}} \quad (2.15)$$

$$l_T^{\text{eff}} = l_T^0 F_T^{\text{eff}} \quad (2.16)$$

$$\Lambda^{\text{eff}} = \Lambda^0 F^{\text{eff}} \quad (2.17)$$

definiert. Die Faktoren F_R^{eff} , F_T^{eff} und F^{eff} stellen den Einfluss des Effektors auf die Sauerstoffbindung des Hämocyaninmoleküls dar. Dabei wird von einem einfachen Modulatorbindungsmodell ausgegangen, in welchem jedes Hexamer m identische Bindungsstellen besitzt. Für die Faktoren F_R^{eff} , F_T^{eff} und F^{eff} gilt demnach

$$F_R^{\text{eff}} = \frac{Q_{tR}}{Q_{rR}} = \frac{(1 + k_{tR}^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_{rR}^{\text{eff}} y)^m} \quad (2.18)$$

$$F_T^{\text{eff}} = \frac{Q_{tT}}{Q_{rT}} = \frac{(1 + k_{tT}^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_{rT}^{\text{eff}} y)^m} \quad (2.19)$$

$$F^{\text{eff}} = \frac{Q_{rT}}{Q_{rR}} = \frac{(1 + k_{rT}^{\text{eff}} y)^{2m}}{(1 + k_{rR}^{\text{eff}} y)^{2m}}. \quad (2.20)$$

Verwendet man Formel 2.8 und die entsprechenden Gleichgewichtskonstanten, so kann die Verteilung der Konformationen wie folgt berechnet werden:

$$f_{tT} = \frac{\Lambda(P_{rT}^6 + l_T^{\text{eff}} P_{tT}^6) l_T^{\text{eff}} P_{tT}^6}{P_{\text{nes}}} \quad (2.21)$$

$$f_{rT} = \frac{\Lambda(P_{rT}^6 + l_T^{\text{eff}} P_{tT}^6) l_T^{\text{eff}} P_{rT}^6}{P_{\text{nes}}} \quad (2.22)$$

$$f_{rR} = \frac{(P_{rR}^6 + l_R^{\text{eff}} P_{tR}^6) l_T^{\text{eff}} P_{rR}^6}{P_{\text{nes}}} \quad (2.23)$$

$$f_{tR} = \frac{(P_{rR}^6 + l_R^{\text{eff}} P_{tR}^6) l_T^{\text{eff}} P_{tR}^6}{P_{\text{nes}}}. \quad (2.24)$$

Three-State-MWC-Modell

Ein weiteres allosterisches Modell ist das Three-State-MWC-Modell nach (Minton und Imai, 1974). Das Three-State-MWC-Modell lässt drei unterschiedliche Konformationen des Moleküls zu: S, T und R. Das allgemeine Bindungspolynom für dieses Modell ist mit

$$P_{\text{all}}^T = Q_R^m P_R^n + L_S^0 Q_S^m P_S^n + L_T^0 Q_T^m P_T^n \quad (2.25)$$

gegeben. Die Anzahl der Untereinheiten pro Oligomer kann hier mit $n = 6$ oder 12 festgelegt werden. m ist die Anzahl der identischen Uratbindungsstellen pro allosterischer Untereinheit. Das Sauerstoffbindungspolynom ergibt sich auch hier durch

$$P_\alpha = 1 + k_\alpha^{O_2} x \quad (2.26)$$

und das des Effektors mit

$$Q_\alpha = 1 + k_\alpha^{\text{eff}} y. \quad (2.27)$$

Für α gilt $\alpha = R, S, T$. Die Sauerstoffkonzentration ist mit x und die Effektorkonzentration mit y gegeben. Es ergeben sich somit drei Bindungskonstanten $k_\alpha^{O_2}$ für die Sauerstoffbindung, sowie drei weitere k_α^{eff} für die Effektorbindung. Die verschiedenen Konformationen befinden sich wie im Nested-MWC-Modell im Gleichgewicht zueinander und werden über

$$L_T^0 = \frac{[T_0]}{[R_0]}, \quad L_S^0 = \frac{[S_0]}{[R_0]} \quad (2.28)$$

beschrieben. $[T_0]$, $[R_0]$ und $[S_0]$ stellen hierbei die Konzentrationen der einzelnen Konformationen in einem Zustand ohne Ligand dar, in diesem Fall ohne Effektor und ohne Sauerstoff. Da man auch bei diesem Modell davon ausgehen kann, dass der Effektor die Sauerstoffbindung konstant beeinflusst, wird auch hier ein vereinfachtes Bindungspolynom

$$P_{\text{Three}} = P_R^n + L_S^{\text{eff}} P_S^n + L_T^{\text{eff}} P_T^n \quad (2.29)$$

eingeführt. L_S^{eff} und L_T^{eff} stellen nun die vom Effektor beeinflussten Gleichgewichtskonstanten dar. Der Einfluss des Effektors wird wie folgt definiert:

$$L_T^{\text{eff}} = L_T^0 W_T^{\text{eff}} \quad (2.30)$$

$$L_S^{\text{eff}} = L_S^0 W_S^{\text{eff}}. \quad (2.31)$$

Für die Konstanten W_T^{eff} und W_S^{eff} gilt weiterhin

$$W_T^{\text{eff}} = \frac{(1 + k_T^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_R^{\text{eff}} y)^m} \quad (2.32)$$

$$W_S^{\text{eff}} = \frac{(1 + k_S^{\text{eff}} y)^m}{(1 + k_R^{\text{eff}} y)^m}. \quad (2.33)$$

Die Verteilung der Konformationen der allosterischen Untereinheiten kann über

$$f_T = \frac{P_R^n}{P_{\text{Three}}}, f_S = \frac{L_S^{\text{eff}} P_S^n}{P_{\text{Three}}}, f_R = \frac{L_T^{\text{eff}} P_T^n}{P_{\text{Three}}} \quad (2.34)$$

berechnet werden.

Für beide Modelle gilt, dass die berechneten Bindungskonstanten unabhängig von der Effektorbindung sind. Der Einfluss des Effektors spiegelt sich in den allosterischen Gleichgewichtskonstanten wieder (siehe Gleichung 2.15-2.17 sowie 2.30 und 2.31). Als Referenzzustand für den Einfluss des Effektors auf die Bindungseigenschaften des Moleküls wurde der Zustand ohne Effektor bestimmt, der sich in den Gleichgewichtskonstanten L_S^0 und L_T^0 für das Three-State-MWC-Modell und l_R^0 , l_T^0 und Λ^0 für das Nested-MWC-Modell zeigt (Wyman und Gill, 1990).

Anwendung der Regression

Um eine Regression mit der besten Anpassung an die gemessenen Daten zu ermöglichen, als auch die freien Parameter mit einem geringen Fehler zu bestimmen, wurde für beide Modelle folgende Regressionsstrategie angewendet: Da wie oben verdeutlicht, die Bindungskonstanten unabhängig von der Bindung eines Effektors sind, wurden die Bindungskurven um jene Bindungskonstanten zu bestimmen in Gruppen analysiert (siehe Tabelle 2.1). Um die Anzahl der freien Parameter in Gruppe 3 zu reduzieren, wurden die Bindungs-

Tabelle 2.1: Einteilung der Analysengruppen i auf die verschiedenen Temperaturbereiche in °C und der dazu gehörigen Datengruppen. Bei den Datengruppen handelt es sich um Bindungskurven, die jeweils mit bzw. ohne den angegebenen Effektor gemessen wurden.

i	Temperatur [°C]	Datengruppe
1	10	Bindungskurven $\pm$ Urat, $\pm$ Koffein
2	15	Bindungskurven $\pm$ Urat, $\pm$ Koffein
3	20	Bindungskurven $\pm$ Urat, $\pm$ Koffein, $\pm$ Paraxanthin, $\pm$ Theobromin, $\pm$ Theophyllin, $\pm$ Hypoxanthin, $\pm$ 1-Methylxanthin, $\pm$ 3-Methylxanthin, $\pm$ 7-Methylxanthin, $\pm$ Isokoffein, $\pm$ 1,3,7-Trimethylharnsäure
4	25	Bindungskurven $\pm$ Urat, $\pm$ Koffein
5	30	Bindungskurven $\pm$ Urat, $\pm$ Koffein

konstanten in dieser Analysegruppe in den jeweiligen Untergruppen „Bindungskurve $\pm$ 2 Effektoren“ analysiert und anschließend ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Die so bestimmten Sauerstoffbindungskonstanten wurden für die folgenden Regressionsanalysen konstant gesetzt, so dass die Gleichgewichtskonstanten der Bindungskurven für jeden gebundenen Effektor bei der entsprechenden Temperatur bestimmt werden konnten. Die Faktoren, die den Einfluss des Effektors auf den Referenzzustand angeben, wurden als effektorspezifisch angenommen und somit für jeden Liganden bestimmt. Um die Konvergenz zu erhöhen, wurden hierbei zunächst $\log l_R^{\text{eff}}$, $\log l_T^{\text{eff}}$ und $\log \Lambda^{\text{eff}}$ sowie $\log L_T^{\text{eff}}$ und $\log L_S^{\text{eff}}$ bestimmt. Anschließend wurde mit diesen Annäherungen eine erneute Regression zur Bestimmung der Parameter l_R^{eff} , l_T^{eff} und Λ^{eff} sowie L_T^{eff} und L_S^{eff} durchgeführt, da die mit der logarithmischen Regression berechneten Fehler sich nicht mit anderen Regressionsfehlern vergleichen ließen. Die Berechnung der Einflussfaktoren W_T^{eff} und W_S^{eff} als auch F_R^{eff} , F_T^{eff} und F^{eff} aus den Formeln 2.32 und 2.33 sowie 2.18-2.20 erwiesen sich als schwierig, da die Parameter aus den Regressionen nicht eindeutig umgerechnet werden konnten.

2.7.2 Kalorimetrische Bindungskurven

Non-interacting-site-Modell

Zur Analyse der Daten wurde das Computerprogramm Origin 7.0 (Microcal Inc., Northampton, MA) verwendet. Das "non interacting siteModell charakterisiert den Bindungs-

prozess über die mikroskopische Bindungskonstante k , die Reaktionsenthalpie ΔH^0 und die Anzahl der Bindungsstellen n . Das Makromolekül stellt bei diesem Modell einen multivalenten Rezeptor mit mehreren identischen aber invarianten Bindungsaffinitäten für den entsprechenden Liganden dar. Die mikroskopische Bindungskonstante k ergibt sich aus

$$k = \frac{[n_b]}{[n_f][L_f]} \quad (2.35)$$

dabei stellt $[n_b]$ die Konzentration der besetzten Bindungsstellen, $[n_f]$ die Konzentration freier Bindungsstellen und $[L_f]$ die freie Ligandenkonzentration dar. Die Gesamtzahl der Bindungsstellen n_t ist mit

$$[n_t] = [n_b] + [n_f] \quad (2.36)$$

gegeben. Für die Sättigung Θ gilt

$$\Theta = \frac{[n_b]}{[n_f] + [n_b]} = \frac{[n_b]}{[n_t]}. \quad (2.37)$$

Setzt man 2.36 in Gleichung 2.37 ein, so erhält man

$$\Theta = \frac{k[L_f]}{1 + k[L_f]}. \quad (2.38)$$

Das hier verwendete Non-Interacting-Site-Modell bezieht sich auf n identische Bindungsstellen mit gleichen konstanten Affinitäten, somit gilt

$$\Theta_i = \frac{k_i[L_f]}{1 + k_i[L_f]} \quad i = 1 \text{ bis } n. \quad (2.39)$$

n ist die maximale Anzahl an Bindungsstellen. Da sich jede Bindungsstelle identisch verhält, ergibt sich

$$\Theta = n \frac{k[L_f]}{1 + k[L_f]}. \quad (2.40)$$

Erweitert man Gleichung 2.40 um den Term $[M_t]V$, der die Konzentration an Makromolekül in der Messzelle wiedergibt, und um die molare Enthalpiedifferenz ΔH^0 , welche die Grundlage des Messsignals q darstellt, so erhält man

$$q = \frac{n[M_t]V\Delta H^0 k[L_f]}{1 + k[L_f]}. \quad (2.41)$$

$[M_t]$ ist hierbei die Makromolekülkonzentration und V stellt das Volumen der Reaktionskammer dar. Gleichung 2.41 charakterisiert den Bindungsprozess durch die mikroskopische Bindungskonstante k und durch die Änderung der freien Enthalpie ΔH^0 .

Two-Sets-of-Sites-Modell

Hierbei wird angenommen, dass das Makromolekül als multivalenter Rezeptor fungiert, dessen Bindungsstellen sich durch unterschiedliche aber invariante Bindungsaffinitäten für

den Liganden auszeichnen. In diesem Fall geht man von zwei unterschiedlichen unabhängigen Bindungstypen aus. Die jeweiligen mikroskopischen Bindungskonstanten ergeben sich somit zu

$$k_1 = \frac{[n_{b_1}]}{[n_{f_1}][L_{f_1}]} \quad (2.42)$$

$$k_2 = \frac{[n_{b_2}]}{[n_{f_2}][L_{f_2}]} \quad (2.43)$$

Dabei stellt $[n_{b_i}]$ die Gesamtzahl der Bindungsstellen und $[n_{f_i}]$ die Anzahl der freien Bindungsstellen für den jeweiligen Bindungsplatz dar ($i = 1$ oder 2). Für die Sättigung Θ gilt daher

$$\Theta = \frac{n_1 k_1 [L_f]}{1 + k_1 [L_f]} + \frac{n_2 k_2 [L_f]}{1 + k_2 [L_f]} \quad (2.44)$$

Auch hier muss der Term 2.44 um die Makromolekülkonzentration M_t , sowie das Volumen der Reaktionskammer V und der Bindungsenthalpie ΔH^0 erweitert werden. Daraus ergibt sich

$$q = M_t V \left(\frac{n_1 k_1 [L_f] \Delta H_1^0}{1 + k_1 [L_f]} + \frac{n_2 k_2 [L_f] \Delta H_2^0}{1 + k_2 [L_f]} \right) \quad (2.45)$$

q stellt die Wärmefreisetzung im kalorimetrischen Experiment dar.

Multisite-Interactive-Modell

Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass das Makromolekül als multivalenter Rezeptor Bindungsstellen besitzt, deren Affinität von der Bindung der Liganden an die Bindungsstelle beeinflusst wird. Die Einführung der homeotropen Allosterie führt zu einer deutlich erhöhten Komplexität des Modells gegenüber den vorangegangenen Modellvorstellungen. Es wird jedem Bindungsschritt eine eigene Bindungskonstante zugeordnet. Die Anzahl der Bindungsplätze pro Makromolekül wird demnach vorgegeben. Im Falle des 2x-hexameren Hämocyansins geht man von zwei Bindungsstellen aus. Daraus ergeben sich vier mikroskopische Bindungskonstanten (siehe Abbildung 2.3a). Da nur drei der vier Konstanten unabhängig voneinander sind, ist es nicht möglich durch die Bindungskurve alle mikroskopischen Bindungskonstanten zu beschreiben. Der stoichiometrische Zusammenhang ist dagegen einfacher. Es gibt nur zwei stoichiometrische Bindungskonstanten unter diesen Bedingungen (2.3b). Daher ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz für die stoichiometrische Bindungskonstanten K_i

$$K_1 = \frac{[ML_1]}{[M][L_f]} \quad (2.46)$$

$$K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML_1][L_f]} \quad (2.47)$$

$[ML_1]$ und $[ML_2]$ stellen hierbei die Konzentrationen des Makromoleküls dar, das entweder mit ein oder mit zwei Liganden besetzt ist. Unter stoichiometrischen Gesichtspunkten

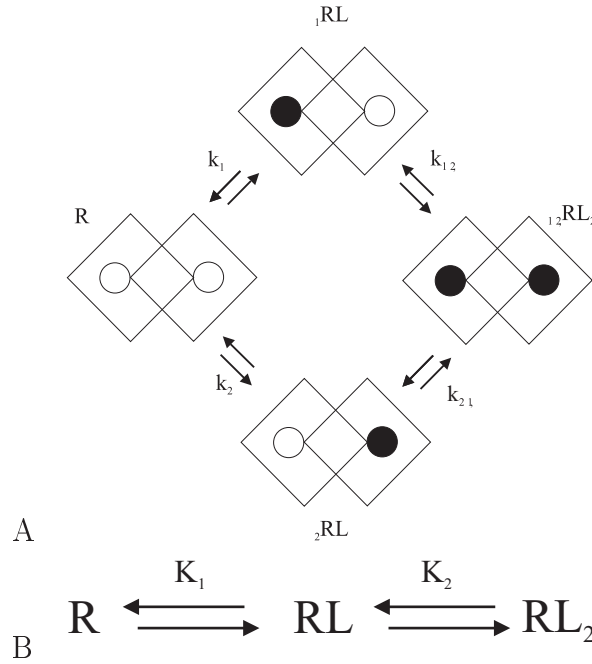


Abbildung 2.3: Vergleich der verschiedenen Typen von Ligand-Rezeptor-Bindungskonstanten für einen Rezeptor mit zwei Bindungsstellen unter Berücksichtigung homeotroper Allosterie. Der Rezeptor ohne gebundenen Ligand ist mit R dargestellt. Die Bindungsstellen am Rezeptor sind mit 1 und 2 gekennzeichnet. Ist die Bindungsstelle schwarz ausgefüllt, ist sie besetzt. Der erste Ligand bindet an Bindungsstelle 1 (${}_1\text{RL}$). Die entsprechende mikroskopische Bindungskonstante ist k_1 . Der zweite Ligand bindet an die Bindungsstelle 2 des Zustands ${}_1\text{RL}$. Für diesen zweiten Bindungsschritt gilt die Bindungskonstante $k_{1,2}$. Die alternative Reihenfolge ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Der mit dem Liganden gesättigte Rezeptor ist mit ${}_1,2\text{RL}_2$ definiert.

berechnet man die Sättigung Θ über das Verhältnis an gebundenem Ligand $[L_g]$ zu der gesamten Menge des Makromoleküls $[M_t]$. Für die Sättigung gilt daher

$$\Theta = \frac{[ML_1] + 2[ML_2]}{[M] + [ML_1] + [ML_2]}. \quad (2.48)$$

Um die stoichiometrische Sättigungsfunktion in Abhängigkeit von der stoichiometrischen Bindungskonstante darzustellen, werden 2.46 und 2.47 in 2.48 eingesetzt. Es gilt somit

$$\Theta = \frac{K_1[L_f] + 2K_1K_2[L_f]^2}{1 + K_1[L_f] + K_1K_2[L_f]^2}. \quad (2.49)$$

Die Abhängigkeit der Sättigung von der freien Ligandenkonzentration ist demnach über die beiden stoichiometrischen Bindungskonstanten K_1 und K_2 definiert. Für die kalorimetrischen Untersuchungen muss Gleichung 2.49 noch um den Term $[M_t]V$ sowie die molare freie Enthalpie ΔH^0 erweitert werden. Daraus folgt

$$q = \frac{K_1[L_f]\Delta H_1^0 + 2K_1K_2[L_f](\Delta H_1^0 + \Delta H_2^0)}{1 + K_1[L_f] + K_1K_2[L_f]^2}. \quad (2.50)$$

Die stoichiometrische und die mikroskopische Bindungskonstante ist über die Abhängigkeit von der Konzentration an gebundenem Liganden als auch der freien Ligandenkonzentration miteinander verbunden. Setzt man die beiden Bindungskonstantentypen nun

in einen Zusammenhang, so gilt

$$K_j = \frac{n - (j - 1)}{j} k, \quad (2.51)$$

wobei K_j die korrespondierende, stoichiometrische Bindungskonstante, k die mikroskopische Bindungskonstante und j den entsprechenden Bindungsschritt definiert. n stellt die Anzahl der Bindungsschritte am Makromolekül dar (Klotz, 1997).

2.8 Chemikalien

Die Chemikalien höchstmöglicher Reinheit wurden von folgenden Firmen bezogen: Acros (Geel, Belgien), J.T. Baker (New Jersey, U.S.A.), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München) und Sigma (Dreisenhofen). Alle Lösungen wurden mit hochreinem Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt. Es wurden folgende Liganden für die Messungen in der ITC und Diffusionskammer verwendet: Koffein, Urat, 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin), 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin), 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Hypoxanthin, 1,3,9-Trimethylxanthin (Isokoffein) und 1,3,7-Trimethylharnsäure. Alle Liganden wurden von der Firma Sigma (Dreisenhofen) bezogen.

2.9 Statistische Auswertung

Die unterschiedlichen Messergebnisse wurden mit Hilfe des t-Tests beziehungsweise der One Way ANOVA (Holm-Sidak-Methode) auf statistische Signifikanz untersucht. Lag keine Normalverteilung und/oder Varianzgleichheit vor, so wurde mit Hilfe des ANOVA on Ranks (Dunn's Methode) auf Signifikanz getestet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$) wurden die Unterschiede der Daten als signifikant angenommen. Die graphische Darstellung und die Auswertung 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).

3

Ergebnisse

3.1 Gewinnung von Hämocyanin

Es konnte eine hohe Reinheit des Hämocyanins des Europäischen Hummers durch das nach Menze (2001) angewendete Verfahren erzielt werden. Der Hämocyaninanteil am Proteingehalt der Hämolymphe betrug zwischen 90 und 95 %. Die mittlere Konzentration an Hämocyanin lag bei $30,14 \pm 5,99 \text{ mg ml}^{-1}$, bei einem Gesamtproteingehalt von $32,43 \pm 7,10 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Qualität des Hämocyanins kann nach Markl et al. (1979) über das Verhältnis der Extinktionen bei 280 zu 334 nm überprüft werden. Für das nach Menze (2001) gereinigte Hämocyanin ergab sich ein Verhältnis von ca 4,8.

In Abbildung 3.1 ist ein Elutionsprofil einer Anionenaustausch-Chromatographie mittels einer Resource Q6-Säule (GE Healthcare, München) der Hämocyaninlösung nach einer präparativen Zentrifugation (siehe Kapitel 2.2) dargestellt.

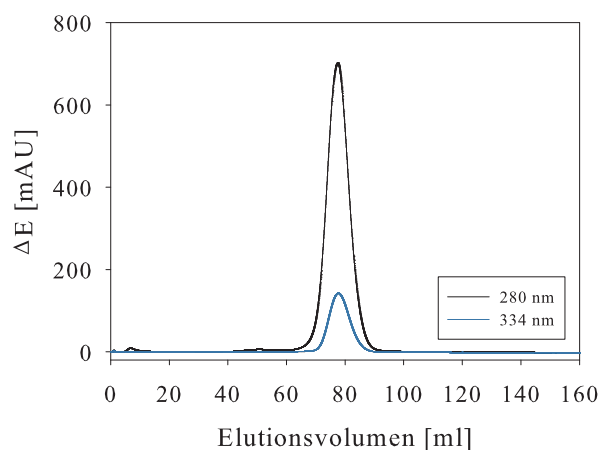


Abbildung 3.1: Elutionsprofil der Hämocyaninlösung (*Homarus vulgaris*) unter Verwendung einer Resource Q6-Säule (GE Healthcare, München) nach einer präparativen Zentrifugation. Als Elutionspuffer wurde 20 mM TRIS-HCl (20°C, pH 8,0) mit 40 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂ verwendet. Die Extinktion des Durchflusses wurde bei 280 nm (schwarz) und 334 nm (blau) aufgezeichnet. Die Proteine wurden mittels eines linearen NaCl-Gradienten (40 – 540 mM) von der Säule gelöst.

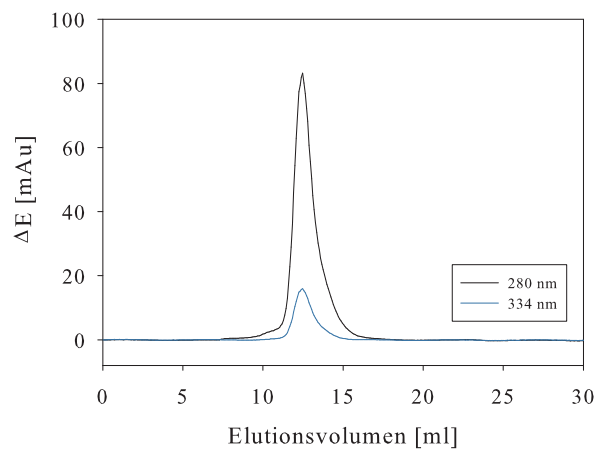


Abbildung 3.2: Elutionsprofil einer Hämocyaninlösung (*Homarus vulgaris*) unter Verwendung einer Superose-6 HR-Säule (GE Healthcare, München). Als Elutionspuffer wurde HEPES-Puffer (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , pH 8 bei 20°C eingestellt) verwendet. Die Extinktion des Durchflusses wurde bei 280 nm (schwarz) und 334 nm (blau) aufgezeichnet.

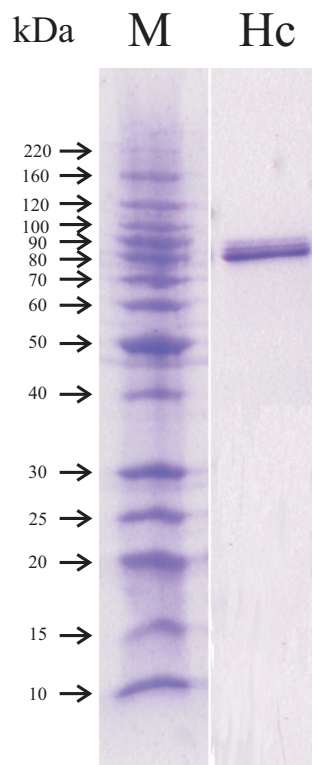


Abbildung 3.3: SDS-Disk-Elektrophorese des Hämocyanins von *Homarus vulgaris* nach der letzten präparativen Zentrifugation. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue 350 angefärbt. Als Marker wurde der molekulare Größenmarker der Firma Invitrogen (BenchMark Protein Ladder) verwendet. Die Größen der Markerpositionen sind linksseitig aufgeführt.

Das Hämocyanin des Europäischen Hummers eluierte bei einem Volumen zwischen 65 und 85 ml. Das Elutionsmaximum trat bei einem Volumen von 78 ml auf, entsprechend einer NaCl-Konzentration von 247,5 mM. Die im Elutionsbereich des Hämocyanins liegenden Fraktionen wurden vereinigt und erneut einer präparativen Zentrifugation unterzogen

(siehe Kapitel 2.2).

Anschließend wurde der Aggregationszustand des Hämocyanins über eine Gelpermeationschromatographie mittels einer Superose-6 HR-Säule (siehe Kapitel 2.3) untersucht. Das Elutionsmaximum des gereinigten Hämocyanins lag bei 12,5 ml (dodekamere Assoziate). Wenige Teile des Hämocyanins eluierten bereits bei 10,5 ml. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um höhere (2 x 12-mere) Assoziate des Hämocyanins. Es konnten keine weiteren Plasmafaktoren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2). Die Qualität wurde, bevor die Hämocyaninlösung im kalorimetrischen bzw. im Sauerstoffbindungs-Experiment angewendet wurde, erneut photometrisch bestimmt.

Eine elektrophoretische Trennung der Hämocyaninlösung sollte Erkenntnisse über die Qualität der Reinigung des Hämocyanins, als auch über die Größe und Anzahl der verschiedenen Untereinheiten des Hämocyanins liefern. Abbildung 3.3 zeigt ein diskontinuierliches SDS-Porengradienten-Gel. Es sind drei Banden zu erkennen (Markl et al., 1979), die alle ein apparentes Molekulargewicht von 82,1 bis 87,5 kDa aufzeigen.

3.2 Sauerstoffbindungsstudien

Tabelle 3.1: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H des Hämocyanins von *Homarus vulgaris* bei unterschiedlichen Temperaturen in der An- und Abwesenheit von Urat und Koffein [1 mM]. Es wurden zwischen 3-8 Wiederholungen der Versuche durchgeführt ($X \pm SD$).

Effektor	Temperatur					
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	
ohne Effektor P_{50}	7,77 $\pm$	10,04 $\pm$	14,06 $\pm$	17,81 $\pm$	25,95 $\pm$	
	0,09	0,68	0,99	0,44	0,68	
Koffein P_{50}	4,32 $\pm$	5,48 $\pm$	6,29 $\pm$	8,72 $\pm$	12,40 $\pm$	
	0,27	0,38	1,10	0,52	0,69	
Urat P_{50}	4,46 $\pm$	6,14 $\pm$	8,16 $\pm$	11,84 $\pm$	17,25 $\pm$	
	0,20	0,38	0,17	0,36	1,47	
ohne Effektor n_H	4,15 $\pm$	4,08 $\pm$	3,97 $\pm$	3,50 $\pm$	3,16 $\pm$	
	0,19	0,19	0,18	0,13	0,10	
Koffein n_H	3,36 $\pm$	3,27 $\pm$	2,88 $\pm$	2,56 $\pm$	2,30 $\pm$	
	0,72	0,12	0,14	0,02	0,22	
Urat n_H	3,19 $\pm$	3,01 $\pm$	2,88 $\pm$	2,80 $\pm$	2,68 $\pm$	
	0,27	0,34	0,32	0,26	0,25	

Um den Einfluss verschiedener Effektoren auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) zu untersuchen, wurden Sauerstoffbindungskurven bei verschiedenen Temperaturen (10 – 30°C) in An- und Abwesenheit der beiden Effektoren Urat und Koffein, als auch bei 20°C für 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin), 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin), 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure aufgenommen. Urat ist der natürliche Modulator des Hämocyanins, alle anderen verwen-

Tabelle 3.2: Halbsättigungspunkte P_{50} [Torr] und Hill-Koeffizienten n_H der Sauerstoffbindung des Hämocyans von *Homarus vulgaris* bei 20°C in der An- und Abwesenheit verschiedener Effektoren [1 mM]. Es wurden zwischen 3-8 Wiederholungen der Versuche durchgeführt ($X \pm SD$).

Effektor	P_{50}	n_H
ohne Effektor	$14,06 \pm 0,99$	$3,97 \pm 0,18$
Paraxanthin	$5,76 \pm 0,22$	$2,56 \pm 0,35$
Theobromin	$6,68 \pm 0,77$	$2,52 \pm 0,19$
Theophyllin	$6,57 \pm 0,44$	$2,50 \pm 0,27$
1-Methylxanthin	$7,16 \pm 0,55$	$3,07 \pm 0,10$
3-Methylxanthin	$7,15 \pm 0,32$	$2,73 \pm 0,25$
7-Methylxanthin	$6,29 \pm 0,25$	$2,74 \pm 0,23$
Isokoffein	$7,13 \pm 0,22$	$3,11 \pm 0,13$
TMH	$7,24 \pm 0,12$	$3,30 \pm 0,17$

deten Effektoren, sollten in Zusammenhang mit kalorimetrischen Bindungsstudien einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Bindung der Effektoren an das Hämocyanin gewähren.

Tabelle 3.1 zeigt die Halbsättigungswerte (P_{50}) beziehungsweise die Hill-Koeffizienten (n_H) für die Bindung von Sauerstoff an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* in Abhängigkeit von der Temperatur bei An- und Abwesenheit von 1 mM Koffein bzw. Urat. Der P_{50} der Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Urat änderte sich über das gesamte gemessene Temperaturspektrum signifikant. Der P_{50} stieg hier signifikant von $4,46 \pm 0,20$ Torr bei 10°C bis schließlich auf $17,25 \pm 1,47$ Torr bei 30°C an. Auch der Halbsättigungswert in Anwesenheit von Koffein erhöhte sich im Temperaturbereich zwischen 10 und 30°C signifikant. Im Falle der Sauerstoffbindungsstudien ohne Effektor waren nur in breiteren Temperaturbereichen, wie zwischen 10 und 30°C beziehungsweise zwischen 15 und 30°C signifikante Änderungen des P_{50} zu verzeichnen. Dennoch konnte bei allen temperaturabhängigen Messungen gezeigt werden, dass der Halbsättigungsdruck des Hämocyans von *Homarus vulgaris* mit steigender Temperatur zunimmt. Für den Hill-Koeffizienten und der dadurch ausgedrückten positiv kooperativen Bindung des Sauerstoffs an das Hämocyanin konnte nur in einigen Fällen eine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt werden. So wurde eine signifikante Abnahme der Kooperativität der Sauerstoffbindung in Abwesenheit der Effektoren zwischen 10, 15, 20 und 30 °C gemessen. In Anwesenheit von Koffein konnte nur zwischen 10 und 30 °C eine signifikante Abnahme des Hill-Koeffizienten von $3,36 \pm 0,72$ auf $2,30 \pm 0,22$ berechnet werden. Bei einer Sättigung mit Urat konnte keine signifikante Änderung der Kooperativität der Sauerstoffbindung nachgewiesen werden. Koffein und Urat zeigten bei 20, 25 und 30° C einen signifikant unterschiedlichen Halbsättigungswert.

Abbildung 3.4 verdeutlicht die Änderung der Sauerstoffbindungsparameter n_H und P_{50} in Abhängigkeit von der Temperatur [°C]. Der Hill-Koeffizient nahm mit zunehmen-

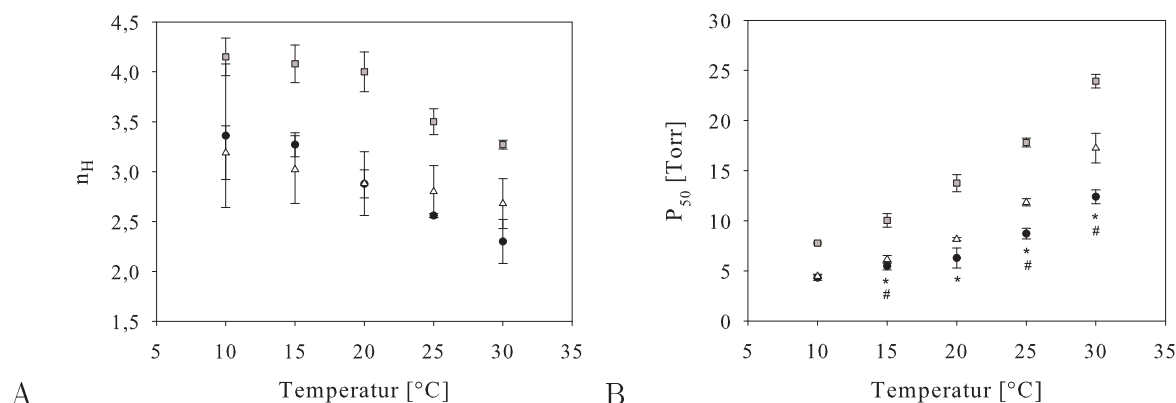


Abbildung 3.4: Auftragung des Sauerstoffbindungsparameters A: Hill-Koeffizient n_H und B: Halbsättigungsdruck P_{50} gegen die Temperatur [°C]. ohne Effektor: □, Koffein ●, Urat: △. *: Signifikanter Unterschied zum vorherigen Wert (Urat), #: Signifikanter Unterschied zum vorherigen Wert (Koffein)

der Temperatur ab. Der Halbsättigungsdruck zeigte signifikante Zunahmen bei Erhöhung der Temperatur. Für alle Effektoren (siehe Tabelle 3.1 und 3.2) konnte für beide Hill-Parameter eine signifikante Änderung im Vergleich zum Referenzzustand, der Sauerstoffbindung in Abwesenheit eines Effektors, nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die Messungen bei verschiedenen Temperaturen für die Urat- und Koffeinbindung, wobei hier die jeweilige Referenzmessung in Abwesenheit des Effektors bei der jeweiligen Temperatur erfolgte.

Die deutlichste Abnahme sowohl des Halbsättigungswerts ($5,76 \pm 0,22$ Torr) als auch des Hill-Koeffizienten ($2,56 \pm 0,35$) konnte mit dem Effektor Paraxanthin beobachtet werden. Alle verwendeten Effektoren erniedrigten im Vergleich zum Referenzzustand den P_{50} als auch den n_H signifikant. Zudem unterschieden sich einige Effektoren auch untereinander signifikant in ihrem Halbsättigungswert, als auch in ihrem Hill-Koeffizienten. Der Halbsättigungswert von Paraxanthin unterschied sich zu den Halbsättigungswerten von 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure (TMH) signifikant.

Um einen tieferen Einblick in die Allosterie der Sauerstoffbindung und deren Beeinflussung durch die gebundenen Effektoren zu erlangen, wurden die Sauerstoffbindungskurven einer nicht-linearen Regression mit den in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Modellen und Analysegruppen unterzogen.

3.2.1 Analyse der Sauerstoffbindungskurven

Menze et al. (2005) konnten zeigen, dass das Nested-MWC-Modell als auch das Three-State-Modell zur Analyse der Sauerstoffbindung des Hämocyanins des Europäischen Hummers angewendet werden kann. Sie zeigten eine Analyse von Sauerstoffbindungskurven, die bei verschiedenen pH-Werten in An- und Abwesenheit der Effektoren Urat oder Koffein

Tabelle 3.3: Sauerstoffbindungskonstanten $k_{\alpha\beta}$ für das Nested-MWC-Modell. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.14 berechnet. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich bei Analysegruppe 1,2,4 und 5 um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter. Bei Analysegruppe 3 wurde $X \pm SD$ berechnet. $\alpha\beta$: Konformation rT, tT, tR oder rR.

Analyse- gruppe	Tempe- ratur [°C]	Bindungskonstanten [Torr ⁻¹]			
		k_{rT}	k_{tT}	k_{tR}	k_{rR}
1	10	$30,93 \pm 0,01$	$0,090 \pm 0,025$	$0,024 \pm 0,009$	$5,40 \pm 0,01$
2	15	$12,67 \pm 0,02$	$0,025 \pm 0,0015$	$0,11 \pm 0,04$	$4,48 \pm 0,04$
3	20	$5,10 \pm 0,09$	$0,015 \pm 0,002$	$0,09 \pm 0,03$	$4,19 \pm 0,11$
4	25	$3,84 \pm 0,03$	$0,018 \pm 0,001$	$0,074 \pm 0,008$	$3,52 \pm 0,04$
5	30	$2,90 \pm 0,04$	$0,012 \pm 0,0009$	$0,04 \pm 0,0003$	$3,40 \pm 0,08$

aufgenommen wurden. In dieser vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse von Sauerstoffbindungskurven bei verschiedenen physiologischen Temperaturen (10 - 30°C) in An- und Abwesenheit der Effektoren Urat und Koffein durchgeführt. Zweitens wurden Sauerstoffbindungskurven in Anwesenheit verschiedener Xanthinderivate analysiert (siehe Kapitel 2.5), um den Einfluss der Struktur des Effektors auf die Sauerstoffbindung beurteilen zu können. Die Bindung aller Effektoren wurde anschließend thermodynamisch untersucht (siehe Kapitel 2.6)

Die in Kapitel 2.7.1 beschriebene Analysegruppen wurden zunächst einer nicht-linearen Regression unterzogen. Dabei wurden jeder der Untergruppen eigene Gleichgewichtskonstanten zugewiesen. Für eine Analysegruppe, die durch die Temperatur während der Messung definiert war, gab es somit einen Satz an Sauerstoffbindungskonstanten und der Anzahl an Untergruppen entsprechende Sätze an Gleichgewichtskonstanten. Unter Anwendung des Nested-MWC-Modells konnten die jeweiligen Sauerstoffbindungskonstanten mit geringen Unsicherheiten berechnet werden. k_{rT} nahm mit zunehmender Temperatur von $30,93 \pm 0,01$ Torr⁻¹ bei 10°C bis zu $2,90 \pm 0,04$ Torr⁻¹ bei 30°C signifikant ab. k_{rR} nahm ebenfalls von $5,40 \pm 0,01$ bei 10°C auf $3,40 \pm 0,08$ bei 30°C signifikant ab. Die Parameter k_{tT} und k_{tR} nahmen ebenfalls signifikant zwischen 10 und 30°C ab.

Die Analyse der Sauerstoffbindungskurven mittels des Three-State-Modells erwies sich als schwieriger, da sich k_R nur mit einer großen Unsicherheit bestimmen ließ. Daraufhin wurde k_R festgesetzt. In Tabelle 3.4 und 3.5 sind die Ergebnisse der Regressionen angegeben, welche die Daten am besten beschrieben und die Parameter als auch die Regression mit den geringsten Fehlern versehen waren.

Die mit dem Three-State-Modell berechneten Sauerstoffbindungskonstanten nahmen mit zunehmender Temperatur ab. Die Bindungskonstante k_S ($n = 6$) nahm mit $0,96 \pm 0,57$ Torr⁻¹ bei 10°C auf bis zu $0,17 \pm 0,03$ Torr⁻¹ bei 30°C signifikant ab. Eine signifikante Änderung war auch bei k_T ($n = 6$) von $0,032 \pm 0,004$ Torr⁻¹ bei 10°C auf $0,012 \pm 0,001$ Torr⁻¹ bei 30°C zu verzeichnen. Um die Güte der Regression beurteilen zu

Tabelle 3.4: Sauerstoffbindungskonstanten k_α für das Three-State-MWC-Modell. Die Bindungskonstanten wurden mit Formel 2.29 für $n=12$ berechnet. k_R wurde während der Analyse konstant gehalten. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich für Analysegruppe 1, 2, 4 und 5 um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter. Bei Analysegruppe 3 wurde $X \pm SD$ berechnet. α : Konformation R, S, oder T.

Analysegruppe	Temperatur [°C]	Bindungskonstanten [Torr ⁻¹]		
		k_R	k_S	k_T
1	10	1,30	$0,61 \pm 0,19$	$0,053 \pm 0,004$
2	15	1,10	$0,45 \pm 0,10$	$0,039 \pm 0,003$
3	20	0,90	$0,23 \pm 0,02$	$0,023 \pm 0,0009$
4	25	0,50	$0,21 \pm 0,02$	$0,024 \pm 0,001$
5	30	0,40	$0,12 \pm 0,007$	$0,019 \pm 0,0009$

Tabelle 3.5: Sauerstoffbindungskonstanten k_α für das Three-State-MWC-Modell. Die Konstanten wurden mit Formel 2.29 für $n=6$ berechnet. k_R wurde während der Analyse konstant gehalten. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich für Analysegruppe 1,2,4 und 5 um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter. Bei Analysegruppe 3 wurde $X \pm SD$ berechnet. α : Konformation R, S, oder T.

Analysegruppe	Temperatur [°C]	Bindungskonstanten [Torr ⁻¹]		
		k_R	k_S	k_T
1	10	10,00	$0,96 \pm 0,57$	$0,032 \pm 0,004$
2	15	6,20	$0,82 \pm 0,50$	$0,021 \pm 0,004$
3	20	3,60	$0,52 \pm 0,17$	$0,016 \pm 0,002$
4	25	1,80	$0,31 \pm 0,08$	$0,014 \pm 0,002$
5	30	1,80	$0,17 \pm 0,03$	$0,012 \pm 0,001$

können und somit die verschiedenen Modelle zu vergleichen, wurde für jede Analysegruppe χ^2 berechnet (Tabelle 3.6). Ein Vergleich der beiden Annahmen des Three-State-Modells ($n=6$ und $n=12$) zeigte, dass der χ^2 -Wert für die Regression unter der Annahme von $n=12$ 1,5 bis 2,4 mal höher war als der χ^2 -Wert für das Three-State-Modell für $n=6$. Der χ^2 -Wert des Nested-MWC-Modells erwies sich bis auf eine Ausnahme (Analysegruppe 5) 1,5 bis 2,0-fach niedriger als der χ^2 -Wert des Three-State-Modells unter Annahme von sechs Bindungsstellen. Für Analysegruppe 5 zeigte das Three-State-Modell ($n=6$) eine 2,3-fach bessere Regression auf. Im Folgenden werden daher nur noch das Nested-MWC-Modell und das Three-State-MWC-Modell ($n=6$) erläutert, da das Three-State-MWC-Modell ($n=12$) in allen Regressionen einen schlechteren χ^2 -Wert aufzeigte.

Abbildung 3.5 zeigt alle Regressionen der Analysegruppen 1 (Abb. 3.5A) bis 5 (Abb. 3.5E) für das Nested-MWC und das Three-State-MWC-Modell ($n=6$). Mit beiden Modellen war es möglich die Sauerstoffbindungsdaten zu beschreiben und eine Regression durchzuführen. Die χ^2 -Werte (Tabelle 3.6) waren für das Nested-MWC-Modell in den meisten Anwendungen niedriger. Um die Beschreibung der Sauerstoffbindungsdaten mit den zwei Regressionsmodellen abschließend beurteilen zu können, wurden die im Folgenden aufgezeigten Gleichgewichtsbindungskonstanten für beide Modelle berechnet.

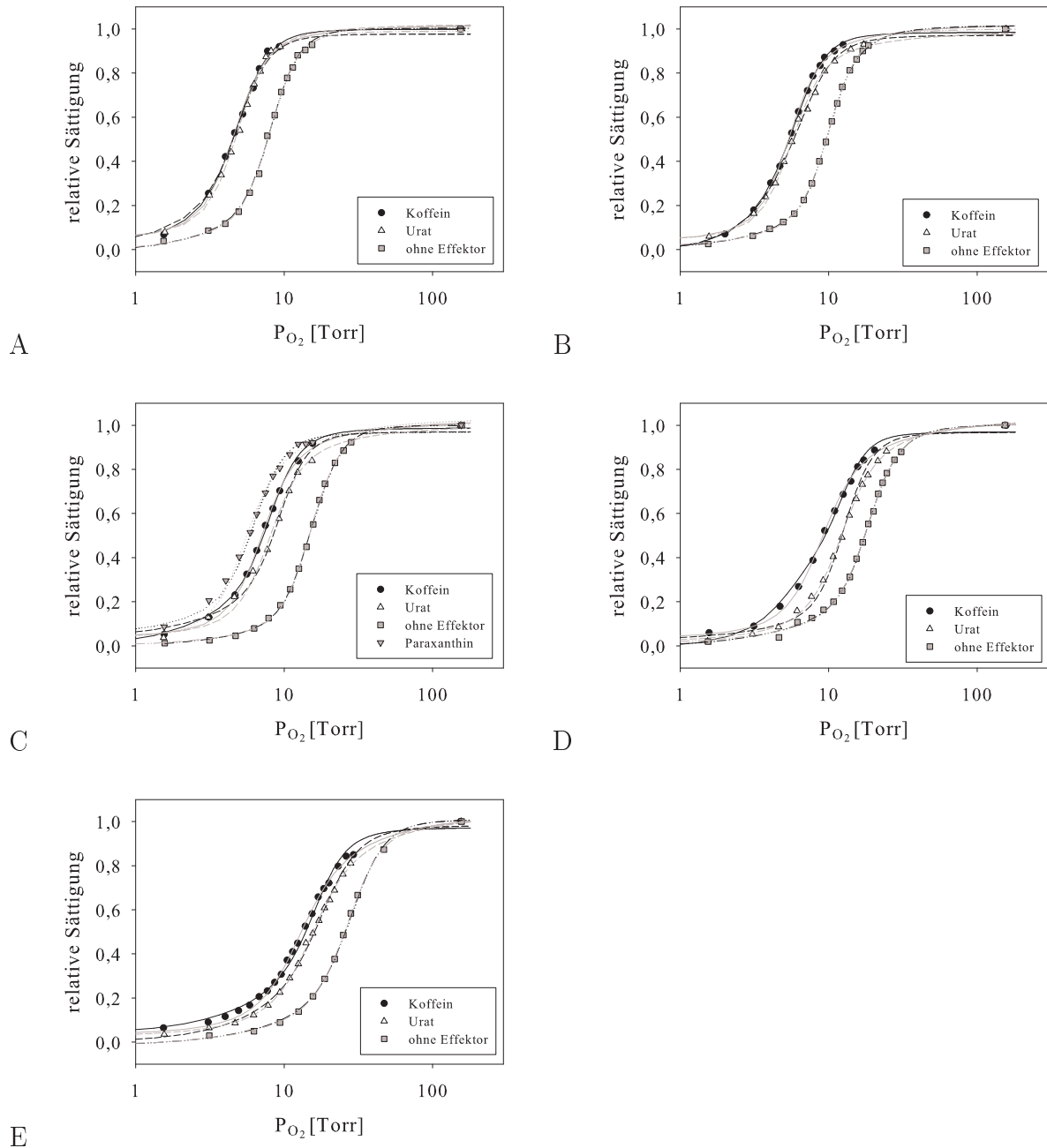


Abbildung 3.5: Sauerstoffbindungsdaten der Analysegruppe 1–5. Die Daten wurden alle einer nicht-linearen Regression mit dem Nested-MWC (schwarz) bzw. Three-State-MWC-Modell (grau) unterzogen. A: Analysegruppe 1; B: Analysegruppe 2; C: Analysegruppe 3 Der Übersichtlichkeit halber ist hier nur ein Auszug der Analysegruppe dargestellt. D: Analysegruppe 4; E: Analysegruppe 5

Der Einfluss des Liganden auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins kann nun über die Gleichgewichtskonstanten verdeutlicht werden (siehe Kapitel 2.7.1), wobei für jeden Zustand ($\pm$ Effektor bei einer bestimmten Temperatur) Gleichgewichtskonstanten bestimmt wurden.

In Abbildung 3.6A sind die logarithmierten Gleichgewichtskonstanten nach dem Nested-MWC-Modell der Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Urat oder Koffein dargestellt. Die berechneten Werte der Gleichgewichtskonstanten sind im Anhang in den Tabellen 6.2 und 6.3 zu finden. Die dargestellten Gleichgewichtskonstanten der Effektoren Urat und Koffein zeigten nur in wenigen Fällen eine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Gleichgewichtskonstanten wiesen eine große Streuung auf, so dass für den Effektor Koffein nur bei l_T^{Koffein} (10°C) mit $2,0 \times 10^{12} \pm 5,77 \times 10^{11}$ zu l_T^{Koffein} (30°C) mit $1,00 \times 10^9 \pm 3,00 \times 10^8$ eine signifikante Änderung nachgewiesen werden konnte. Auch die Gleichgewichtskonstanten der Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Urat l_T^{Urat} und l_R^{Urat} nahmen zwischen 10 und 30 signifikant ab. Dabei wurden sowohl l_T^{Urat} als auch Λ^{Urat} in den meisten Fällen höher bestimmt, als l_T^{Koffein} und Λ^{Koffein} . l_R^{Urat} (20°C) wich im Vergleich zu den anderen l_R^{eff} (20°C) nach oben hin ab. Für die Gleichgewichtskonstante Λ^{eff} konnte keine signifikante Änderung nachgewiesen werden. Sie konnte während der Regression nur mit einer großen Ungenauigkeit bestimmt werden. Die Gleichgewichtskonstanten der verschiedenen Liganden aus Analysegruppe 3 zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zueinander (Abbildung 3.6B). Die mit dem Three-State-MWC-Modell berechneten Gleichgewichtskonstanten (Abbildung 3.6 C und D) ließen keinerlei Tendenz in Abhängigkeit von der Temperatur erkennen. Es konnte kein signifikanter Unterschied für die Gleichgewichtskonstanten l_S^{Koffein} , l_T^{Koffein} , l_S^{Urat} und l_T^{Urat} festgestellt werden. Ebenso konnte keine signifikante Änderung der Gleichgewichtskonstanten der verschiedenen Effektoren zueinander gezeigt werden. Die in Abbildung 3.6 C und D dargestellten Gleichgewichtskonstanten zeigten zudem deutlich höhere Standardabweichungen als die über das Nested-MWC-Modell berechneten Gleichgewichtskonstanten.

Die hohen Standardabweichungen der Gleichgewichtskonstanten des Three-State-MWC-Modells und die größtenteils höheren χ^2 -Werte der Regressionen wurden als Hinweis für eine unzureichende Beschreibung der Sauerstoffbindungsdaten durch das Three-State-

Tabelle 3.6: χ^2 der Regression der Sauerstoffbindungskurven der Analysegruppen 1–5 für das Nested-MWC-Modell und das Three-State-Modell ($n=6$ und $n=12$)

Analysegruppe	χ^2 des Modells		
	Nested-MWC	Three-State $n=6$	Three-State $n=12$
1	7,90E-04	1,19E-03	2,25E-03
2	9,98E-04	1,22E-03	1,83E-03
3	9,33E-04	1,46E-03	3,48E-03
4	4,22E-04	8,58E-04	1,24E-03
5	2,14E-03	9,18E-04	1,46E-03

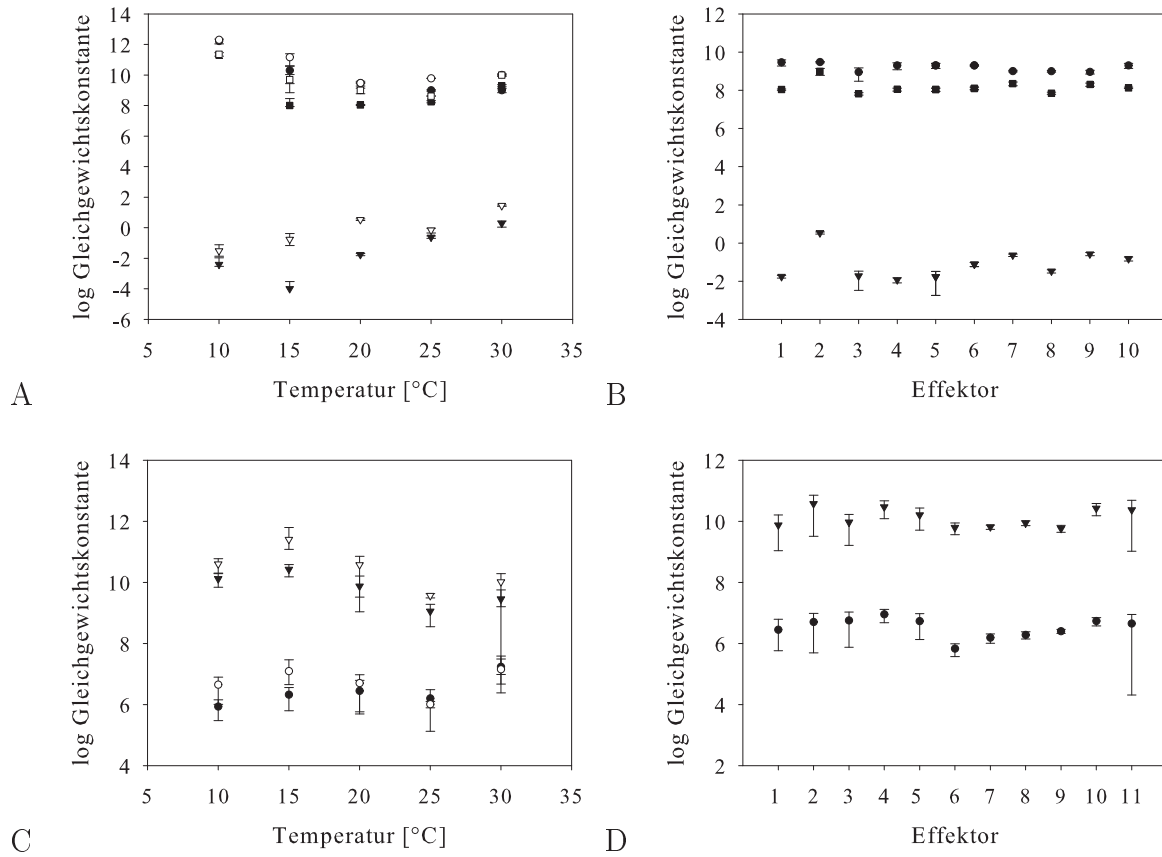


Abbildung 3.6: Logarithmische Auftragung der Gleichgewichtskonstanten des Nested- und des Three-State-MWC-Modells A: Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten l_R^{Koffein} ■, l_T^{Koffein} ●, Λ^{Koffein} ▼, l_R^{Urat} □, l_T^{Urat} ○ und Λ^{Urat} ▽ in Abhängigkeit von der Temperatur in °C. B: Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten l_R^{eff} , l_T^{eff} und Λ^{eff} . Die Beschriftung der x-Achse ist ein Synonym für den jeweiligen Effektor: Koffein 1, Urat 2, Paraxanthin 3, Theobromin 4, Theophyllin 5, 1-Methylxanthin 6, 3-Methylxanthin 7, 7-Methylxanthin 8, Isokoffein 9, 1,3,7-Trimethylharnsäure 10. C: Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten l_S^{Koffein} ●, l_T^{Koffein} ▼, l_S^{Urat} ○ und l_T^{Urat} ▽ in Abhängigkeit von der Temperatur in °C. D: Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten l_S^{eff} und l_T^{eff} . Die Beschriftung der x-Achse ist ein Synonym für den jeweiligen Effektor (siehe B). Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

MWC-Modell interpretiert. Die Annahme wird dadurch unterstützt, dass es nur möglich war die Regression mit oben genannter Qualität durchzuführen, wenn K_R während der Regression konstant gesetzt wurde. Hierdurch wurde ein weiterer Unsicherheitsfaktor in das Regressionssystem eingebracht. Die folgenden Betrachtung beziehen sich daher nur noch auf das Nested-MWC-Modell, das die Sauerstoffbindungsdaten mit der besten statistischen Übereinstimmung beschrieb. Die in Tabelle 3.1 und 3.2 dargestellten signifikanten Verschiebungen der Halbsättigungswerte, konnten durch die berechneten Gleichgewichtskonstanten nur in wenigen Fällen unterstützt werden. Es konnte zwar ein signifikanter Unterschied der Gleichgewichtskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 10 und 30°C gezeigt werden, jedoch wiesen die Halbsättigungswerte einen signifikanten Unterschied zwischen einer Temperatur zur nächst höheren auf. Zudem zeigten Urat und

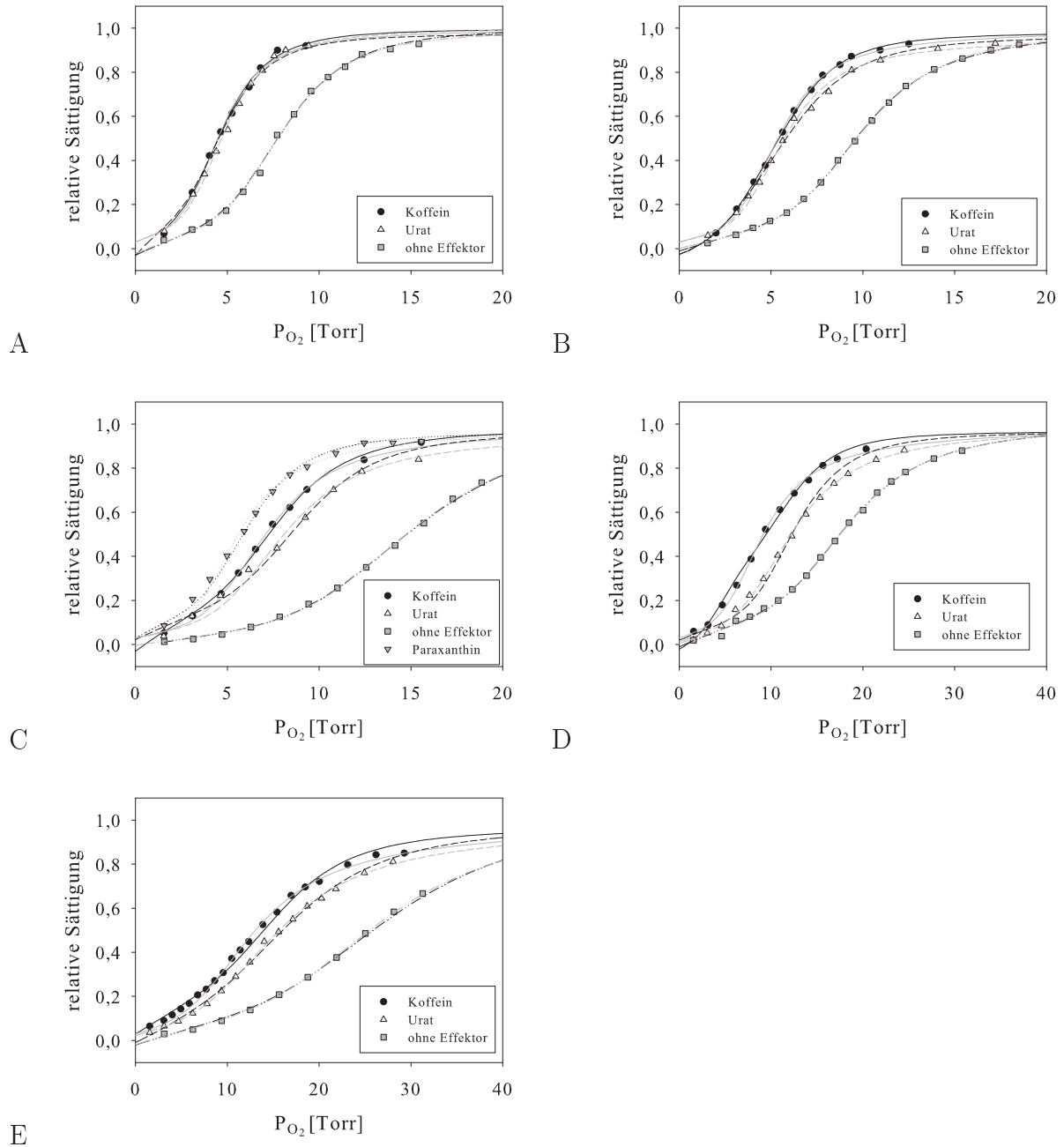


Abbildung 3.7: Sauerstoffbindungsdaten der verschiedenen Analysegruppen. Um eine bessere Auflösung der Beeinflussung der Sauerstoffbindung der unterschiedlichen Effektoren zu erlangen, wurde die Sättigung nicht bis 100% aufgetragen. Alle Sauerstoffbindungsdaten wurden einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit dem Nested-MWC-Modell unterzogen. A: Analysegruppe 1; B: Analysegruppe 2; C: Analysegruppe 3. Um die Übersichtlichkeit zu erhalten ist hier nur ein Auszug der Analysegruppe dargestellt. D: Analysegruppe 4; E: Analysegruppe 5.

Koffein einen signifikanten Unterschied ihre P_{50} -Werte für 20, 25 und 30°C auf. Es konnte für keine der berechneten Gleichgewichtskonstanten der anderen verwendeten Xanthinderivate ein signifikanter Unterschied berechnet werden, obwohl ein solcher durch die Charakterisierungsgrößen der Sauerstoffbindung P_{50} und n_H erwartet wurde. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten unterlag damit sehr großen Schwankungen. Abbildung 3.7 zeigt die Verschiebungen der Sauerstoffbindungskurven entlang der x -Achse und der damit einhergehenden Änderung des Halbsättigungswerts. Die Kurven wurden einer nicht-linearen Regression mit dem Nested-MWC-Modell unterzogen (siehe Abbildung 3.6). Bei jeder Temperatur führte die Bindung eines Effektors an das Hämocyanin zu einer Erhöhung der Sauerstoffaffinität. Auffällig war, dass Urat und Koffein bei 10°C den gleichen Einfluss auf die Sauerstoffbindung hatten. Bei 15°C erhöhte Koffein die Affinität zu Sauerstoff mit einem $P_{50}^{\text{Koffein}} = 5,48 \pm 0,38$ Torr stärker als Urat mit $P_{50}^{\text{Urat}} = 6,14 \pm 0,38$ Torr, ab 20°C konnte sogar ein signifikanter Unterschied des Einflusses der beiden Effektoren Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindung festgestellt werden. Der Einfluss der Effektoren auf die Sauerstoffbindung, konnte somit als temperaturabhängig bezeichnet werden. Die Einflussfaktoren F_R^{eff} , F_T^{eff} und F^{eff} wurden daher für jede Temperatur und jeden Liganden berechnet. Abbildung 3.7 C verdeutlicht zudem den signifikanten Unterschied zwischen der Affinitätssteigerung durch Urat und Paraxanthin. Paraxanthin erhöhte die Affinität der Sauerstoffbindung mit $P_{50}^{\text{Parax}} = 5,78 \pm 0,22$ Torr signifikant höher als Urat bei 20°C mit $P_{50}^{\text{Urat}} = 8,16 \pm 0,17$ Torr.

In den Tabellen 3.7 und 3.8 sind die Einflussfaktoren F_T^{eff} , F^{eff} und F_R^{eff} der Effektoren Urat und Koffein dargestellt. Sie stellen den Einfluss der Effektorbindung auf die Gleichgewichtskonstanten l_T , l_R und Λ dar. Die Einflussfaktoren ließen keine eindeutige Tendenz im Zusammenhang mit der Temperatur erkennen. Die Faktoren F_T^{eff} und F_R^{eff} waren stets kleiner eins. Konnte der Wert mit kleiner eins bestimmt werden, so verringerte sich die Gleichgewichtskonstante l_T^{eff} , l_R^{eff} und Λ^{eff} relativ zu l_T , l_R und Λ . Die Einflussfaktoren der restlichen Liganden bei 20°C sind in der Tabelle 6.5 des Anhangs zu finden. Dabei wurden Auch hier streuten die Werte teilweise sehr stark, so dass für $F^{3M}(20^\circ\text{C})$, $F^{7M}(20^\circ\text{C})$, $F^{\text{Isokof}}(20^\circ\text{C})$ grösser eins bestimmt.

Tabelle 3.7: Einflussfaktoren F_T^{Urat} , F^{Urat} und F_R^{Urat} der Sauerstoffbindung des Modulators Urat. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

T [°C]	F_T^{Urat}	F^{Urat}	F_R^{Urat}
10	$0,2135 \pm 0,038$	$0,0011 \pm 0,0002$	$0,0006 \pm 0,0001$
15	$0,0787 \pm 0,01$	$0,1181 \pm 0,02$	$0,122 \pm 0,03$
20	$0,0564 \pm 0,005$	$0,4852 \pm 0,10$	$0,1795 \pm 0,03$
25	$0,0761 \pm 0,01$	$9,62 \pm 1,04$	$0,9694 \pm 0,12$
30	$0,1172 \pm 0,01$	$1,7998 \pm 0,27$	$2,5087 \pm 1,07$

Tabelle 3.8: Einflussfaktoren F_T^{Koffein} , F^{Koffein} und F_R^{Koffein} der Sauerstoffbindung des Modulators Koffein. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um eine durch die Regressionsroutine berechnete Unsicherheit der Parameter.

T [°C]	F_T^{Koffein}	F^{Koffein}	F_R^{Koffein}
10	$0,1872 \pm 0,032$	$0,0303 \pm 0,025$	$0,0020 \pm 0,0007$
15	$0,0252 \pm 0,0006$	$0,3796 \pm 0,07$	$0,1111 \pm 0,01$
20	$0,0249 \pm 0,004$	$0,1658 \pm 0,0516$	$0,0991 \pm 0,07$
25	$0,0305 \pm 0,0089$	$0,2528 \pm 0,03$	$0,1953 \pm 0,03$
30	$0,1433 \pm 0,06$	$0,0060 \pm 0,0056$	$0,6003 \pm 0,05$

3.3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie ermöglicht es, die Wärmetönung der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül aufzuzeichnen. Dabei können durch ein Experiment die freie Enthalpie ΔG^0 , die Bindungskonstante k , Bindungsenthalpie ΔH^0 und die Entropie ΔS^0 bestimmt werden. Die gemessene Leistung (siehe Abbildung 2.1) wird anschließend zur Wärmeenergie integriert und auf die Menge des eingesetzten Liganden bezogen. Es folgt eine Analyse mit einem der in Kapitel 2.7.2 aufgeführten Bindungsmodellen.

In dieser Arbeit wurde neben der Bindung des natürlichen Modulators Urat auch die Bindung weiterer Xanthinderivate an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) thermodynamisch untersucht. Die Arbeiten von Menze (2000; 2001; 2005) zeigten, dass auch im Bereich geringer c-Werte (Wiseman et al., 1989) (siehe Kapitel 1) Bindungsisothermen für die Uratbindung an das Hämocyanin aufgenommen werden können. Turnbull und Daranas (2003) zeigten zudem, dass ΔG^0 und k ohne Einschränkungen bei niedrigen c-Werten bestimmt werden können. ΔH^0 dagegen wird bei geringen c-Werten stark von Ungenauigkeiten in der Rezeptorkonzentration beeinflusst. Für eine bekannte Anzahl an Bindungsstellen n wird diese bei der Auswertung konstant gesetzt, so dass auch ΔH^0 bestimmt werden kann. Die Ligandenkonzentration wurde bei jedem Effektor konstant bei 1 mM gehalten. Die Rezeptorkonzentration wurde auf 25 μM eingestellt. Um mögliche Ungenauigkeiten in der Makromolekülkonzentration zu kompensieren, wurden die Experimente 3–6 mal wiederholt.

3.3.1 Temperaturabhängige Effektorbindung unter normoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein

Um das thermodynamische Bindungsverhalten der Effektoren an das Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur zu verstehen, wurden ITC-Experimente bei verschiedenen Temperaturen mit dem natürlichen Modulator Urat und dem Liganden Koffein durchgeführt. Zusätzlich wurde die temperaturabhängige Bindung der Liganden Theobromin, Paraxanthin und Theophyllin bestimmt (siehe Kapitel 3.3.4). Eine Betrachtung der thermodynamischen Parameter in Abhängigkeit von der Temperatur ermöglicht die Berech-

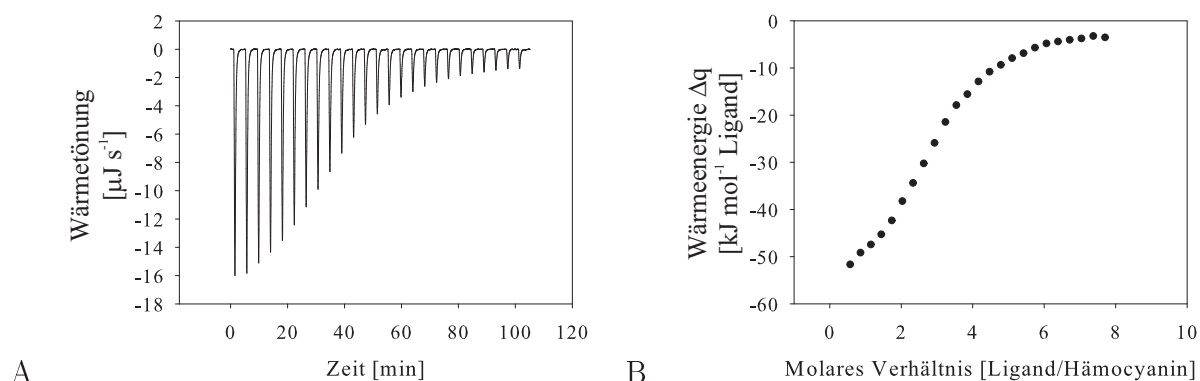


Abbildung 3.8: Wärmefreisetzung während eines ITC-Experiments A: Wärmesignale $[\mu\text{J s}^{-1}]$ bei der Titration von 1 mM Koffein in 25 μM Hämocyanin bei 10° C. Der Versuch wurde in HEPES-Puffer (100 mM HEPES; 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , pH 8 bei 20° C eingestellt) durchgeführt. Es erfolgten 25 Injektionen von 10 μl Ligand. B: Wärmeenergie Δq $[\text{kJ mol}^{-1}]$ des in A beschriebenen Experiments.

nung der Wärmekapazität ΔC_p^0 (siehe Formel 1.2). Durch die Bindung der verschiedenen Liganden wurde eine Betrachtung der thermodynamischen Parameter im Bezug auf die Struktur der verschiedenen Liganden ermöglicht.

Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch die Wärmesignale $[\mu\text{J s}^{-1}]$ (3.8A) sowie deren integrierte Wärmeenergie Δq $[\text{kJ mol}^{-1}]$, für ein ITC-Experiment mit 1 mM Koffein. Es wurden je 10 μl des 1 mM Koffeins in 25 μM Hämocyanin titriert. Da die gemessene Wärmeenergie des ersten Signals fehlerbehaftet ist (Mizoue und Tellinghuisen, 2004), wurde das erste Signal nach der Integration verworfen und nicht in die Auswertung mit einbezogen. In den weiteren Abbildungen der Bindungsisotherme sind daher nur 24 Datenpunkte dargestellt. Die Wärmeenergie Δq $[\text{kJ mol}^{-1}]$ wurde gegen das molare Verhältnis der totalen Koffein- und Hämocyaninkonzentration aufgetragen. Die dargestellte Bindungsisotherme zeigt eine annähernd sigmoide Form. Die gemessenen Bindungsisotherme der ITC-Experimente wurden mit den in Kapitel 2.7.2 beschriebenen Bindungsmodellen ausgewertet (siehe Abbildung 3.9). Die Wärmesignale der Koffeinbindung unter normoxischen Bedingungen konnte mit dem Non-interacting-site, dem Multisite-Interactive und dem Two-Sets-of-Sites-Modell ausgewertet werden. In Abbildung 3.9 ist eine solche repräsentative Koffein-Bindungsisotherme zusammen mit einer Uratbindungskurve dargestellt. Die Bindungsisotherme der Uratbindung zeigt eine hyperbole Form, was auf die geringere Affinität des Hämocyanins für den natürlich Modulator Urat zurückgeführt werden kann. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erwies sich wie auch schon von Menze (2001) gezeigt als schwierig, da die Parameter untereinander korrelierten. Da durch die Arbeiten von Zeis (1994) und Menze (2001) eine einfache Stöchiometrie bekannt war, wurde die Anzahl der Bindungsplätze mit $n = 2$ angenommen. Eine Auswertung mit den beiden anderen Bindungsmodellen war für die Uratbindung nicht möglich, da auch hier die Parameter untereinander korrelierten. Das Multisite-Interacting-Modell und das

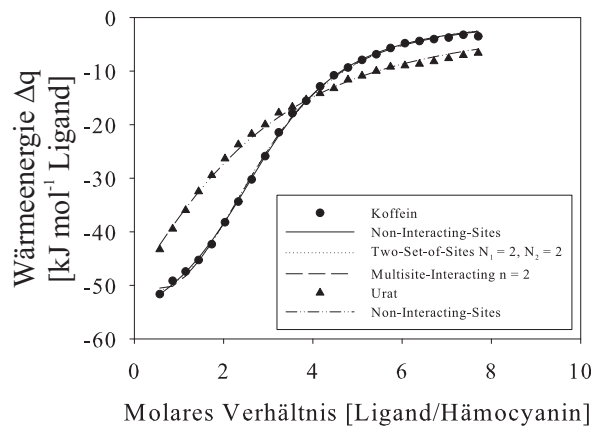


Abbildung 3.9: Bindung von Koffein und Urat an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) bei 10°C. Die Bindungsisothermen wurden durch 25 Injektionen von je 10 μl einer 1 mM Ligandenlösung in eine 25 μM Hämocyaninlösung erhalten.

Two-Sets-of-Sites-Modell weisen eine erhöhte Anzahl an Parametern auf und lassen somit eine eingehendere Charakterisierung der Bindung zu. Die erhöhte Anzahl der Parameter führt jedoch auch dazu, dass die Parameter vermehrt miteinander korrelieren. Ist die Affinität der Bindung so gering wie in diesem exemplarischen Fall für Urat, so kann die Bindungsisotherme nicht ohne weitere Kenntnisse mit diesen Bindungsmodellen ausgewertet werden.

Die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme mit dem Multisite-Interacting-Modell und dem Two-Sets-of-Sites-Modell basieren auf den Annahmen von Menze (2001) und Menze et al. (2005). Für die Bindung des Koffeins an das Hämocyanin bei 10°C konnte unter Verwendung des Non-Interacting-Site-Modells für Koffein $n = 2,97 \pm 0,07$ bestimmt werden. Wurde der Faktor auf $n = 2$ reduziert und konstant gesetzt, so führte dies zu einer deutlich schlechteren Regression. Da jedoch eine Auswertung der Uratbindungskurve mit $n = 3$ ebenfalls die Qualität der Anpassung reduzierte, der χ^2 -Wert erhöht sich von $7,969 \times 10^4$ auf $2,687 \times 10^5$, und die hypoxischen Daten unter dieser Annahme nur mit sehr geringer Regressionsübereinstimmung ausgewertet werden konnten, musste ein komplexeres Bindungsverhalten in Betracht gezogen werden, da davon ausgegangen wurde, dass Urat und Koffein die gleiche Anzahl an Bindungsplätzen besitzen (Nies et al., 1992; Menze et al., 2005).

Das Multisite-Interactive-Modell berücksichtigt homeotrope Allosterie, da es das Makromolekül als multivalenter Rezeptor mit mehreren Bindungsstellen beschreibt, deren Affinität von der Bindung der Liganden an die Bindungsstelle beeinflusst wird. Bei der hier exemplarisch aufgeführten Bindungsisotherme des Koffeins bei 10°C wurden die mikroskopischen Bindungskonstanten $k_1^{\text{Koffein}} = 20,08 \pm 3,24 \text{ mM}^{-1}$ und $k_2^{\text{Koffein}} = 95,53 \pm 11,81 \text{ mM}^{-1}$ berechnet. Die Bindungskonstanten wiesen auf positive Kooperativität hin. Verwendet man das Two-Sets-of-Sites-Modell, so fungiert das Makromolekül als multiva-

Tabelle 3.9: χ^2 der Regression der Bindungsisothermen der Koffeinbindung bei 10, 20 und 30°C. Die Anzahl der Messungen betrug $n = 3-5$.

Modell	χ^2		
	10°C	20°C	30°C
Non-Interacting-Sites	4,41E+04	2,33E+05	1,14E+05
Two-Sets-of-Sites $N_1 = 2, N_2 = 2$	4,01E+04	2,33E+05	1,16E+05
Multisite-Interacting $n = 2$	4,85E+04	2,33E+05	1,16E+05

lenter Rezeptor, dessen Bindungsstellen sich durch zwar unterschiedliche aber invariante Bindungsaffinitäten für den Liganden auszeichnen. Auf den Daten von Menze et al. (2005) basierend, die für das Dodekamer vier Effektorbindungsstellen angenommen hatten (zwei nicht-allosterische und zwei allosterische Bindungsstellen), wurden die Bindungsisothermen mit $N_1 = N_2 = 2$ konstant gesetzt. Hierbei konnte eine Bindungskonstante mit einer höheren Affinität $k_1^{\text{Koffein}} = 703,00 \pm 14,18 \text{ mM}^{-1}$ und mit einer niedrigeren Affinität $k_1^{\text{Koffein}} = 47,70 \pm 5,21 \text{ mM}^{-1}$ berechnet werden. Die zu den berechneten Bindungskonstanten berechneten Enthalpien und Entropien sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

In der Tabelle 3.9 sind die χ^2 -Werte der mit den verschiedenen Bindungsmodellen durchgeführten Regressionen der Koffeinbindungsisothermen aufgeführt. Die Regressionen der Bindungsdaten bei 20 und 30°C ließen keine Tendenz in der Regressionsqualität erkennen. Bei 10°C zeigte sich ein erniedrigter χ^2 -Wert für die Regression mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell ($N_1 = 2, N_2 = 2$). Menze et al. (2001; 2005) betrachteten die Bindung des Urats an das Hämocyanin des Europäischen Hummers unter Einfluss des pH-Wertes als auch des Puffersystems. Es wurde zunächst ein unterschiedliches Bindungsverhalten für Urat und Koffein angenommen (Menze, 2001). In einer spätere Analyse wurden zwei allosterische und zwei nicht-allosterischen Bindungsstellen als weitere Möglichkeit betrachtet (Menze et al., 2005). Da aufgrund des χ^2 -Werts keine eindeutigen Schlüsse auf das Bindungsmodell für Koffein gezogen werden kann, werden in dieser Arbeit zunächst die drei aufgeführten Modelle in die Auswertung mit einbezogen. Die Bindungsisothermen des Urats konnten nur mit dem Non-Interacting-Sites-Modell ausgewertet werden. Für eine Auswertung mit einem komplexeren Modell mussten weitere Informationen aus der Bindung des Koffeins an das Hämocyanin des Europäischen Hummers gewonnen werden.

Non-Interacting-Site-Modell

Zunächst wurde die Bindung des Urats und des Koffeins unter Verwendung des Non-Interacting-Site-Modells ausgewertet, um die Bindungsenthalpie ΔH^0 besser in Bezug zur Temperatur setzen zu können.

Die Bindungskonstante k der Uratbindung nahm mit Erhöhung der Temperatur kontinuierlich ab. In Abbildung 3.10 A ist die lineare Abnahme der Bindungskonstanten verdeutlicht. Der Korrelationskoeffizient der Linearisierung R^2 betrug 0,948. So verrin-

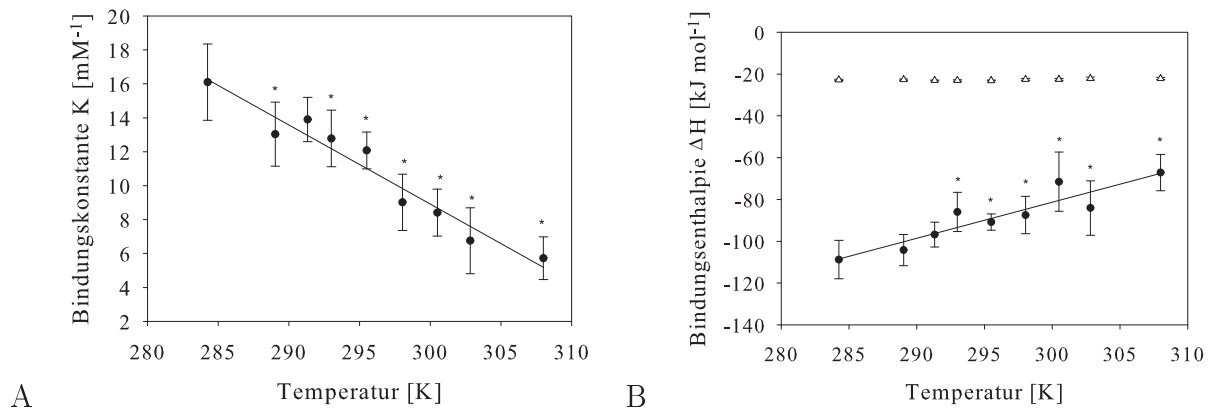


Abbildung 3.10: A: Bindungskonstante k^{Urat} [mM^{-1}] für die Bindung von Urat (●) und B: Bindungsenthalpie ΔH^0_{Urat} [kJ mol^{-1}] (●) und freie Energie ΔG^0_{Urat} [kJ mol^{-1}] ($\triangle$) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Daten wurden durch die Auswertung der Uratbindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell gewonnen ($n = 2$). Die genannten Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$), *: Signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 10°C bzw. 283,16 K

Tabelle 3.10: Thermodynamische Parameter k^{Urat} , ΔH^0_{Urat} , $T\Delta S^0_{\text{Urat}}$ und ΔG^0_{Urat} der Bindung von Urat an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 35°C. Die angegebene Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] ist ein Mittelwert der Versuchstemperatur, da es aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich war die gewünschte Temperatur ($< 20^{\circ}\text{C}$) während des Versuchs zu erlangen. Die Anzahl der Bindungsplätze wurde mit $n = 2$ konstant gesetzt. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

T [$^{\circ}\text{C}$]	k^{Urat} [mM^{-1}]	ΔH^0_{Urat} [kJ mol^{-1}]	$T\Delta S^0_{\text{Urat}}$ [kJ mol^{-1}]	ΔG^0_{Urat} [kJ mol^{-1}]
11,3	$16,10 \pm 2,246$	$-108,75 \pm 9,14$	$-85,61 \pm 9,06$	$-22,77 \pm 0,35$
16,0	$13,03 \pm 1,882$	$-104,20 \pm 7,41$	$-81,60 \pm 8,80$	$-22,67 \pm 0,33$
18,3	$13,90 \pm 1,308$	$-96,79 \pm 5,95$	$-73,72 \pm 6,06$	$-23,03 \pm 0,22$
20,0	$12,78 \pm 1,669$	$-85,96 \pm 9,41$	$-63,12 \pm 9,61$	$-23,02 \pm 0,31$
22,5	$12,08 \pm 1,078$	$-90,80 \pm 3,86$	$-67,66 \pm 4,03$	$-23,09 \pm 0,22$
25,0	$9,02 \pm 1,659$	$-87,47 \pm 8,93$	$-64,54 \pm 9,83$	$-22,54 \pm 0,42$
27,5	$8,41 \pm 1,385$	$-71,53 \pm 14,17$	$-48,93 \pm 14,49$	$-22,55 \pm 0,42$
30,0	$6,76 \pm 1,942$	$-84,04 \pm 13,02$	$-61,85 \pm 13,70$	$-22,14 \pm 0,76$
35,0	$5,73 \pm 1,256$	$-67,11 \pm 8,68$	$-44,93 \pm 9,25$	$-22,11 \pm 0,55$

gergte sich k^{Urat} von $16,10 \pm 2,246 \text{ mM}^{-1}$ bei 10°C signifikant auf $5,73 \pm 1,256 \text{ mM}^{-1}$ bei 35°C. Alle Bindungskonstanten bis auf $k^{\text{Urat}}(18^{\circ}\text{C})$ zeigten eine signifikante Abnahme im Vergleich zum Referenzwert bei 10°C. Die Bindungsenthalpie ΔH^0_{Urat} nahm in Abhängigkeit von der Temperatur zu. Abbildung 3.10B zeigt, dass die Werte zwar anstiegen, jedoch mit großen Fehlern behaftet waren. Es wurden verschiedene Regressionverfahren getestet und es konnte mit keinem verfügbaren Verfahren ein besserer Korrelationskoeffizient als $R^2 = 0,854$ erreicht werden. Der χ^2 -Wert der verschiedenen Analysen war für eine lineare Regression am geringsten, so dass auch in diesem Fall ein linearer Zusammenhang zwischen dem Parameter ΔH^0 und der Temperatur besteht. Trotz der großen

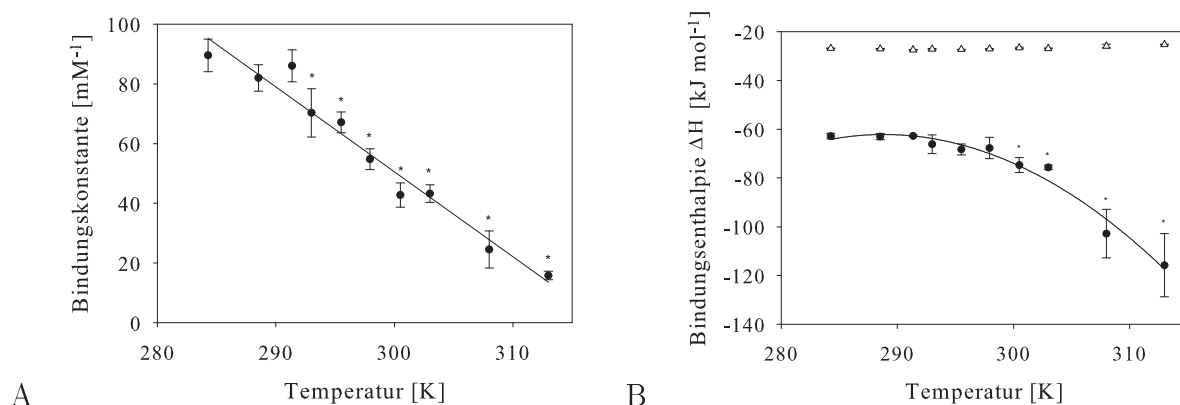


Abbildung 3.11: A: Bindungskonstante k_{Koffein} [mM^{-1}] für die Bindung von Koffein (■) und B: Bindungsenthalpie $\Delta H_{\text{Koffein}}^0$ [kJ mol^{-1}] (■) und freie Energie $\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ [kJ mol^{-1}] (△) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Daten wurden durch die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme mit dem Non-Interacting-Site-Modell gewonnen. Die genannten Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$), *: Signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 10 °C bzw. 283,16 K

Standardabweichung zeigten einige Enthalpien eine signifikante Zunahme zu dem Referenzwert bei 10°C. So nahm die Bindungsenthalpie $\Delta H_{\text{Urat}}^0(35^\circ\text{C})$ mit $-67,11 \pm 8,68 \text{ kJ mol}^{-1}$ im Vergleich zu $\Delta H_{\text{Urat}}^0(10^\circ\text{C})$ mit $-108,75 \pm 9,14 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant zu. Die Bindungsenthalpien bei 27,5 und 30°C zeigten mit $\Delta H_{\text{Urat}}^0(27,5^\circ\text{C}) = -71,53 \pm 14,17 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{\text{Urat}}^0(30^\circ\text{C}) = -84,04 \pm 13,02 \text{ kJ mol}^{-1}$ die größten Schwankungen. Die dazugehörigen Werte der Entropie zeigten ebenfalls hohe Standardabweichungen. $T\Delta S_{\text{Urat}}^0$ nahm ebenfalls mit steigender Temperatur signifikant zu, jedoch waren auch hier Schwankungen in der gleichen Größenordnung wie im Falle der Bindungsenthalpie des Urats zu verzeichnen. Die freie Enthalpie ΔG^0 der Bindung von Urat blieb in Abhängigkeit von der Temperatur weitgehend konstant (siehe Abbildung 3.10 B). Über die erste Ableitung der Linearisierung der Auftragung von ΔH^0 in Abhängigkeit von der Temperatur konnte die Wärmekapazität ΔC_p berechnet werden. Die Wärmekapazität für die Bindung von Urat an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* betrug $\Delta C_p^{\text{Urat}} = 1,724 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Koffein band an das Hämocyanin des Europäischen Hummers ebenfalls bei steigender Temperatur mit abnehmender Affinität (siehe Tabelle 3.11 und Abbildung 3.11). So verringerte sich die Bindungskonstante für Koffein von $k_{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 89,56 \pm 5,43 \text{ mM}^{-1}$ signifikant über $k_{\text{Koffein}}(20^\circ\text{C}) = 70,31 \pm 8,08 \text{ mM}^{-1}$ auf $k_{\text{Koffein}}(40^\circ\text{C}) = 15,80 \pm 1,43 \text{ mM}^{-1}$. Auch hier lies sich, wie im Falle des Urats, eine lineare Abnahme erkennen. Der Korrelationskoeffizient der Linearisierung betrug $R^2 = 0,962$. Im Gegensatz dazu, zeigte die Bindungsenthalpie ΔH^0 ein genau entgegengesetztes Verhalten zu der Enthalpie der Uratbindung. Die Bindungsenthalpien nahmen mit zunehmender Temperatur ab. Zwischen 10 und 20 °C blieb die Bindungsenthalpie mit $\Delta H_{\text{Koffein}}^0(10^\circ\text{C}) = -62,87 \pm 1,15 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{\text{Koffein}}^0(20^\circ\text{C}) = -66,16 \pm 3,81 \text{ kJ mol}^{-1}$ weitgehend konstant. Erst ab $\Delta H_{\text{Koffein}}^0(22,5^\circ\text{C}) = -68,28 \pm 2,22 \text{ kJ mol}^{-1}$ zeichnete sich eine Tendenz zur Abnahme ab,

Tabelle 3.11: Thermodynamische Parameter $k_{\text{Koffein}}^{\text{Koffein}}$, $\Delta H_{\text{Koffein}}^0$, $T\Delta S_{\text{Koffein}}^0$ und $\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ der Bindung von Koffein an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 40°C. Die angegebene Temperatur [°C] ist ein Mittelwert der Versuchstemperatur, da es aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich war die gewünschte Temperatur (< 20°C) während des Versuchs zu erlangen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

T [°C]	$k_{\text{Koffein}}^{\text{Koffein}}$ [mM ⁻¹]	$\Delta H_{\text{Koffein}}^0$ [kJ mol ⁻¹]	$T\Delta S_{\text{Koffein}}^0$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ [kJ mol ⁻¹]
11,3	89,56 ± 5,43	-62,87 ± 1,15	-35,85 ± 1,63	-26,83 ± 0,14
15,5	82,01 ± 4,44	-63,04 ± 1,24	-36,48 ± 1,66	-27,09 ± 0,13
18,4	86,03 ± 5,33	-62,77 ± 0,27	-36,80 ± 1,68	-27,44 ± 0,15
20,0	70,31 ± 8,08	-66,16 ± 3,81	-38,95 ± 3,38	-27,18 ± 0,25
22,5	67,12 ± 3,45	-68,28 ± 2,22	-40,92 ± 2,27	-27,30 ± 0,12
25,0	54,80 ± 3,46	-67,73 ± 4,34	-40,81 ± 5,96	-27,03 ± 0,16
27,5	42,77 ± 4,07	-74,70 ± 3,07	-47,97 ± 2,88	-26,64 ± 0,23
30,0	43,22 ± 2,96	-75,67 ± 0,92	-48,47 ± 0,02	-26,89 ± 0,18
35,0	24,54 ± 6,18	-102,83 ± 9,96	-76,94 ± 12,64	-25,92 ± 0,73
40,0	15,80 ± 1,43	-115,79 ± 12,96	-90,60 ± 8,79	-25,27 ± 0,06

bis sich die Bindungsenthalpie mit $\Delta H_{\text{Koffein}}^0(40^\circ\text{C}) = -115,79 \pm 12,96 \text{ kJ mol}^{-1}$ signifikant verringerte.

Die Enthalpien der Bindung von Koffein an Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur konnten rein mathematisch über eine polynomiale Interpolation beschrieben werden. Der Korrelationskoeffizient betrug $R^2 = 0,972$. Aus der dort angewendeten Formel $f = y_0 + ax + bx^2$ konnte die erste Ableitung bestimmt und daraus die Wärmekapazität berechnet werden. Abbildung 3.12 zeigt die Änderung der Wärmekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur. ΔC_p nahm von $\Delta C_p^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 1,10 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ bis zu $\Delta C_p^{\text{Koffein}}(40^\circ\text{C}) = -4,5710 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ linear ab. Die freie Energie der Bindung ΔG^0 blieb im gemessenen Temperaturspektrum mit Werten wie $\Delta G_{\text{Koffein}}^0(10^\circ\text{C}) = -26,83 \pm 0,14 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta G_{\text{Koffein}}^0(17,5^\circ\text{C}) = -27,44 \pm 0,15 \text{ kJ mol}^{-1}$ weitgehend konstant (siehe Abbildung 3.11). Die Entropie $T\Delta S^0$ zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Bindungsenthalpie und nahm mit zunehmender Temperatur ab. Während für die Uratbindung die Anzahl der Bindungsplätze mit $n = 2$ konstant gesetzt wurde (siehe oben), konnte die Koffeinbindung mit dem Non-Interacting-Site-Modell mit einem variablen n zur Bestimmung der Anzahl der Bindungsplätze in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 35°C ausgewertet werden. Die Anzahl der Bindungsplätze konnte für 10°C mit $n = 2,97 \pm 0,07$ bestimmt werden und nahm mit steigender Temperatur bis auf $n = 2,15 \pm 0,12$ bei 35°C ab. Betrachtet man $n\Delta H^0$, so ergibt sich in Zusammenhang mit der Temperatur die gleiche Abhängigkeit. Leider schien n jedoch mit einer starken Streuung belastet zu sein, so dass jene Betrachtung keine weiteren Erkenntnisse lieferte. Für die Auswertung der Bindungsdaten, die bei 40°C gemessen wurden, wurde die Anzahl der Bindungsplätze mit $n = 2$ konstant gesetzt. Die c-Werte der Messungen lagen zwischen

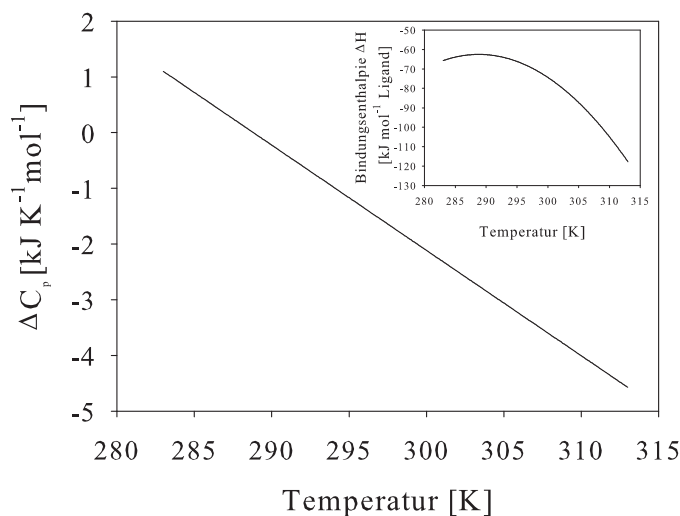


Abbildung 3.12: Simulation der Wärmekapazität $\Delta C_p^{\text{Koffein}}$ in Abhängigkeit von der Temperatur [K] zwischen 283,16 und 313,16 K für die Bindung des Koffeins. Die polynomiale Interpolation der Bindungsenthalpien ΔH^0 in Abhängigkeit von der Temperatur ist in dem Einschub oben rechts dargestellt.

ca. 66 (10°C) und 8 (40°C).

Multisite-Interacting-Modell

Die Bindung des Koffeins kann, wie oben beschrieben, auch über komplexere Bindungsmodelle charakterisiert werden. Das Multisite-Interacting-Modell bezieht homeotrope Kooperativität in die Analyse mit ein. Die Bindungsisothermen, die bei Temperaturen über 30°C gemessen wurden, konnten mit dem Multisite-Interacting-Modell nicht ausgewertet werden, da die Bindungsstärke zu gering war und die Parameter korrelierten. Auch bei der Anwendung dieses Modells verringerte sich die Affinität der Bindung mit zunehmender Temperatur. Koffein zeigte, unter der Berücksichtigung von homeotroper Allosterie bei 10°C mit den Bindungskonstanten $k_1^{\text{Koffein}} = 20,08 \pm 3,24 \text{ mM}^{-1}$ und $k_2^{\text{Koffein}} = 95,53 \pm 11,81 \text{ mM}^{-1}$ eine deutliche Kooperativität auf. Die Bindungskonstanten blieben zwischen 10 und 17,5°C weitgehend konstant und zeigten erst ab 20°C eine signifikante Änderung mit $k_2^{\text{Koffein}}(20^\circ\text{C}) = 72,18 \pm 9,21 \text{ mM}^{-1}$. Mit zunehmender Temperatur verringerte sich k_2 signifikant auf einen Wert von bis zu $k_2^{\text{Koffein}}(30^\circ\text{C}) = 42,61 \pm 6,02 \text{ mM}^{-1}$. Die Kooperativität nahm somit mit zunehmender Temperatur ab (siehe Abbildung 3.13).

Die Bindungsenthalpie lies sich ebenfalls mit dem Multisite-Interacting-Modell für jeden Bindungsschritt bestimmen. Dabei fiel auf, dass ΔH_1^0 und ΔH_2^0 stark schwankten und keine eindeutige Tendenz erkennen ließen. Gleiches konnte für $T\Delta S^0$ festgestellt werden. Die Wärmekapazität wurde basierend auf der Datenanalyse mit dem Multisite-Interacting-Modell nicht berechnet, da die großen Standardabweichungen der Bindungsenthalpien darauf hindeuteten, dass die Bindungsenthalpien durch die Regression nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Die freie Energie ΔG_1^0 und ΔG_2^0 hingegen, die über

Tabelle 3.12: Thermodynamische Parameter k_1^{Koffein} , k_2^{Koffein} , ΔH_1^0 und ΔH_2^0 der Bindung von Koffein an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30 °C. Die angegebene Temperatur [°C] ist ein Mittelwert der Versuchstemperatur, da es aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich war die gewünschte Temperatur (< 20°C) während des Versuchs zu erlangen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

T [°C]	k_1^{Koffein} [mM ⁻¹]	k_2^{Koffein} [mM ⁻¹]	H_1^0 [kJ mol ⁻¹]	H_2^0 [kJ mol ⁻¹]
11,3	20,08 ± 3,24	95,53 ± 11,81	-90,75 ± 4,93	-96,16 ± 11,50
15,5	17,20 ± 6,26	95,97 ± 5,40	-109,08 ± 29,40	-69,53 ± 23,47
18,4	15,08 ± 4,31	105,47 ± 9,99	-106,93 ± 14,39	-76,91 ± 7,48
20,0	29,07 ± 10,77	72,18 ± 9,21	-88,55 ± 12,19	-91,52 ± 13,33
22,5	35,41 ± 7,64	68,52 ± 7,33	-84,04 ± 7,67	-87,09 ± 15,07
24,9	23,96 ± 10,60	57,26 ± 4,71	-100,69 ± 25,98	-81,63 ± 15,44
27,5	51,04 ± 16,07	50,70 ± 17,34	-72,32 ± 9,96	-100,48 ± 17,29
30,0	24,30 ± 6,99	42,61 ± 6,02	-106,92 ± 17,73	-80,77 ± 11,45

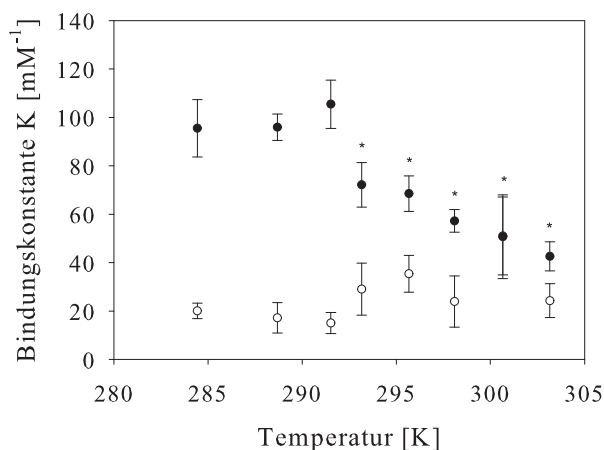


Abbildung 3.13: Bindungskonstanten k_1^{Koffein} (○) und k_2^{Koffein} (●) [mM⁻¹] für die Bindung von Koffein in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Daten wurden durch die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme mit dem Multisite-Interacting-Modell gewonnen. Die genannten Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$), *: Signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 10 °C bzw. 283,16 K

die jeweiligen Bindungskonstanten berechnet wurden, blieben in Abhängigkeit der Temperatur weitgehend konstant. Sie reichen von $\Delta G_1^0(17,5^\circ\text{C}) = -23,25 \pm 0,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis zu $\Delta G_1^0(27,5^\circ\text{C}) = -27,24 \pm 0,72 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die freien Energien für den zweiten Bindungsschritt lagen in der Tendenz mit $\Delta G_2^0(17,5^\circ\text{C}) = -28,02 \pm 0,22 \text{ kJ mol}^{-1}$ geringfügig höher.

Two-Sets-of-Sites-Modell

Das Two-Sets-of-Sites-Modell gibt die Möglichkeit, die Daten unter der Berücksichtigung von zwei verschiedenen Bindungsplatztypen auszuwerten. Die zwei Bindungsplatztypen können mit einer unterschiedlichen Anzahl an Bindungsstellen pro Typ angenommen wer-

Tabelle 3.13: Thermodynamische Parameter k_1^{Koffein} , k_2^{Koffein} , ΔH_1^0 und ΔH_2^0 der Bindung von Koffein an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30°C. Die angegebene Temperatur [°C] ist ein Mittelwert der Versuchstemperatur, da es aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich war die gewünschte Temperatur (< 20°C) während des Versuchs zu erlangen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

T [°C]	k_1^{Koffein} [mM ⁻¹]	k_2^{Koffein} [mM ⁻¹]	ΔH_1^0 [kJ mol ⁻¹]	ΔH_2^0 [kJ mol ⁻¹]
11,3	703,00 ± 14,18	47,70 ± 5,21	-55,31 ± 0,12	-37,43 ± 3,87
15,5	468,67 ± 140,15	45,37 ± 1,04	-57,28 ± 2,83	-32,28 ± 2,36
18,4	567,00 ± 94,32	48,73 ± 3,15	-56,16 ± 0,39	-36,13 ± 4,34
20,0	310,80 ± 21,04	32,64 ± 3,75	-59,15 ± 1,99	-30,09 ± 8,99
22,5	242,20 ± 62,77	27,16 ± 3,24	-63,36 ± 2,68	-21,51 ± 5,57
24,9	177,25 ± 22,32	26,55 ± 3,55	-62,99 ± 5,46	-28,84 ± 4,61
27,5	114,87 ± 33,60	11,20 ± 0,35	-64,13 ± 8,78	-25,79 ± 12,46
30,0	88,68 ± 8,33	17,90 ± 4,46	-75,35 ± 3,64	-18,13 ± 2,38

den. Für die Auswertung der Koffeinbindungsisothermen wurden für jeden Typ die Anzahl der Bindungsplätze mit $N_1 = N_2 = 2$ konstant gesetzt.

Nach einer Auswertung mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell ergab sich, dass beide unabhängigen Bindungskonstanten mit steigender Temperatur abnahmen (siehe Tabelle 3.13 und Abbildung 3.14). k_1 fiel von $k_1^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 703,00 \pm 14,18 \text{ mM}^{-1}$ signifikant auf $k_1^{\text{Koffein}}(35^\circ\text{C}) = 66,10 \pm 17,22 \text{ mM}^{-1}$. Die Abnahme konnte erneut mit einem quadratischen Polynom beschrieben werden. Die Affinität der zweiten Bindungsstelle war mit $k_2^{\text{Koffein}}(17,5^\circ\text{C}) = 48,73 \pm 3,15 \text{ mM}^{-1}$ als höchsten Wert, deutlich geringer, als die Affinität des Koffeins zur ersten Bindungsstelle. Die Bindungskonstanten $k_2^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C})$ bis $k_2^{\text{Koffein}}(17,5^\circ\text{C})$ blieben weitgehend konstant, bis sich ab $k_2^{\text{Koffein}}(20^\circ\text{C}) = 32,64 \pm 3,75 \text{ mM}^{-1}$ die Affinität signifikant verringerte. Die Abnahme setzte sich ab 20°C nahezu linear fort. $k_2^{\text{Koffein}}(27,5^\circ\text{C})$ wich mit $11,20 \pm 0,35 \text{ mM}^{-1}$ deutlich von der linear abnehmenden Tendenz ab. Die Bindungsenthalpie des ersten Bindungsplatzes nahm mit steigender Temperatur ab. ΔH_1^0 fiel von $-55,31 \pm 0,12 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 10°C auf $-75,35 \pm 3,64 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 30°C. Obwohl die Werte sehr stark streuten, konnte für $\Delta H_1^0(30^\circ\text{C})$ ein signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 10°C nachgewiesen werden. Über eine polynomiale Interpolation konnte die Tendenz der Abnahme der Bindungsenthalpie ΔH_1^0 mit zunehmender Temperatur beschrieben werden. Die Bindungsenthalpie ΔH_2^0 der zweiten Bindungsstelle nahm mit steigender Temperatur geringfügig zu. Da die Werte jedoch eine hohe Streuung aufwiesen, konnte nur für $\Delta H_2^0(22,5^\circ\text{C}) = -21,51 \pm 5,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ eine signifikante Zunahme zum Referenzwert $\Delta H_2^0(10^\circ\text{C}) = -37,43 \pm 3,87 \text{ kJ mol}^{-1}$ gemessen werden. Die Wärmekapazität der ersten Bindungsstelle konnte mit $\Delta C_p^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 0,48$ bis zu $\Delta C_p^{\text{Koffein}}(30^\circ\text{C}) = -2,10$ bestimmt werden. Sie nahm mit steigender Temperatur linear ab. ΔC_p konnte für die zweite Bindungsstelle mit 0,87 berechnet werden und war somit unabhängig von der Temperatur. Die Tendenzen der Bindungsenthalpien zeich-

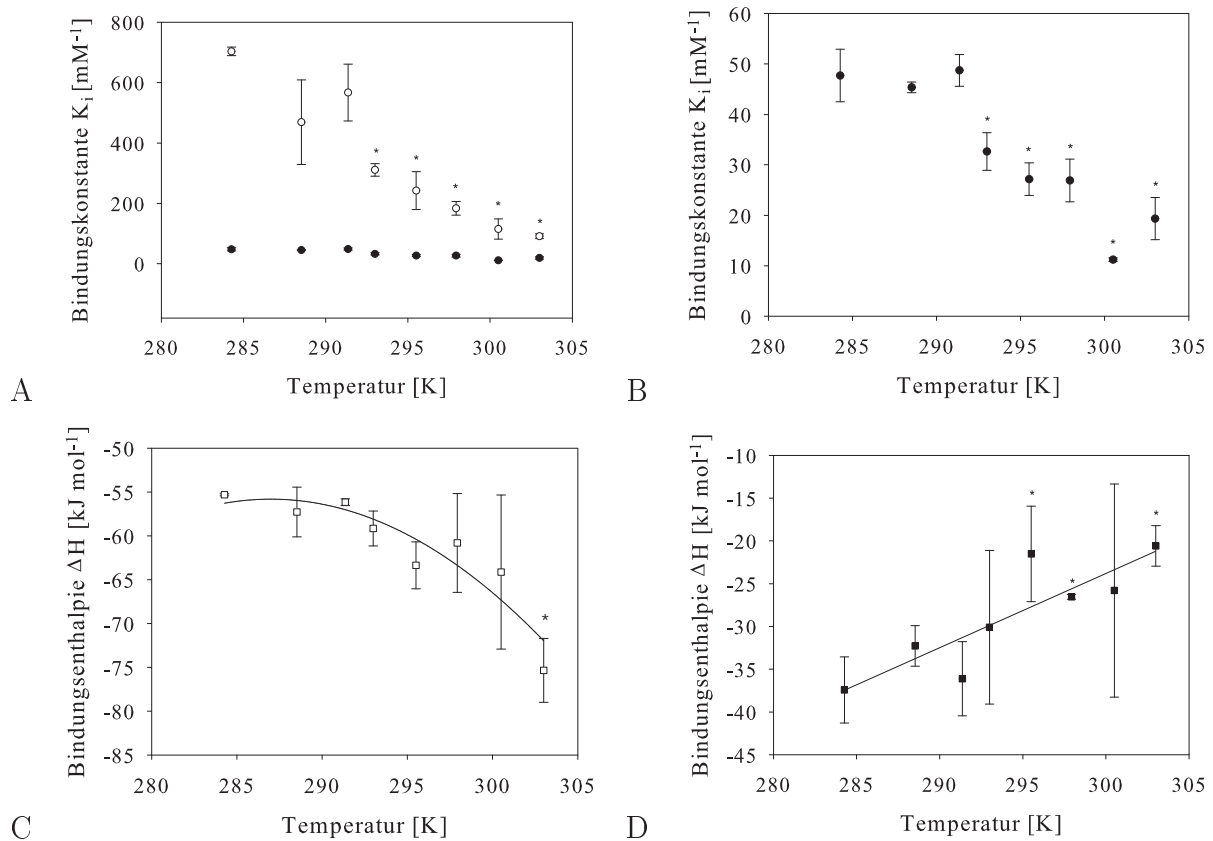


Abbildung 3.14: A: Bindungskonstante k_1^{Koffein} ($\circ$) und k_2^{Koffein} ($\bullet$) [mM^{-1}] und B: Bindungskonstante k_2^{Koffein} ($\bullet$) [mM^{-1}] sowie C: die Bindungsenthalpie $\Delta H_1^{\text{Koffein}}$ [kJ mol^{-1}] ($\square$) und D: die Bindungsenthalpie $\Delta H_2^{\text{Koffein}}$ [kJ mol^{-1}] ($\blacksquare$) für die Bindung von Koffein in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Daten wurden durch die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell gewonnen. Die genannten Fehler sind die Standardabweichungen ($X \pm \text{SD}$), *: Signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 10°C bzw. 283,16 K — : Interpolation der Messwerte.

neten sich auch in den Entropien der einzelnen Bindungsplätze ab. Die Entropie nahm mit zunehmender Temperatur von $T\Delta S_1^0(\text{Koffein})(10^\circ\text{C}) = -23,63 \pm 0,16 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis zu $T\Delta S_1^0(\text{Koffein})(30^\circ\text{C}) = -46,58 \pm 3,44 \text{ kJ mol}^{-1}$ ab. Die Entropie der zweiten Bindungsstelle nahm mit $T\Delta S_2^0(\text{Koffein})(10^\circ\text{C}) = -12,09 \pm 4,09 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis zu $T\Delta S_2^0(\text{Koffein})(30^\circ\text{C}) = 6,69 \pm 2,27 \text{ kJ mol}^{-1}$ tendenziell zu, die Werte streuten jedoch stark. Die freie Energie der Bindung ΔG^0 blieb in Abhängigkeit von der Temperatur konstant. Die erste Bindungsstelle wies freie Energien in einem Spektrum von $\Delta G_1^0(\text{Koffein})(30^\circ\text{C}) = -28,76 \pm 0,24 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis zu $\Delta G_1^0(\text{Koffein})(10^\circ\text{C}) = -31,68 \pm 0,05$ auf. Die freien Energien der zweiten Bindungsstelle waren mit $\Delta G_2^0(\text{Koffein})(17,5^\circ\text{C}) = -23,29 \pm 0,08$ geringfügig niedriger.

Wie in Kapitel 3.3.1 bereits angesprochen wurde, wichen die einzelnen Bindungsmodelle statistisch nur geringfügig von einander ab (siehe Tabelle 3.9). Eine genauere Betrachtung der thermodynamischen Parameter, die aus der Regression mit den in Kapitel 2.7.2 aufgeführten Modellen hervorgegangen sind, zeigte, dass die Streuung der Werte für die komplexen Modelle größer war als für das einfache Non-Interacting-Site-

Modell. Vergleich man die thermodynamischen Parameter des Multisite-Interacting und des Two-Sets-of-Sites-Modells miteinander, so fiel auf, dass die Bindungsenthalpien des Multisite-Interacting-Modells eine große Streuung und Variabilität aufwiesen. Es konnte kein einheitliches Verhalten der Bindungsenthalpien für dieses Modell in Zusammenhang mit den Bindungskonstanten nachgewiesen werden. Die Bindungsenthalpien, die mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell für die einzelnen Bindungsschritte berechnet wurden, zeigten jedoch in allen Fällen eine Tendenz, die es ermöglichte die Wärmekapazität der Bindung des Koffeins an die zwei Bindungsstellen zu bestimmen. Basierend auf den Annahmen von Menze et al. (2005), konnte ein Zusammenhang mit Messungen unter hypoxischen Bedingungen hergestellt werden.

3.3.2 Temperaturabhängige Effektorbindung unter hypoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein

Um den Einfluss des Sauerstoffs auf die Bindung des natürlichen Modulators Urat als auch auf den Liganden Koffein zu untersuchen, wurden Experimente unter hypoxischen Bedingungen (siehe Kapitel 2.6) durchgeführt. Da Urat die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöht, ist dessen Bindungsverhalten besonders unter Sauerstoffausschluss von Interesse.

Abbildung 3.15 stellt die Bindungsisotherme der hypoxischen Urat- und Koffeinbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) dar. Die freigesetzte Wärmeenergie hat im Vergleich zur Bindung unter normoxischen Bedingungen deutlich abgenommen. Die Bindungen konnten lediglich durch eine hyperbole Bindungskurve charakterisiert werden, bei 30°C konnte für Urat keine auswertbare Bindungsisotherme erhalten werden. Die Bindungskurven konnten weiterhin mit dem Non-Interacting-Site-Modell ausgewertet werden ($n = 2$), wobei die Regressionskurve für die Bindung von Urat eine geringere Übereinstimmung aufzeigte. Eine Auswertung der Koffeinbindungs-

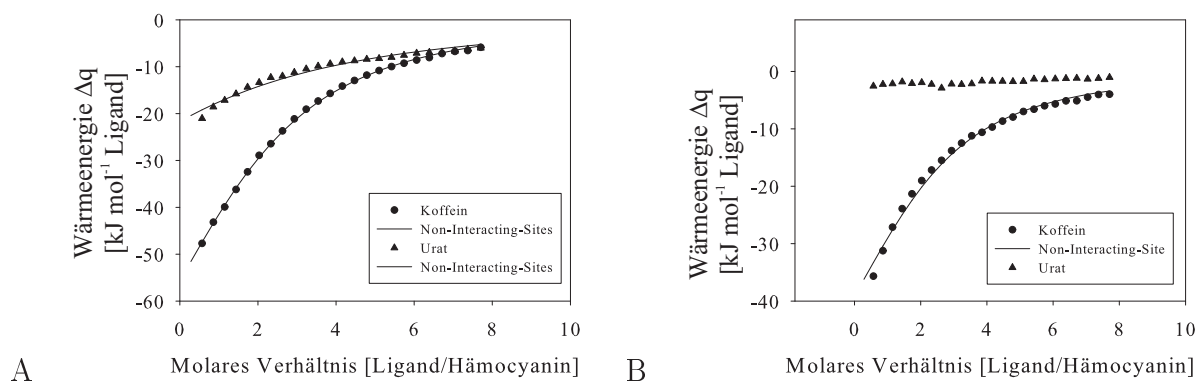


Abbildung 3.15: A: Bindungsisotherme der Bindung von Urat und Koffein bei 10°C und B: Bindungsisotherme der Bindung von Urat und Koffein bei 30°C an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) unter hypoxischen Bedingungen.

Tabelle 3.14: Thermodynamische Parameter k^{eff} [mM^{-1}], ΔH_{eff}^0 [kJ mol^{-1}], $T\Delta S_{\text{eff}}^0$ [kJ mol^{-1}] und ΔG_{eff}^0 [kJ mol^{-1}] der Bindung von Koffein bzw. Urat an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30°C. Die angegebene Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] ist ein Mittelwert der Versuchstemperatur, da es aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich war die gewünschte Temperatur ($< 20^{\circ}\text{C}$) während des Versuchs zu erlangen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

T [$^{\circ}\text{C}$]	k^{eff} [mM^{-1}]	ΔH_{eff}^0 [kJ mol^{-1}]	$T\Delta S_{\text{eff}}^0$ [kJ mol^{-1}]	ΔG_{eff}^0 [kJ mol^{-1}]
Koffein				
11,32	$23,40 \pm 2,23$	$-96,54 \pm 9,85$	$-74,27 \pm 0,76$	$-25,32 \pm 0,29$
15,70	$21,60 \pm 2,02$	$-86,27 \pm 1,17$	$-62,04 \pm 1,17$	$-25,14 \pm 0,24$
25,00	$16,27 \pm 2,63$	$-76,96 \pm 20,95$	$-52,93 \pm 21,25$	$-24,41 \pm 0,39$
30,00	$17,15 \pm 7,60$	$-70,34 \pm 8,50$	$-45,74 \pm 9,78$	$-24,56 \pm 1,41$
Urat				
11,1	$4,95 \pm 1,07$	$-91,01 \pm 7,78$	$-70,64 \pm 8,05$	$-21,39 \pm 0,53$
15,99	$4,30 \pm 0,79$	$-77,65 \pm 21,99$	$-57,30 \pm 22,25$	$-21,05 \pm 0,47$
25	$12,23 \pm 3,44$	$-17,35 \pm 2,53$	$1439,25 \pm 761,11$	$-23,65 \pm 0,67$

isotherme mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell war hier nicht möglich, da die Werte stark miteinander korrelierten.

In Tabelle 3.14 sind die thermodynamischen Parameter der Koffein- und Uratbindung unter hypoxischen Bedingungen dargestellt. Die Affinität der beiden Liganden ist mit $k^{\text{Urat}}(10^{\circ}\text{C}) = 4,95 \pm 1,07 \text{ mM}^{-1}$ und $k^{\text{Koffein}}(10^{\circ}\text{C}) = 23,40 \pm 2,23 \text{ mM}^{-1}$ deutlich geringer als unter normoxischen Bedingungen. Bei 30°C konnte keine Bindung von Urat an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* gemessen werden. Die Bindungsisotherme bei 25°C konnte ebenfalls kaum noch ausgewertet werden. Während die Bindungsaffinität des Urats bei 10 und 15°C gering war und über die Temperaturänderung konstant blieb, wurde für 25°C eine unerwartet hohe Bindungskonstante berechnet. Die Affinität der Koffeinbindung nahm bis 25°C linear ab und blieb dann mit $k^{\text{Koffein}}(30^{\circ}\text{C}) = 17,15 \pm 7,60 \text{ mM}^{-1}$ konstant. Die Bindungsenthalpie der Koffeinbindung nahm mit steigender Temperatur linear zu, während die freie Energie $\Delta G_{\text{Koffein}}^0$ über das gemessene Temperaturspektrum konstant blieb. Mit Hilfe einer linearen Interpolation wurde $\Delta C_p^{\text{Koffein}} = 1,32 \text{ [kJ mol}^{-1}\text{k}^{-1}]$ bestimmt. Für Urat war die Änderung der Wärmekapazität zwischen 10 und 15°C $\Delta C_p^{\text{Urat}} = \text{Null}$. Zwischen 15 und 25°C betrug die Änderung der Wärmekapazität der Uratbindung $\Delta C_p^{\text{Urat}} = 6,69 \text{ [kJ mol}^{-1}\text{k}^{-1}]$.

3.3.3 Modulatorbindungsmodell unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen am Beispiel von Urat und Koffein

Da ein komplexeres Bindungsmodell für die Bindung von Urat und Koffein an das Hämocyanin des Europäischen Hummers nahe liegend war, wurde, um auch eine Auswertung der Daten unter hypoxischen Bedingungen zu ermöglichen, auf einen von Menze et al. (2005) vorgeschlagenen Bindungsmechanismus zurückgegriffen. Menze et al. (2005) nah-

men vier Bindungsstellen, zwei allosterische und zwei nicht-allosterische, pro Dodekamer an. Die Auswertungen der Bindungsdaten unter normoxischen Bedingungen zeigten, dass eine Interpolation der Daten unter Annahme von 2 Bindungsplatztypen mit je zwei Bindungsplätzen (Two-Sets-of-Sites-Modell) zu einer guten Approximation führte. Wenn es sich bei einem der beiden Bindungsplatztypen um einen nicht-allosterischen Bindungsplatz handeln würde, so würde die Bindungsaffinität unabhängig von der allosterischen Konformation des Moleküls sein. Demnach müsste die Bindungsaffinität des nicht-allosterischen Bindungsplatzes unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen gleich sein. Da die Affinität der Bindung der Effektoren unter hypoxischen Bedingungen geringer war als unter normoxischen (siehe Tabelle 3.14), wurde k_2 des Two-Sets-of-Sites-Modells (siehe Tabelle 3.13) als nicht-allosterische Bindungskonstante angenommen und für die Regression der hypoxischen Bindungsisotherme konstant gesetzt. Für die Koffeinbindungsisotherme bei 10°C konnte somit eine nicht-allosterische Bindungskonstante $k_{nallo}^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 47,70 \pm 5,21 \text{ mM}^{-1}$ bestimmt werden. Mit k_1 des Two-Sets-of-Sites-Modells der normoxischen Daten ergab sich somit die Bindungskonstante einer unter diesen Bedingungen dominierenden Konformation, wenn man das bei den Sauerstoffbindungsdaten angewendete Nested-MWC-Modell mit einbezog. Die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme, die unter hypoxischen Bedingungen bestimmt wurden, ergab für eine neben der nicht-allosterischen Bindungsstelle hauptsächlich unter hypoxischen Bedingungen existierende Konformation eine mit $k_{hyp}^{\text{Koffein}} = 2,08 \pm 0,96 \text{ mM}^{-1}$ geringe Bindungskonstante. Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.2.1 berechneten Einflussfaktoren ließen sich durch die Anwendung der Formeln 2.18 bis 2.20 die Bindungskonstanten der weiteren Konformationen berechnen (siehe Tabelle 3.15). Hierbei fiel jedoch erneut auf, dass die Einflussfaktoren stark streuten und besonders bei der Bestimmung von F^{eff} lokale Minima im Regressionsverlauf auftraten. Zudem mussten, um zu berücksichtigen, welche der im Nested-MWC-Modell aufgeführten Konformationen die vorherrschende unter den jeweiligen Bedingungen war, mit Formel 2.21 bis 2.24 die Verteilung der Konformationen berechnet werden. Da die stark mit Fehlern behafteten Gleichgewichtskonstanten bei dieser Berechnung der Konformationsverteilung einen großen Einfluss ausüben und ftT , frT , frR und ftR sehr parameterempfindlich sind, konnten diese Werte nur teilweise als gesichert angenommen werden. In Tabelle 3.15 wurden daher die Bindungskonstanten zunächst nur für eine mit hohen Anteilen vorhandene Konformation angegeben.

Leider konnte nur die Bindungsisotherme der Koffeinbindung bei 10°C auf diese Art ausgewertet werden, da bei allen höheren Temperaturen die Werte K und ΔH^0 miteinander korrelierten. Für die Bindungsdaten der höheren Temperaturen wurde die entsprechende Bindungskonstante K über die Einflussfaktoren bestimmt und anschließend in der Auswertung der Koffeinbindungsisotherme konstant gesetzt, um die Bindungsenthalpie zu bestimmen. Für die Uratbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers wurde angenommen, dass die Bindungsaffinität unter hypoxischen Bedingungen sehr gering war

Tabelle 3.15: Bindungskonstanten $k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM^{-1}], $k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ [mM^{-1}], $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ und $k_{\text{nallohyp}}^{\text{eff}}$, sowie die dazugehörigen Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol^{-1}], ΔH_{hyp}^0 [kJ mol^{-1}], $\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol^{-1}] und $\Delta H_{\text{nallohyp}}^0$ [kJ mol^{-1}] der Bindung von Koffein und Urat an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30°C. $k_{O_2}^{\text{eff}}$ ist die Bindungskonstante der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation, $k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ gibt die Bindungsaffinität der unter hypoxischen Bedingungen dominierenden Konformation wieder. $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ und $k_{\text{nallohyp}}^{\text{eff}}$ bezeichnen die Bindungsaffinitäten zu den sowohl unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen identischen nicht-allosterischen Bindungsplätzen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$)

Parameter	Temperatur [°C]			
	10	15	25	30
Koffein				
$k_{O_2}^{\text{Koffein}}$ [mM^{-1}]	703,00 ± 14,18	468,67 ± 140,15	177,25 ± 22,32	88,68 ± 8,33
$k_{\text{hyp}}^{\text{Koffein}}$ [mM^{-1}]	2,08 ± 0,96	9,92	0,65	—
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{Koffein}}$ [mM^{-1}]	47,70 ± 5,21	45,37 ± 1,04	26,55 ± 3,55	17,9 ± 3,55
$k_{\text{nallohyp}}^{\text{Koffein}}$ [mM^{-1}]	47,70 ± 5,21	45,37 ± 1,04	26,55 ± 3,55	17,9 ± 3,55
$\Delta H_{O_2}^0$ Koffein [kJ mol^{-1}]	−55,31 ± 0,12	−57,28 ± 2,83	−62,99 ± 5,46	−75,35 ± 3,64
ΔH_{hyp}^0 Koffein [kJ mol^{-1}]	−69,57 ± 4,46	−11,04 ± 4,52	−101,47 ± 28,22	—
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ Koffein [kJ mol^{-1}]	−37,43 ± 3,87	−32,28 ± 2,36	−28,84 ± 4,61	−18,13 ± 2,38
$\Delta H_{\text{nallohyp}}^0$ Koffein [kJ mol^{-1}]	−74,63 ± 18,53	−68,41 ± 4,88	−58,57 ± 5,33	—
Urat				
$k_{O_2}^{\text{Urat}}$ [mM^{-1}]	35,37 ± 13,33	50,37 ± 9,82	—	—
$k_{\text{hyp}}^{\text{Urat}}$ [mM^{-1}]	0,55 ± 0,026	0,07 ± 0,02	—	—
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{Urat}}$ [mM^{-1}]	4,90 ± 1,10	4,30 ± 0,80	—	—
$k_{\text{nallohyp}}^{\text{Urat}}$ [mM^{-1}]	4,90 ± 1,10	4,30 ± 0,80	—	—
$\Delta H_{O_2}^0$ Urat [kJ mol^{-1}]	−65,78 ± 4,98	−52,23 ± 5,57	—	—
ΔH_{hyp}^0 Urat [kJ mol^{-1}]	−14,02 ± 6,20	−9,42 ± 2,81	—	—
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ Urat [kJ mol^{-1}]	−56,72 ± 18,06	−66,40 ± 12,17	—	—
$\Delta H_{\text{nallohyp}}^0$ Urat [kJ mol^{-1}]	−91,01 ± 7,78	−77,65 ± 21,99	—	—

und der Hauptteil der gemessenen Wärmefreisetzung nur noch durch die Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen erfolgt. Daher wurde die mit dem Non-Interacting-Site-Modell unter hypoxischen Bedingungen bestimmte Bindungskonstante für die Auswertung der normoxischen Uratbindungsisotherme konstant gesetzt. Die gleiche Vorgehensweise wurde bei der Auswertung der hypoxischen Uratbindungsisotherme angewendet. Man erhielt somit die Bindungskonstante für die jeweilig dominierende Konformation.

Bei der Auswertung der Koffeinsauerstoffbindungsdaten von 10°C wurde berechnet, dass die Konformation tR bei einem Sauerstoffpartialdruck von 1 Torr zu ca. 97% vorliegt. Koffein konnte demnach fast ausschließlich an diese Konformation binden. Es wurde angenommen, dass die durch die Auswertung der Koffeinbindungsisotherme berechnete Bindungskonstante $k_{hyp}^{Koffein}(10^\circ\text{C}) = 2,08 \pm 0,96 \text{ mM}^{-1}$ die Affinität zu dieser Konformation darstellt. Während bei Messungen unter normoxischen Bedingungen bei 10 und 15°C die Konformation rT mit ca. 99% dominierte, lag bei 25 und 30°C die Konformation rR mit ca. 65% vor.

Im Falle der nicht-allosterischen Bindungskonstanten der Uratbindung konnte im Temperaturbereich zwischen 10 und 15°C mit $k_{nallo}^{Urat}(10^\circ\text{C}) = 4,90 \pm 1,10 \text{ mM}^{-1}$ und mit $k_{nallo}^{Urat}(15^\circ\text{C}) = 4,30 \pm 0,80 \text{ mM}^{-1}$ keine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt werden.

Es wurde deutlich, dass unter hypoxischen Bedingungen der Effektor mit einer höheren Affinität an die nicht-allosterische Bindungsstelle band, da die Affinität der allosterischen Bindungsstelle, die unter hypoxischen Bedingungen bei der Konformation tT oder tR lagen, mit $k_{hyp}^{Koffein}(10^\circ\text{C}) = 2,08 \pm 0,96 \text{ mM}^{-1}$ geringer war als $k_{nallo}^{Koffein}(10^\circ\text{C}) = 47,70 \pm 5,21 \text{ mM}^{-1}$. Der Unterschied wurde mit steigender Temperatur geringer. So konnte für $k_{hyp}^{Koffein}(25^\circ\text{C})$ nur noch eine Affinität von $0,65 \text{ mM}^{-1}$ bestimmt werden, $k_{nallo}^{Koffein}(25^\circ\text{C})$ lag mit $26,55 \pm 3,55 \text{ mM}^{-1}$ höher. $k_{hyp}^{Koffein}(30^\circ\text{C})$ konnte nicht bestimmt werden (siehe Kapitel 4.2). Der Zusammenhang der Bindungsenthalpien für $k_{O_2}^{Koffein}$ wurde bereits in Kapitel 3.3.1 (Two-Sets-of-Sites-Modell: k_2) beschrieben. Die Schwankungen der Bindungsenthalpien der hypoxischen Bindungsstellen gingen mit den Schwankungen der Bindungsaffinitäten unter hypoxischen Bedingungen einher. Die Bindungsenthalpien der nicht-allosterischen Bindungsstellen nahmen zwischen 10 und 25°C nur geringfügig ab. Die Bindungsenthalpie $\Delta H_{nalloO_2}^{Koffein}(30^\circ\text{C})$ war jedoch mit $-18,13 \pm 2,38 \text{ kJ mol}^{-1}$ im Vergleich zum Referenzwert bei 10°C signifikant geringer. Unter hypoxischen Bedingungen blieben die Bindungsenthalpien der Koffeinbindung zwischen 10 und 25°C weitgehend konstant. Die Wärmekapazität der nicht-allosterischen Bindung unter normoxischen Bedingungen wurde bereits in Kapitel 3.3.1 berechnet. Unter hypoxischen Bedingungen konnte $\Delta C_p^{Koffein} = -6,92 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ zwischen 25 und 30°C bestimmt werden.

Das in diesem Kapitel aufgeführte Modell wird in den nun folgenden Kapitel weiterhin zur Auswertung herangezogen. Da nicht für alle Effektoren, die zur vollständigen Auswertung benötigten hypoxischen Messungen durchgeführt wurden, konnte dort nur

Tabelle 3.16: Bindungskonstanten $k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM^{-1}] und $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ sowie die dazugehörigen Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol $^{-1}$] und $\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol $^{-1}$] der Bindung von Theophyllin, Paraxanthin und Theobromin an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30 °C. $k_{O_2}^{\text{eff}}$ ist die Bindungskonstante der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation. $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ bezeichnet die Bindungsaffinitäten zu den normoxischen nicht-allosterischen Bindungsplätzen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$).

	Temperatur [°C]			
	10	15	25	30
Theophyllin				
$k_{O_2}^{\text{Theop}}$ [mM^{-1}]	$186,5 \pm 88,4$	$115,0 \pm 17,1$	$48,3 \pm 3,03$	$40,8 \pm 9,67$
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{Theop}}$ [mM^{-1}]	$24,0 \pm 1,77$	$17,8 \pm 2,4$	$16,5 \pm 1,02$	$14,7 \pm 5,75$
$\Delta H_{O_2}^0$ Theop [kJ mol $^{-1}$]	$-56,38 \pm 6,49$	$-58,62 \pm 1,84$	$-72,88 \pm 9,48$	$-84,53 \pm 19,94$
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ Theop [kJ mol $^{-1}$]	$-63,97 \pm 4,33$	$-84,38 \pm 8,64$	$-53,34 \pm 28,91$	$-43,56 \pm 40,29$
Paraxanthin				
$k_{O_2}^{\text{Parax}}$ [mM^{-1}]	$266,3 \pm 126,5$	$163 \pm 45,0$	$90,5 \pm 22,7$	$56,6 \pm 24,8$
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{Parax}}$ [mM^{-1}]	$32,5 \pm 4,68$	$25,2 \pm 2,25$	$16,3 \pm 3,45$	$13,0 \pm 7,57$
$\Delta H_{O_2}^0$ Parax [kJ mol $^{-1}$]	$-53,82 \pm 1,02$	$-56,01 \pm 0,65$	$-59,22 \pm 2,01$	$-70,49 \pm 16,03$
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ Parax [kJ mol $^{-1}$]	$-62,40 \pm 13,10$	$-67,27 \pm 3,73$	$-69,84 \pm 21,08$	$-70,41 \pm 14,13$
Theobromin				
$k_{O_2}^{\text{Theob}}$ [mM^{-1}]	$436,3 \pm 159,1$	$313,0 \pm 87,4$	$144,0 \pm 28,2$	$74,0 \pm 10,7$
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{Theob}}$ [mM^{-1}]	$40,6 \pm 1,91$	$32,3 \pm 1,88$	$21,1 \pm 3,46$	$12,5 \pm 3,75$
$\Delta H_{O_2}^0$ Theob [kJ mol $^{-1}$]	$-60,26 \pm 0,81$	$-62,72 \pm 2,92$	$-65,93 \pm 4,62$	$-67,87 \pm 7,40$
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ Theob [kJ mol $^{-1}$]	$-61,53 \pm 9,17$	$-46,59 \pm ,41$	$-46,68 \pm 2,23$	$-55,95 \pm 3,69$

Auswertung unter normoxischen Bedingungen berücksichtigt werden.

3.3.4 Temperaturabhängige Bindung der Dimethylxanthine

Die verwendeten Dimethylxanthine zählen zu den Strukturanaloga des Koffeins (siehe Abbildung 1.1). Sie konkurrieren mit dem Koffein und dem Urat um die Bindungsstellen am Hämocyanin des Europäischen Hummers (Zeis, 1994), dabei scheint die intakte Purinstruktur eine Voraussetzung für die Bindung zu sein. Die normoxischen Bindungsisotherme zeigten einen sigmoiden Kurvenverlauf, die unter hypoxischen Bedingungen aufgenommenen Bindungsisotherme waren hyperbol (siehe Abbildung 6.2). Sie konnten mit dem oben aufgeführten Modell ausgewertet werden.

Die in Tabelle 3.16 dargestellten Daten wurden durch die Interpolation der Bindungsisothermen der Theophyllin-, Paraxanthin- und Theobrominbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell berechnet. Davon ausge-

hend, dass an dem Hämocyanin (*Homarus vulgaris*) je zwei allosterische und zwei nicht-allosterische Bindungsplätze existieren, wurden $k_{O_2}^{\text{eff}}$ und $k_{\text{nallo}O_2}^{\text{eff}}$ bestimmt. Die Bindungskonstante des allosterischen Bindungsplatzes unter hypoxischen Bedingungen $k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ wurde nur für 20°C bestimmt (siehe Tabelle 3.17). Die Liganden wiesen für die allosterischen Bindungsplätze über das gemessene Temperaturspektrum durchgehend eine höhere Affinität auf. Der Ligand Theobromin band dabei mit $k_{O_2}^{\text{Theob}}(10^\circ\text{C}) = 436 \pm 159,1 \text{ mM}^{-1}$ am stärksten an das Hämocyanin. Theophyllin konnte in der Klasse der Dimethylxanthine mit der geringsten Affinität für das Hämocyanin charakterisiert werden (siehe auch Abbildung 3.16). Die allosterische Bindungskonstante $k_{O_2}^{\text{eff}}$ zeichnete sich weiterhin durch eine große Streuung aus, so dass nur bei 25°C signifikante Unterschiede zwischen den Affinitäten der einzelnen Liganden gezeigt werden konnten. Die Affinitäten der Liganden Theobromin und Theophyllin unterschieden sich bei 15 und 20°C ebenfalls signifikant. Sie nahmen für beide Bindungsplatztypen mit steigender Temperatur teilweise signifikant ab (siehe Abbildung 3.16 A und C). Die Bindungsaffinität zu den nicht-allosterischen Bindungsstellen war jedoch geringer als für die allosterischen Bindungsstellen und wies eine geringere Streuung auf. Die Liganden banden an die allosterischen Bindungsstellen unter hypoxischen Bedingungen bei 20°C mit einer einheitlich geringen Affinität. Die Bindungskonstante $k_{\text{hyp}}^{\text{Theop}}(10^\circ\text{C})$ konnte nur ungefähr mit 2 mM^{-1} bestimmt werden. Die beiden weiteren Dimethylxanthine Theobromin und Paraxanthin zeigten mit $k_{\text{hyp}}^{\text{Theob}}(10^\circ\text{C}) = 2,90 \pm 1,19 \text{ mM}^{-1}$ und $k_{\text{hyp}}^{\text{Parax}}(10^\circ\text{C}) = 1,67 \pm 0,15 \text{ mM}^{-1}$ Affinitäten in der gleichen Größenordnung. Die Bindungsenthalpien der allosterischen Bindungsstellen unter normoxischen Bedingungen $\Delta H_{O_2}^0$ waren zwischen 10 und 20°C nicht signifikant unterschiedlich und zeigten auch in der Tendenz keine Temperaturabhängigkeit auf. Daher konnte die Wärmekapazität zwischen 10 und 20°C für alle Dimethylxanthine mit $\Delta C_{\text{eff}p(O_2)} = 0$ bestimmt werden. Ab 25°C nahmen die Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ aller Liganden ab. Ferner wurde die Bestimmung der Bindungsenthalpien zunehmend ungenau. Da die Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ linear abnahmen, konnten Wärmekapazitäten zwischen 20 und 30°C mit $\Delta C_p^{\text{Theop}} = -2,64 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$, $\Delta C_p^{\text{Parax}} = -1,51 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ und $\Delta C_p^{\text{Theob}} = -0,66 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ bestimmt werden. Die Bindungsenthalpien der allosterischen Bindungsplätze unter hypoxischen Bedingungen ΔH_{hyp}^0 streuten durchweg sehr stark, so dass hier keine Wärmekapazität bestimmt werden konnte.

Die freien Enthalpien ΔG_{eff}^0 blieben in Abhängigkeit von der Temperatur weitgehend konstant. Die freie Energie der nicht-allosterischen Bindung lag dabei durchgehend niedriger als die der allosterischen Bindungsstellen. Die Bindung des Liganden Theophyllin konnte mit freien Energien zwischen $\Delta G_{O_2}^0 \text{Theop}(10^\circ\text{C}) = -28,24 \pm 0,87 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta G_{O_2}^0 \text{Theop}(30^\circ\text{C}) = -26,70 \pm 0,60 \text{ kJ mol}^{-1}$ charakterisiert werden. Die freien Energien der Paraxanthinbindung und Theobrominbindung lagen weitgehend in der gleichen Größenordnung. $\Delta G_{O_2}^0$ nahm somit mit steigender Temperatur in der Tendenz zu. Die freien Energien der nicht-allosterischen Bindung konnten mit Werten zwischen

Tabelle 3.17: Bindungskonstanten $k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹], $k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹], $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ und $k_{\text{nallohyp}}^{\text{eff}}$, sowie die dazugehörigen Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol⁻¹], ΔH_{hyp}^0 [kJ mol⁻¹], $\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol⁻¹] und $\Delta H_{\text{nallohyp}}^0$ [kJ mol⁻¹] der Bindung von Theophyllin, Paraxanthin und Theobromin an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C. $k_{O_2}^{\text{eff}}$ ist die Bindungskonstante der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation, $k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ gibt die Bindungsaffinität der unter hypoxischen Bedingungen dominierenden Konformation wieder. $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ und $k_{\text{nallohyp}}^{\text{eff}}$ bezeichnen die Bindungsaffinitäten zu den sowohl unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen identischen nicht-allosterischen Bindungsplätzen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm \text{SD}$).

	Theophyllin	Paraxanthin	Theobromin
$k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	124,9 ± 49,3	155,8 ± 35,5	219,3 ± 38,5
$k_{\text{hyp}}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	≈ 2	1,67 ± 0,15	2,9 ± 1,19
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	17,5 ± 2,19	24,7 ± 5,05	29,2 ± 2,81
$k_{\text{nallohyp}}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	17,5	24,7	29,2
$\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol ⁻¹]	-58,13 ± 2,61	-55,39 ± 5,45	-61,31 ± 3,91
ΔH_{hyp}^0 [kJ mol ⁻¹]	-86,86 ± 12,81	-120,01 ± 24,04	-96,57 ± 67,71
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol ⁻¹]	-77,84 ± 10,28	-47,55 ± 13,15	-50,49 ± 12,87
$\Delta H_{\text{nallohyp}}^0$ [kJ mol ⁻¹]	-83,87 ± 7,49	-53,92 ± 8,36	-47,09 ± 2,71

$\Delta G_{\text{nalloTheob}}^0(30^\circ\text{C}) = -23,67 \pm 0,84 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta G_{\text{nalloTheob}}^0(10^\circ\text{C}) = -24,97 \pm 0,11 \text{ kJ mol}^{-1}$ beschrieben werden. Die freien Energien $\Delta G_{\text{nallo}}^0$ der anderen beiden Dimethylxanthine konnten im gleichen Ausmaß bestimmt werden.

3.3.5 Temperaturabhängige Bindung der Methylxanthine und weiterer Xanthinderivate

Die Methylxanthine stellen ebenfalls Strukturderivate des Koffeins, als auch des Urats, dar und lassen sich ebenfalls in die Gruppe der Xanthine einordnen (siehe Abbildung 1.1). Des weiteren wurde die Bindung der Xanthinderivate Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bestimmt und mit dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Modell ausgewertet. Die normoxischen Bindungsisotherme des 7-Methylxanthins zeigte einen sigmoiden Verlauf, die des 1-Methylxanthins jedoch einen hyperbolen (siehe Abbildung 6.2 und 6.1) und konnte daher nicht mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell ausgewertet werden, da hierzu Daten unter hypoxischen Bedingungen fehlten. Die Bindung des 1-Methylxanthin an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C konnte mit einer Bindungskonstanten $k_{1M}^{\text{IM}} = 18,71 \pm 9,94 \text{ mM}^{-1}$ und $\Delta H_{1M}^0 = -115,05 \pm 16,73 \text{ kJ mol}^{-1}$ durch das Non-Interacting-Site-Modell charakterisiert werden. Die freie Energie ΔG_{1M}^0 lag mit $-23,76 \pm 1,09 \text{ kJ mol}^{-1}$ innerhalb der gleichen Größenordnung wie die freie Energie der übrigen Xanthinderivate. Die Entropie konnte mit $T\Delta S_{1M}^0 = -91,19 \pm 17,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden.

In Tabelle 3.18 sind die Ergebnisse der Auswertung der Bindungsisothermen der Liganden 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure aufgeführt. Die Affinität der Methylxanthine zu den nicht-allosterischen Bindungsplätzen lag

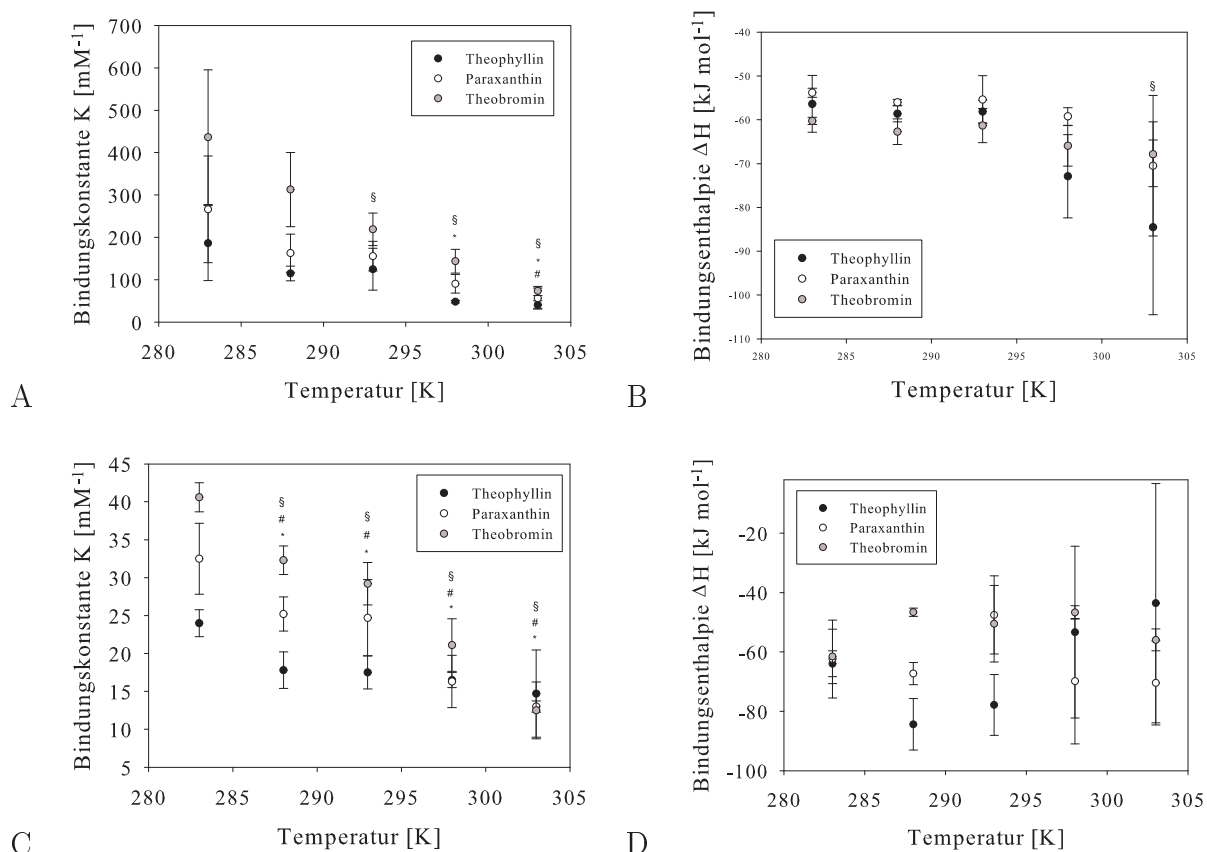


Abbildung 3.16: A: Bindungskonstante $k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹] und B: Bindungsenthalpie $\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol⁻¹] der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation und C: Bindungskonstante $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹] und D: Bindungsenthalpie $\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol⁻¹] der unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verfügbaren nicht-allosterischen Bindungsplätzen. Bei den dargestellten Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung (X ± SD). Signifikanter Unterschied zum Referenzwert bei 283 K für Theophyllin (*), Paraxanthin (#) und Theobromin (§).

Tabelle 3.18: Bindungskonstanten $k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹] und $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ [mM⁻¹] sowie die dazugehörigen Bindungsenthalpien $\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol⁻¹] und $\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol⁻¹] der Bindung von 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Isokoffein und 1,3,7- Trimethylharnsäure (1,3,7-TMH) an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwischen 10 und 30 °C. $k_{O_2}^{\text{eff}}$ ist die Bindungskonstante der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation. $k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ bezeichnet die Bindungsaffinitäten zu den normoxischen nicht-allosterischen Bindungsplätzen. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung (X ± SD)

	3-Methylxanthin	7-Methylxanthin	Isokoffein	1,3,7-TMH
$k_{O_2}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	46, 28 ± 7, 89	150, 67 ± 7, 51	272, 00 ± 5, 29	115, 70 ± 48, 51
$k_{\text{nalloO}_2}^{\text{eff}}$ [mM ⁻¹]	12, 13 ± 1, 78	15, 30 ± 1, 73	53, 33 ± 4, 39	8, 86 ± 0, 30
$\Delta H_{O_2}^0$ [kJ mol ⁻¹]	-77, 29 ± 8, 32	-55, 57 ± 2, 66	-66, 68 ± 1, 72	-68, 86 ± 7, 06
$\Delta H_{\text{nalloO}_2}^0$ [kJ mol ⁻¹]	-49, 99 ± 15, 63	-72, 04 ± 1, 61	-12, 92 ± 7, 37	-42, 86 ± 19, 01

mit $k_{nalloO_2}^{3M}(20^\circ\text{C}) = 12,13 \pm 1,78 \text{ mM}^{-1}$ und $k_{nalloO_2}^{1M}(20^\circ\text{C}) = 15,30 \pm 1,73 \text{ mM}^{-1}$ deutlich unter denen der Dimethylxanthine, während die Affinität zu den allosterischen Bindungsplätzen mit $k_{O_2}^{1M}(20^\circ\text{C}) = 150,67 \pm 7,51 \text{ mM}^{-1}$ in der gleichen Dimension wie die des Paraxanthins berechnet werden konnte. Die freie Energie wurde in den gleichen oben aufgeführten Ausmaßen der Dimethylxanthine für die allosterischen und nicht-allosterischen Bindungsplätze bestimmt.

4

Diskussion

Die Erforschung von Sauerstoffbindungsproteinen bildete die Grundlage für die Definition allosterischer Systeme. Monod et al. (1965) lieferten mit dem so genannten MWC-Modell die erste Definition von Allosterie, basierend auf einem Modell, das Konformationsänderungen des Moleküls in Betracht zog.

Hämocyane trugen auf Grund ihrer hoch kooperativen Sauerstoffbindung und deren Beeinflussung durch zahlreiche Effektoren zur Weiterentwicklung von komplexeren allosterischen Modellen bei (Robert et al., 1987). Die Kombination von Sauerstoffbindungsdaten und der direkten thermodynamischen Analyse der Effektorbindung ermöglicht es, die Zusammenhänge der allosterischen Wechselwirkungen sowohl zwischen dem Ligand Sauerstoff und dem Makromolekül als auch zwischen dem Effektor und dem Makromolekül zu charakterisieren und allosterische Modellvorstellungen auf ihre Gültigkeit zu überprüfen.

Urat erhöht als natürlicher Modulator die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins des Europäischen Hummers und erniedrigt die Kooperativität der Sauerstoffbindung (Zeis et al., 1992; Nies et al., 1992). Koffein ist ein Strukturanalogon des Urats, konkurriert wie weitere Xanthinderivate mit dem Urat um den Bindungsplatz und beeinflusst die Kooperativität und die Sauerstoffbindung des Hämocyanins auf ähnliche Weise wie das Urat (Zeis, 1994; Menze et al., 2000). Die Temperatur ist ein physikalischer Effekt, der sowohl die Struktur von Molekülen als auch deren Bindungsverhalten beeinflusst und daher auf die Physiologie des Organismus einwirkt. Somit kann abschließend neben den allosterischen und thermodynamischen Analysen die Physiologie des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) und seine Anpassung an eine Temperaturänderung betrachtet werden.

4.1 Temperaturabhängiger Einfluss von Urat und Koffein auf die Sauerstoffbindung

Wie schon an zahlreichen Crustaceen gezeigt wurde (Morris et al., 1985; Nies et al., 1992; Menze et al., 2000; Hellmann, 2004), hat Urat eine affinitätssteigernde Wirkung auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins. Die Kooperativität der Sauerstoffbindung wird zu-

dem verringert. Jene Eigenschaften konnten für die Bindung des natürlichen Modulators Urat und des artifiziellen Effektors Koffein über einen Temperaturbereich von 10 bis 30°C beobachtet werden (siehe Tabelle 3.1). Zeis (1994) bestimmte für das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* Sauerstoffhalbsättigungswerte in Ringerlösung bei einer Uratkonzentration von 0,25 mM zu $P_{50}^{\text{Urat}}(15^\circ\text{C}) = 4,80$ Torr und $P_{50}^{\text{Urat}}(25^\circ\text{C}) = 20,93$ Torr. Die in dieser Arbeit bestimmten Werte weichen mit $P_{50}^{\text{Urat}}(15^\circ\text{C}) = 6,14 \pm 0,38$ Torr und $P_{50}^{\text{Urat}}(25^\circ\text{C}) = 11,84 \pm 0,36$ Torr um Faktoren von 0,78 - 1,77 ab. Der bei 20°C bestimmte Halbsättigungswert ist jedoch mit dem von Menze et al. (2005) angegebenen Wert für 20°C mit $P_{50}^{\text{Urat}}(20^\circ\text{C}) = 8,0$ Torr zu vergleichen. Die von Menze et al. (2005) bestimmten Sauerstoffhalbsättigungswerte wurden, wie in dieser Arbeit, in einem HEPES-Puffer (siehe Kapitel 2.5) bestimmt. Da Calcium- und Magnesium-Ionen einen Einfluss auf den Assoziationsgrad des Hämocyanins haben (Truchot, 1975), wurde in dieser Arbeit, um eine höchst mögliche Kooperativität zu erreichen, beide Ionen in einer hohen Konzentration dem Puffer beigelegt. Die Abweichung zu den von Zeis (1994) gemessenen Werten ist somit wahrscheinlich auf die Verwendung eines unterschiedlichen Puffersystems und der Konzentration von zweiwertigen Kationen zurückzuführen. Auch der in dieser Arbeit bestimmte Hill-Koeffizient von $n_H^{\text{Urat}}(20^\circ\text{C}) = 2,88 \pm 0,32$, liegt in einer vergleichbaren Größenordnung mit dem von Menze et al. (2005) mit $n_H^{\text{Urat}}(20^\circ\text{C}) = 3,3$ bestimmten Wert. Der Halbsättigungswert erhöhte sich mit zunehmender Temperatur, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit eines Effektors und die Kooperativität der Sauerstoffbindung erniedrigte sich mit steigender Temperatur. Zudem verminderte sich der Effekt von Urat auf die Sauerstoffaffinität mit zunehmender Temperatur. So verringert sich $\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(10^\circ\text{C})$ von 0,24 Torr auf $\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(30^\circ\text{C}) = 0,17$ Torr. Diese Beobachtung stimmt mit den von Zeis et al. (1992) bestimmten Daten überein. In Ringerlösung nahm der relative Einfluss mit zunehmender Temperatur ebenfalls ab ($\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(15^\circ\text{C}) = 0,14$, $\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(25^\circ\text{C}) = 0,03$). Die in dieser Arbeit in HEPES-Puffer bestimmten Parameter fallen geringer aus, stimmen aber in der Tendenz überein. Überraschenderweise wurde für Koffein ein unterschiedlicher Effekt beobachtet. Mit zunehmender Temperatur wird der Effekt auf die Sauerstoffaffinität des Moleküls verstärkt ($\Delta\log P_{50}^{\text{Koffein}}(10^\circ\text{C}) = 0,25$, $\Delta\log P_{50}^{\text{Koffein}} = 0,32$). Dies weist auf eine unterschiedliche Beeinflussung der allosterischen Zustände des Hämocyaninmoleküls durch den allosterischen Effektor hin.

Weitere Studien der Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffbindung von Crustaceen-Hämocyaninen bestätigen die Analysen des Urateinflusses. So bestimmten Sanna et al. (2004) für das Hämocyanin des Großen Bärenkrebsses *Scyllarides latus* eine Abnahme des Halbsättigungswerts, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Urat mit abnehmender Temperatur. Das hexamere Hämocyanin des Bärenkrebsses zeigte jedoch einen stärkeren absoluten Urateffekt mit einem $\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(25^\circ\text{C}) \approx 0,6$, wohingegen der Urateffekt des dodekameren Hämocyanins des Europäischen Hummers mit $\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}}(25^\circ\text{C}) = 0,18$ deutlich geringer ausfiel. Das relative Ausmaß des Urateffekts des hexameren Hämocyanins des Bären-

renkrebses ist etwa doppelt bis dreifach so hoch wie für das dodekamere Hämocyanin des Europäischen Hummers (Zeis et al., 1992; Sanna et al., 2004; diese Arbeit).

Eine eingehendere Analyse der Sauerstoff- und Effektorinteraktion als eine Berechnung der Hill-Parameter, erfordert die Analyse der Sauerstoffbindungskurven über ein allosterisches Modell. Betrachtet man die Bindung des Liganden Sauerstoff an das Hämocyanin im Bezug auf das Massenwirkungsgesetz, so ergibt sich dabei die Summe aller verschiedenen Zustände des Makromoleküls im Verhältnis zu einem Referenzzustand als Zustandssumme Q . Aus diesem Zusammenhang ergibt sich das Bindungspolynom P , dessen Ableitung die Bindungskurve und damit die Sättigung $\bar{X}$ darstellt (siehe Gleichung 2.1) (Wyman und Gill, 1990). Um den molekularen Mechanismus der Bindung von Sauerstoff an das Makromolekül zu berücksichtigen, muss eine allosterische Modellvorstellung in die Auswertung über das Massenwirkungsgesetz mit einbezogen werden.

Menze et al. (2005) diskutierten in ihrer Arbeit über allosterische Systeme bei multimeren Proteinen am Beispiel des Einflusses des pH-Werts auf die Sauerstoffbindung und die Urat- bzw. Koffeinbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers zwei Modelle der Sauerstoffbindung, das Three-State-Modell, ($n=6$ und $n=12$) unter der Annahme, dass die allosterische Einheit entweder von einem Hexamer oder einem Dodekamer gebildet wird und das Nested-MWC-Modell. Um die in dieser Arbeit bestimmten Sauerstoffbindungsdaten unter allosterischen Modellvorstellungen zu betrachten, wurden diese einer nicht-linearen Regression mit den beiden oben genannten Modellen unterzogen und überprüft, ob das von Menze et al. (2005) vorgeschlagene Modell der Sauerstoffbindung die Temperaturabhängigkeit der Bindung beschreibt.

Die Regression mit dem Three-State-Modell unter der Annahme, dass das Dodekamer die allosterische Einheit bildet ($n=12$), zeigte in allen Analysegruppen (siehe Tabelle 3.6) einen höheren χ^2 -Wert als die Regressionen mit den beiden anderen Modellen. Demnach liegt, wie schon von Richey et al. (1985), Robert et al. (1987) und Menze et al. (2005) beschrieben, die allosterische Einheit des Hämocyaninmoleküls in Form eines Hexamers vor. Um eine Regression der Daten mit dem Three-State-Modell zu ermöglichen, musste K_R während der Regression als konstant angenommen werden. Es wurde für die finale Regression daher jener K_R -Wert konstant gesetzt, der eine Regression mit dem geringsten χ^2 -Wert ermöglichte. Eine solche Einschränkung der Regressionsparameter führt zu einer weiteren Unsicherheit in der Auswertung (Press et al., 1992), so dass das Three-State-Modell verworfen wurde, obwohl eine Regression mit dem Three-State-Modell ($n = 6$) bei 30°C einen geringeren χ^2 -Wert ergab.

Betrachtet man die mit dem Nested-MWC-Modell für jede Temperatur berechneten Bindungskonstanten $K_{\alpha\beta}$, so zeigt sich eine klare Veränderung der Affinität der Sauerstoffbindung über die Temperatur. In diesem Modell werden die Sauerstoffbindungskonstanten unabhängig von der Bindung eines Effektors bestimmt, so dass der Einfluss der Effektorbindung nur über die Gleichgewichtskonstanten und die Einflussfaktoren beschrieben

werden kann. So band Sauerstoff zwischen 10 und 25°C mit der höchsten Affinität an die Konformation rT, bei 30°C wurde für die Konformation rR eine geringfügig höhere Affinität berechnet. In dieser Arbeit konnten die Sauerstoffbindungskonstanten, basierend auf einer Regression mit dem Nested-MWC-Modell, ohne konstant gesetzte Bindungskonstanten bestimmt werden. Im Vergleich zu den von Menze et al. (2005) bei 20°C bestimmten Sauerstoffbindungskonstanten ($K_{rT} = 3 \text{ Torr}^{-1}$; $K_{rR} = 1,8 \pm 0,4 \text{ Torr}^{-1}$; $K_{tR} = 0,065 \pm 0,004 \text{ Torr}^{-1}$ und $K_{tT} = 0,008 \pm 0,0008 \text{ Torr}^{-1}$) fielen die in dieser Arbeit bestimmten Bindungskonstanten bei einer Temperatur von 20°C mit $K_{rT} = 5,10 \pm 0,09 \text{ Torr}^{-1}$; $K_{rR} = 4,19 \pm 0,11 \text{ Torr}^{-1}$; $K_{tR} = 0,09 \pm 0,03 \text{ Torr}^{-1}$ und $K_{tT} = 0,015 \pm 0,002 \text{ Torr}^{-1}$ daher etwa doppelt so hoch aus. Da jedoch die Tendenz der Affinität für die Bindungskonstanten mit den von Menze et al. (2005) übereinstimmt, wurde davon ausgegangen, dass die Bindungskonstanten die Bindungssituation gleichwohl beschreiben.

Beltramini et al. (2005) konnten das Sauerstoffbindungsverhalten des dodekameren Hämocyanins der Riesentigergarnele (*Penaeus monodon*) ebenfalls mit dem Nested-MWC-Modell beschreiben. Für das 24-mere Hämocyanin der Vogelspinne (*Eurypelma californicum*) wurden ebenfalls Sauerstoffbindungskonstanten mit dem Nested-MWC-Modell bestimmt. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden die Sauerstoffbindungsdaten der genannten Studien in Abhängigkeit des pH-Werts aufgenommen. Es wurde wie auch hier davon ausgegangen, dass die Sauerstoffbindungskonstanten unabhängig vom pH-Wert bestimmt werden können. Da in dieser Arbeit die Sauerstoffbindungskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur betrachtet wurden, wäre es möglich, dass Fehler in Annahmen, die für die Konvergenz der Regression unterstellt wurden, zu Schwankungen in den Parametern führten. Es könnte ein Einfluss durch die Bindung des Liganden entstehen, der sich nicht nur in den Gleichgewichtskonstanten auswirkt. Es ist jedoch in allen Studien eindeutig, dass Sauerstoff an die beiden Konformationen rT und rR mit der höchsten Affinität bindet und an die Konformationen tT und tR mit einer deutlich niedrigeren Affinität.

Die durch eine weitere Regression der Daten bestimmten Gleichgewichtskonstanten (siehe Formel 2.14) sind effektorspezifisch und konnten nur mit großen Abweichungen bestimmt werden. Es konnte jedoch mit zunehmender Temperatur gezeigt werden, dass die Gleichgewichtskonstanten l_T^{Koffein} , l_R^{Koffein} , l_T^{Urat} und l_R^{Urat} signifikant abnehmen. Die Gleichgewichtskonstante Λ^{eff} wies die größten Unsicherheiten während der Regression auf und es konnte daher keine Tendenz in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeigt werden. Dennoch liegen die Gleichgewichtskonstanten bei 20°C in den gleichen Größenordnungen wie jene, die von Menze et al. (2005) bestimmt wurden. Auch Menze et al. (2005) wiesen darauf hin, dass die mit dem Nested-MWC-Modell und mit dem Three-State-Modell ($n = 6$) bestimmten Gleichgewichtskonstanten mit großen Fehlern behaftet waren.

Aus den Sauerstoffbindungskonstanten und den effektorspezifischen Gleichgewichtskonstanten ließ sich der Einfluss der einzelnen Effektoren auf die Sauerstoffbindung sowie die für jede Temperatur unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen vorliegende

Tabelle 4.1: Sauerstoffbindungskonstanten [Torr⁻¹] (Nested-MWC-Modell) der Hämocyanine verschiedener Arten

Art	Sauerstoffbindungskonstante [Torr ⁻¹]			
	$k_{rT}^{O_2}$	$k_{rR}^{O_2}$	$k_{tT}^{O_2}$	$k_{tR}^{O_2}$
<i>Homarus vulgaris</i> (diese Arbeit)	$5,10 \pm 0,09$	$4,19 \pm 0,11$	$0,015 \pm 0,002$	$0,09 \pm 0,03$
<i>Homarus vulgaris</i> (Menze et al., 2005)	3,0	$1,8 \pm 0,4$	$0,008 \pm 0,0008$	$0,065 \pm 0,004$
<i>Penaeus monodon</i> (Beltramini et al., 2005)	$3,0 \pm 2,0$	$0,28 \pm 0,05$	$\leq 0,001$	$0,015 \pm 0,002$
<i>Eurypelma californicum</i> (Decker und Sterner, 1990; Hellmann et al., 2001)	3,5	2,0	$0,008 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,01$

Konformationsverteilung ermitteln. Beide Parameter waren fehlerbehaftet, da sie durch die mit Unsicherheiten versehenen Gleichgewichtskonstanten bestimmt wurden. Zudem neigen die Parameter während der Bestimmung der Einflussfaktoren zu Korrelation. Dennoch konnten die Einflussfaktoren (siehe Tabelle 3.7 und 3.8) und die Konformationsverteilung in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt werden.

Die Abbildungen 4.1 bis 4.3 zeigen die prozentuale Konformationsverteilung im Hämocyaninmolekül unter hypoxischen (1 Torr O₂; siehe Abbildung 4.1 bis 4.3 A) und normoxischen Bedingungen (150 Torr O₂; siehe Abbildung 4.1 bis 4.3 B). Um den Einfluss der Effektorbindung beurteilen zu können, muss zunächst die Konformationsverteilung in Abwesenheit des Effektors (Urat oder Koffein) bei den verschiedenen Temperaturen bestimmt werden (siehe Abbildung 4.1). Anschließend kann die Verteilungen in Abwesenheit eines Effektors mit der Verteilung in Anwesenheit des Effektors verglichen werden.

In Abwesenheit des Modulators und des Sauerstoffs dominierte zwischen 15 und 30°C die Konformation tT. Bei 10°C liegt jedoch die Konformation rT zu ca. 99% vor. Unter normoxischen Bedingungen ändert sich die Konformationsverteilung mit zunehmender Temperatur von der zunächst bei 10°C dominierenden Konformation rT auf die bei 30°C mit ca. 50% dominierende Konformation rR.

In Anwesenheit der Effektoren (siehe Abbildung 4.2 und 4.3) konnte die Konformationsverteilung unter hypoxischen Bedingungen nicht so eindeutig wie in Abwesenheit der Effektoren bestimmt werden. Besonders im Falle des Koffeins zeigt die Konformationsverteilung über das gesamte Temperaturspektrum deutliche Schwankungen. Die Auswertung von Polynomen höherer Ordnung (≥ 6), wie sie hier mit Formel 2.14 vorliegen, sind numerisch instabil und daher kann es bei der Berechnung der Parameter zu gravierenden Verfahrensfehlern (Rundungsfehler) kommen. Diese treten infolge der begrenzten Genau-

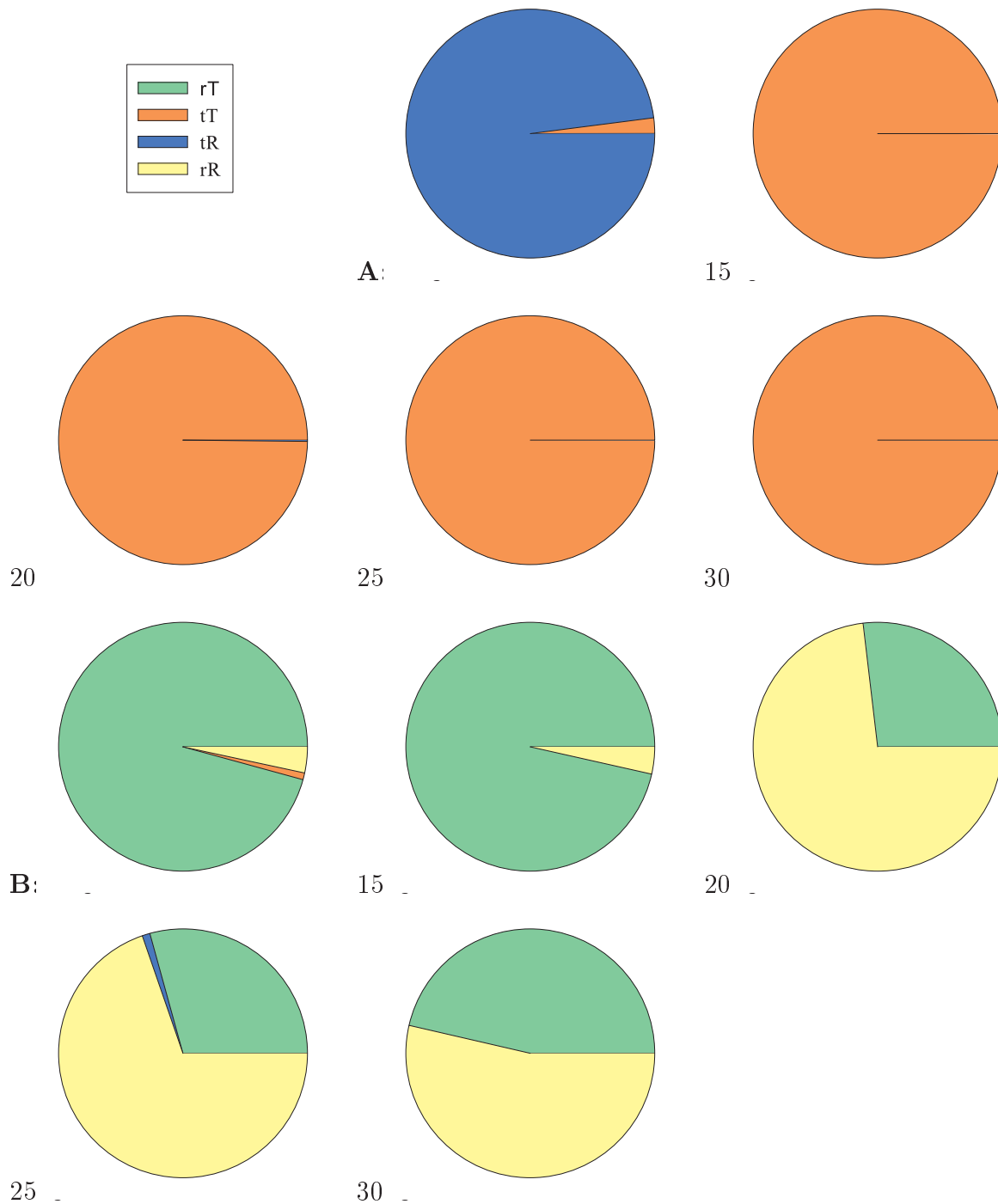


Abbildung 4.1: Darstellung der Konformationsverteilungen des Hämocyaninmoleküls von *Homarus vulgaris* basierend auf dem Nested-MWC-Modell in % **A:** unter **hypoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C und **B:** unter **normoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C; Konformation rT (grün), Konformation tT (rot), Konformation tR (blau), Konformation rR (gelb)

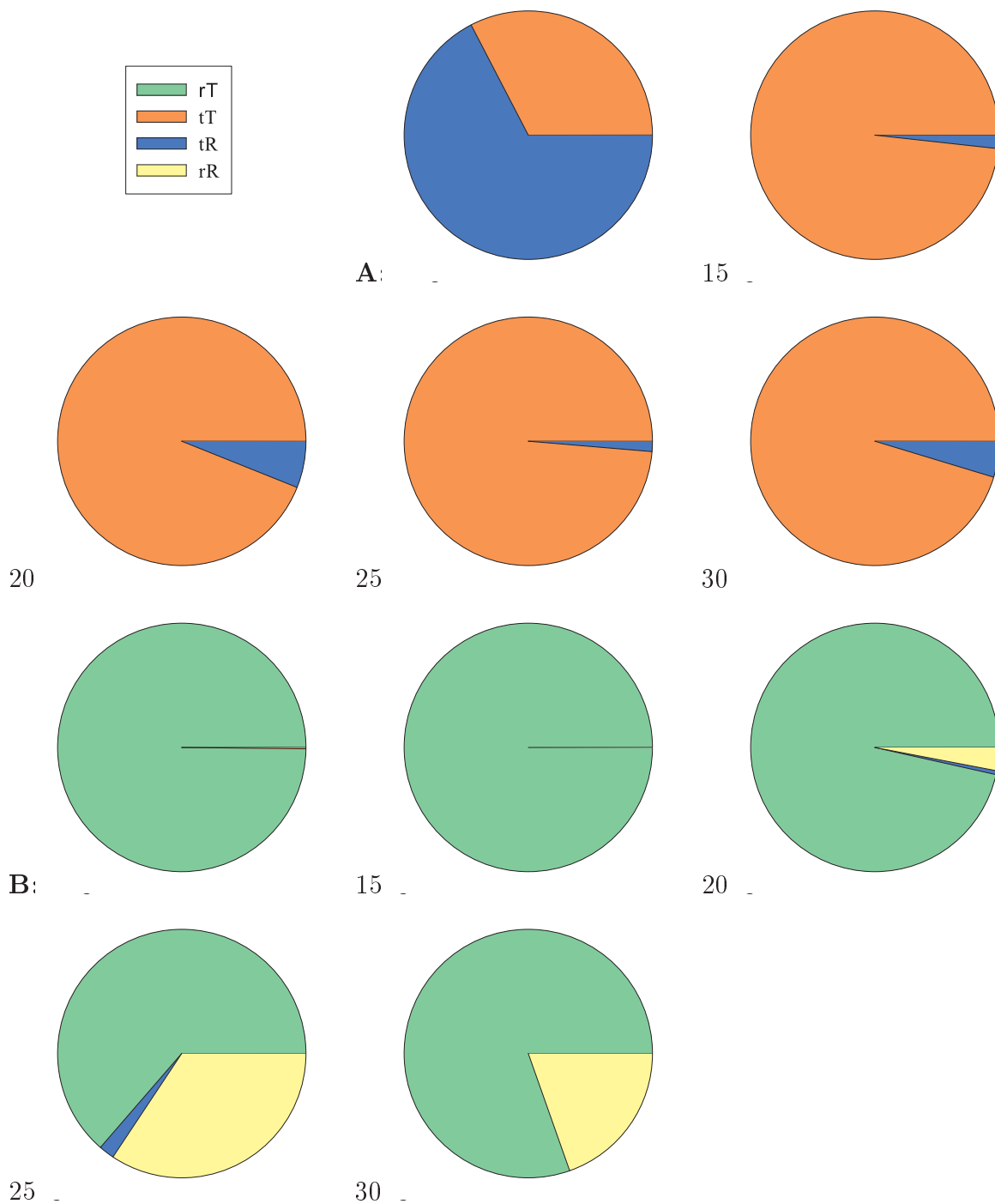


Abbildung 4.2: Darstellung der Konformationsverteilungen des Hämocyaninmoleküls basierend auf dem Nested-MWC-Modell in % nach der Bindung von Urat an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* **A:** unter **hypoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C und **B:** unter **normoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C; Konformation rT (grün), Konformation tT (rot), Konformation tR (blau), Konformation rR (gelb)

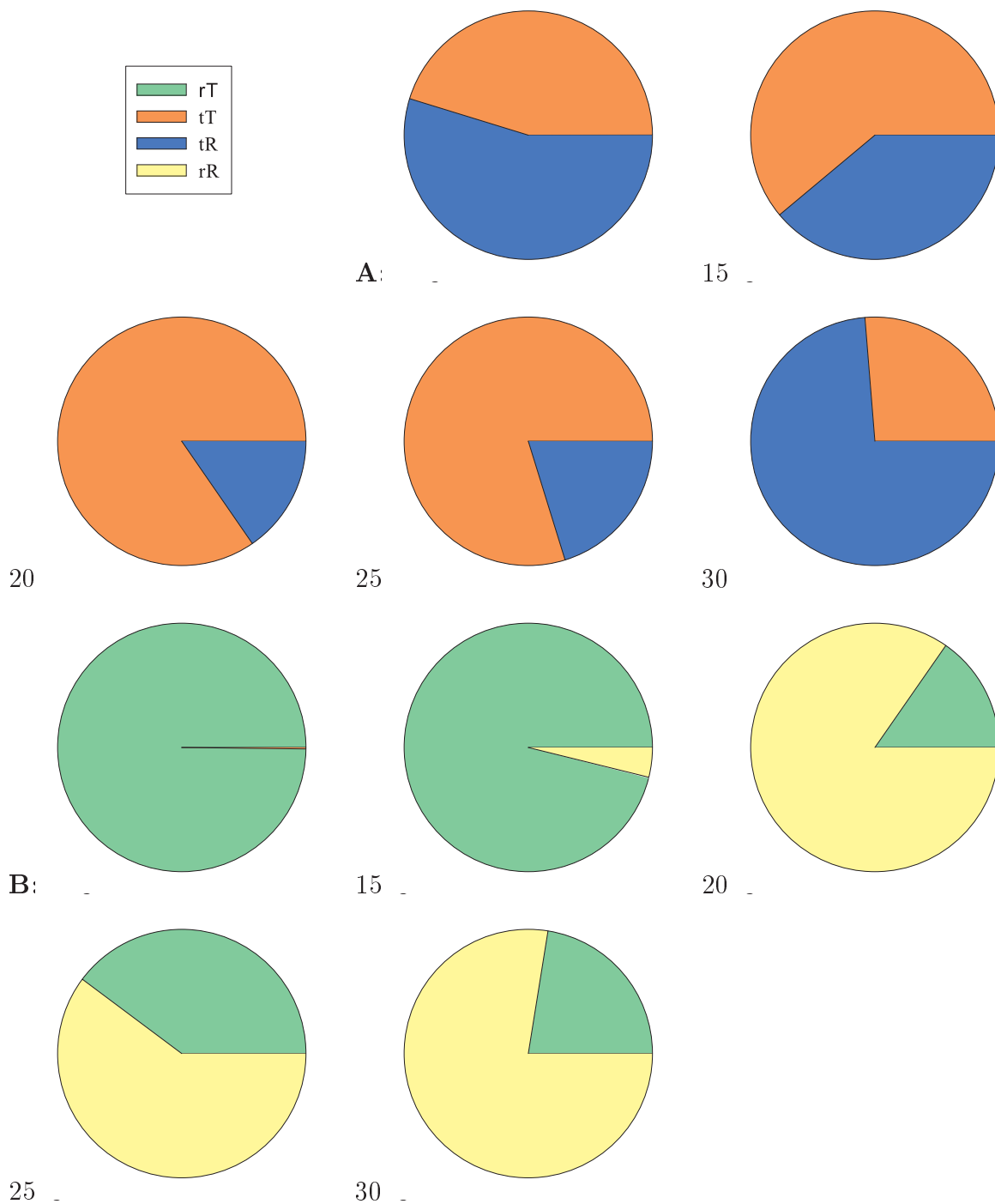


Abbildung 4.3: Darstellung der Konformationsverteilungen des Hämocyaninmoleküls basierend auf dem Nested-MWC-Modell in % nach der Bindung von Koffein an das Hämocyanin von *Homarus vulgaris* **A:** unter **hypoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C und **B:** unter **normoxischen** Bedingungen bei 10, 15, 20, 25 und 30°C; Konformation rT (grün), Konformation tT (rot), Konformation tR (blau), Konformation rR (gelb)

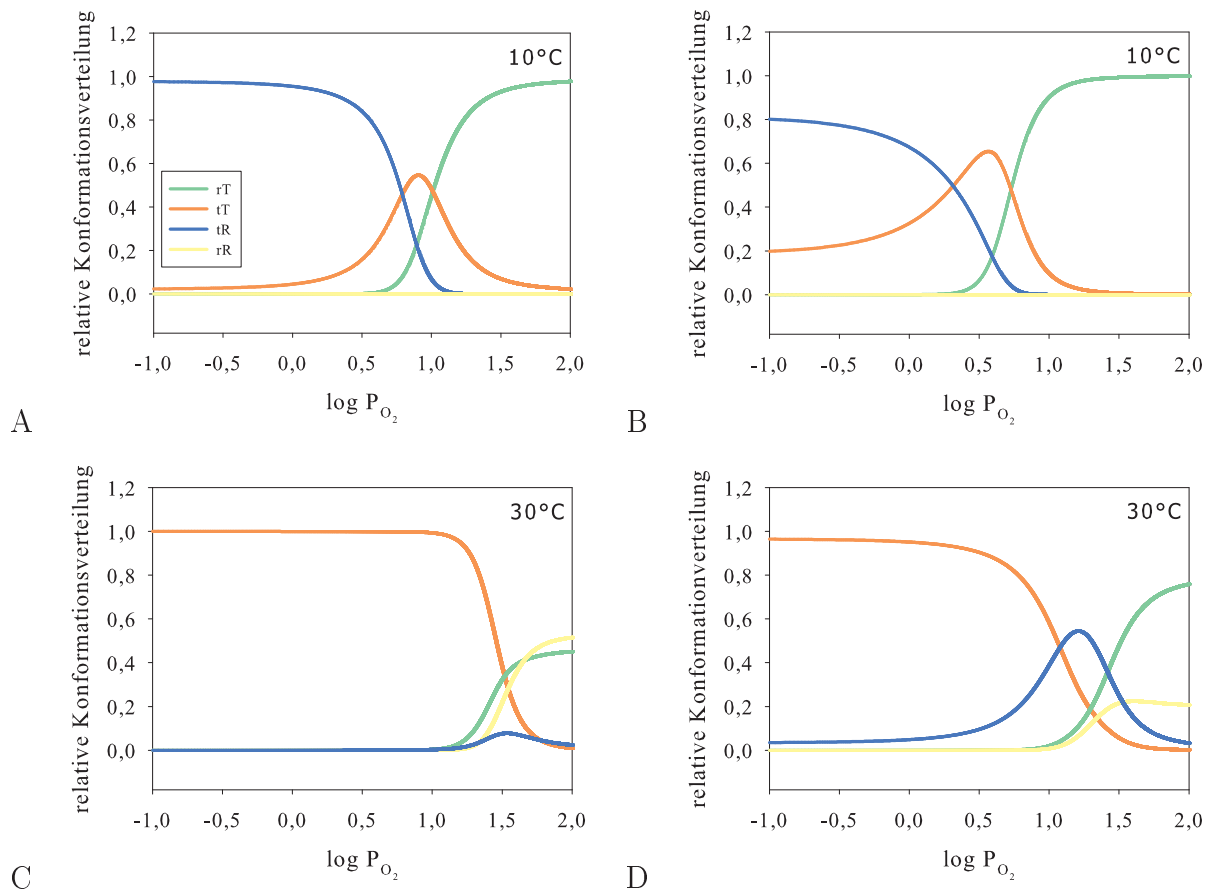


Abbildung 4.4: relative Konformationsverteilung des Hämocyansins des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration A: in Abwesenheit eines Effektors und B: in Anwesenheit von Urat bei 10°C und C: in Abwesenheit eines Effektors und D: in Anwesenheit von Urat bei 30°C. Konformation rT (grün), Konformation tT (rot), Konformation tR (blau), Konformation rR (gelb)

igkeit des Computers auf (Zahlenabbruchfehler) und werden durch Zahlenauslöschungen verursacht. Die verfügbaren Routinen der verwendeten Software (Sigma Plot) erlauben jedoch keine robuste Abschätzung dieser Fehler, so dass ihr Einfluss nicht bestimmt werden kann (Press et al., 1992). Dennoch werden die berechneten Konformationsverteilungen in dieser Arbeit als Hilfsmittel zur Interpretation der Daten herangezogen, da die über die thermodynamischen Messungen gewonnenen Ergebnisse das hier aufgezeigte Verhalten der Untereinheiten unterstützen (siehe Kapitel 4.4.2). Unter normoxischen Bedingungen dagegen ließ sich in Anwesenheit von Urat mit zunehmender Temperatur eine Konformationsumlagerung von der bei 10°C deutlich dominierenden Konformation rT zu der bei 30°C mit ca. 19% vorhandenen Konformation rR berechnen. Der Einfluss des Koffeins ist deutlich geringer. Zudem scheinen besonders bei 30°C die Werte starken Schwankungen zu unterliegen, da auch bei dieser Temperatur die Einflussfaktoren nur ungefähr bestimmt werden konnten. Die Ungenauigkeiten während der Berechnung der Konformationsanteile unter hypoxischen Bedingungen erschweren es, den Einfluss der Effektoren als auch der

Temperatur auf die Konformationsverteilung zu beurteilen. Die Bindung der Effektoren unterstützt vermutlich bei 10°C die Umlagerung in die Konformation tT. Vergleicht man die Verteilungen in An- und Abwesenheit der Effektoren, so scheint deren Bindung unter normoxischen Bedingungen zwischen 10 und 15°C eine Umlagerung auf die Konformation rT zu begünstigen. Bei höheren Temperaturen scheint Koffein kaum einen Einfluss auf die Konformationsverteilung zu haben. Die Bindung des Urats dagegen erzeugt weiterhin eine Umlagerung in die Konformation rT. Wie bereits am Anfang des Kapitels dargestellt, zeigen Koffein und Urat in Abhängigkeit von der Temperatur ein entgegengesetztes Verhalten bei der Beeinflussung der Sauerstoffaffinität. Die im Falle des Koffeins fehlende Konformationsumlagerung bei erhöhter Temperatur könnte dieses Verhalten erklären.

Die Konformationsverteilung des Hämocyanins ist jedoch nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Sauerstoffkonzentration abhängig. Abbildung 4.4 zeigt die kontinuierliche Änderung der relativen Konformationsverteilung mit zunehmender Sauerstoffkonzentration. Bei 10°C sind in Abwesenheit eines Effektors die Konformationen bei geringer Sauerstoffkonzentration eindeutig verteilt. Durch die Bindung des Urats stellen sich bei geringen Sauerstoffkonzentrationen zwei Konformationen ein (tT und tR). Erhöht sich die Sauerstoffkonzentration, so lagert sich das Molekül zu Konformation rT um. Bei 30°C zeigt sich sowohl in An- als auch in Abwesenheit eines Effektors bei geringen Sauerstoffkonzentrationen, dass das Hämocyanin nur in Konformation tT vorzuliegen scheint. Wohin gegen bei hohen Sauerstoffkonzentrationen in Abwesenheit eines Effektors die Konformationen rT und rR dominieren. Nach einer Bindung des Urats lagert sich das Molekül eindeutig in die Konformation rT um. Hartmann et al. (2001) beschrieben bereits mittels Kleinwinkel-Röntgenstrukturanalysen (SAXS), dass das Hämocyanin des Amerikanischen Hummers in zwei völlig mit Sauerstoff gesättigten Konformationen vorliegen kann. Zudem kann die Bindung der Effektoren eine Konformationsänderung auslösen. Die in dieser Arbeit vorgenommenen Analysen mit dem Nested-MWC-Modell unterstützen diese Daten. Weitere Betrachtungen der Sauerstoffbindung an das Hämocyanin (*Homarus vulgaris*) unter allosterischen Modellvorstellungen erfolgen in Kapitel 4.5.

4.2 Temperaturabhängige Bindung von Urat und Koffein

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Urat und des artifiziellen Effektors Koffein an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) in Abhängigkeit von der Temperatur unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Es wurden unter normoxischen Bedingungen im Temperaturbereich zwischen 10 und 40°C Bindungsisotherme aufgenommen. Unter hypoxischen Bedingungen wurden Bindungsisotherme zwischen 10 und 30°C aufgenommen, da eine Auswertung der Daten nur in diesem Temperaturbereich möglich war. Dies war auf die

generell abnehmende Affinität der Effektoren mit steigender Temperatur zurückzuführen, so dass bei Temperaturen über 30°C der c-Wert der Bindungsisotherme nicht mehr in einem auswertbaren Bereich einzustellen war. Die Stöchiometrie der Uratbindung konnte über die isothermale Titrationskalorimetrie nicht bestimmt werden, da die zu ermittelnden Parameter miteinander korrelierten. Deswegen wurde zunächst das von Menze (2001) vorgeschlagene Modell der Uratbindung angewendet. Die Anzahl der Bindungsplätze wurde mit $n = 2$ konstant gesetzt, so dass die Uratbindungsisotherme unter normoxischen Bedingungen im ganzen gemessenen Temperaturbereich und unter hypoxischen Bedingungen zwischen 10 und 25°C mit dem Non-Interacting-Site-Modell ausgewertet werden konnten (siehe Tabelle 3.10 und 3.14). Bei einer Temperatur von 30°C konnten keine auswertbaren Bindungsisothermen aufgenommen werden (siehe Abbildung 3.15). Da Urat jedoch auch bei 30°C einen Einfluss auf die Sauerstoffbindung hatte (siehe Tabelle 3.1), scheint die Bindung zu schwach, um mittels isothermaler Titrationskalorimetrie detektiert und ausgewertet werden zu können. Dass es sich bei dieser Art der Auswertung jedoch nur um eine Vereinfachung handeln konnte, zeigte sich auf Grund der abweichenden Stöchiometrie der Koffeinbindung. Die Anzahl der Bindungsplätze der Koffeinbindung konnte unter normoxischen Bedingungen mit dem Non-Interacting-Site-Modell bei 10°C mit $n = 2,97 \pm 0,07$ bestimmt werden, verringerte sich jedoch mit zunehmender Temperatur und der damit einhergehenden verringerten Bindungsstärke auf $n = 2,15 \pm 0,12$ bei 35°C. Die bei 40°C gemessenen Bindungsisotherme des Koffeins konnten mit einer konstant gesetzten Anzahl an Bindungsplätzen ($n = 2$) mit dem Non-Interacting-Site-Modell ausgewertet werden.

Als zusätzliche Regressionsmöglichkeiten standen weiter die von Menze 2001 und 2005 dargestellten Modelle zur Verfügung. Eine Regression mit dem Multisite-Interacting-Modell ermöglicht die Auswertung unter Einbeziehung homeotroper Kooperativität, wohingegen eine Auswertung mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell zwei verschiedene Typen von Bindungsplätzen annimmt. Da ein Vergleich der Regressionsqualität der einzelnen Modelle nicht zu einem eindeutigen Schluss führte, wurden die normoxischen Daten der Koffeinbindung über das gesamte Temperaturspektrum mit beiden Modellen ausgewertet und auf Grund der gewonnenen Parameter jenes Modell gewählt, das die Daten eindeutig beschrieb. Allen angewendeten Modellen war gemein, dass die Bindung der Liganden mit zunehmender Temperatur fortwährend schwächer wurde. Da jedoch die Bindungsenthalpien des Multisite-Interacting-Modells mit großen Fehlern behaftet waren und daher innerhalb des Temperaturbereichs keine Tendenz erkennen ließen, wurde das Two-Sets-of-Sites-Modell für weitere Analysen der Bindungsisotherme herangezogen. Zudem präsentierten Menze et al. (2005) mit der Analyse der Daten basierend auf dem Two-Sets-of-Sites-Modell und der damit verbundenen Kombination der Sauerstoffbindungsdaten eine erfolgreiche Beschreibung der Bindung.

Unter der Annahme, dass zwei allosterische und zwei nicht-allosterische Bindungs-

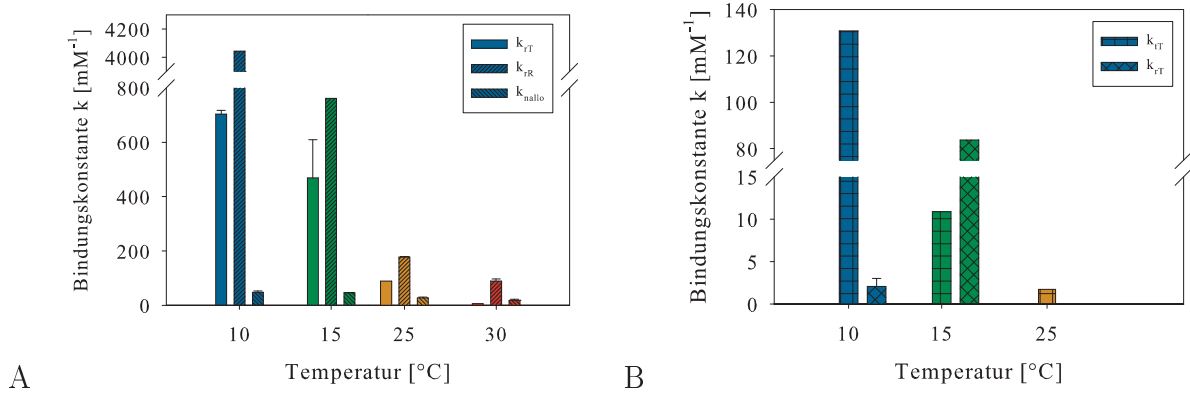


Abbildung 4.5: Darstellung der Koffeinbindungskonstanten k_{rT}^{Koffein} , k_{tT}^{Koffein} , k_{tR}^{Koffein} und k_{rR}^{Koffein} in mM^{-1} , die durch die Kombination von Sauerstoff- und thermodynamischen Bindungsdaten berechnet wurden. A: Bindungskonstanten der unter normoxischen Bedingungen vorhandenen Konformationen B: Bindungskonstanten der unter hypoxischen Bedingungen vorhandenen Konformationen bei den Temperaturen 10 (blau), 15 (grün), 25 (orange) und 30 °C (rot). Bei 30 °C konnte k_{tT}^{Koffein} und k_{rT}^{Koffein} nicht bestimmt werden. ($X \pm SD$) Für Details siehe Text.

stellen für Urat, Koffein und weiterer Xanthinderivate existieren, wurden die Bindungsisotherme der Liganden unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen ausgewertet. Da die Affinitäten der nicht-allosterischen Bindungsstellen unabhängig vom Konformationszustand des Moleküls sind, konnten die nicht-allosterischen Bindungskonstanten, die über die normoxischen Bindungsisotherme bestimmt wurden, während der Auswertung der hypoxischen Bindungsisotherme konstant gesetzt werden, so dass für die Koffeinbindung an das Hämocyanin (*Homarus vulgaris*) eine Auswertung auch unter hypoxischen Bedingungen möglich war. Die bei den Temperaturen zwischen 15 und 30 °C bestimmten hypoxischen Bindungskonstanten (K_{hyp}^{eff}) wurden durch die Kombination der ausgewerteten Sauerstoffbindungsdaten und der berechneten Einflussfaktoren bestimmt. Wenn die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation bekannt war, so ließen sich mit Hilfe der berechneten Einflussfaktoren und den Formeln 2.18 – 2.20 die Bindungskonstante des Effektors der jeweiligen Konformation bestimmen. Die Regressionen der Bindungsisotherme bestätigten die angenommenen Konformationsverteilungen (siehe Abbildung 4.1 - 4.3) des Hämocyanins. Die Koffeinbindung konnte in einem Temperaturbereich von 10 bis 25 °C charakterisiert werden. Bei 10 °C war eine Auswertung der Daten in Zusammenhang mit den Einflussfaktoren nur unter der Annahme möglich, dass tR die dominierende Konformation unter hypoxischen Bedingungen sei. Bei 30 °C war die Affinität der Bindung sehr gering und die Einflussfaktoren unterlagen zudem großen Schwankungen, so dass die Koffeinbindung hier nur ungenau und nur für die unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformationen charakterisiert werden konnte. Im Falle der Uratbindung wurde angenommen, dass Urat unter hypoxischen Bedingungen zu einem bedeutenden Teil nur noch an den nicht-allosterischen Bindungsstellen gebunden hat, so dass die unter hypoxischen Bedingungen mit dem Non-Interacting-Site-Modell bestimmte

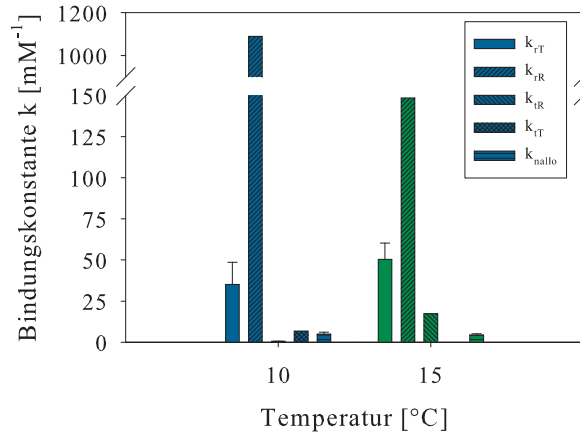


Abbildung 4.6: Darstellung der Uratbindungskonstanten k_{rT}^{Urat} , k_{tT}^{Urat} , k_{tR}^{Urat} und k_{rR}^{Urat} in mM^{-1} , die durch die Kombination von Sauerstoff- und thermodynamischen Bindungsdaten berechnet wurden bei 10 (blau) und 15°C (grün). ($X \pm SD$) Für Details siehe Text.

Bindungskonstante als nicht-allosterisch angenommen wurde und somit bei einer Auswertung mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell konstant gesetzt werden konnte. Unter diesen Annahmen war eine komplette Auswertung bei 10 und 15°C möglich. Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen die Effektorbindungskonstanten für Urat und Koffein unter Verwendung des Nested-MWC-Modells. Die Bindungskonstanten, die mit einer Standardabweichung versehen sind, wurden über eine Regression der jeweiligen Bindungsisotherme bestimmt, Bindungskonstanten ohne Standardabweichung wurden aus den Einflussfaktoren berechnet. Die Affinität der Bindung wird mit zunehmender Temperatur geringer. Vergleicht man diese mit Literaturdaten, so ergibt sich, dass sich die von Menze et al. (2005) bei pH 7,55 und 20°C bestimmten Bindungskonstanten mit $k_{rT}^{Koffein} = 361 \pm 48 \text{ mM}^{-1}$, $k_{tT}^{Koffein} = 1,3 \text{ mM}^{-1}$ und $k_{tR}^{Koffein} = 70 \text{ mM}^{-1}$ gut in die Temperaturreihe einfügen lassen. $k_{rR}^{Koffein}$ weicht hier mit 2960 mM^{-1} nach oben hin ab, da jedoch die über die Einflussfaktoren berechneten Bindungskonstanten zu starken Schwankungen neigen, harmonisieren die Daten gut. Unter hypoxischen Bedingungen binden die Liganden bei 10°C an die unter diesen Bedingungen dominierende Konformation tR. Durch die Temperaturerhöhung lagert sich das Molekül in die Konformation tT um, so dass die Effektoren an jene Konformation binden. Die sich daraus ergebenden Effektor-Bindungskonstanten für die jeweilige nicht-dominierende Konformation sind als unsicher zu betrachten, da sie nicht über eine Regression der thermodynamischen Bindungsdaten geprüft werden konnten. In Abhängigkeit von der Temperatur binden Urat und Koffein zwischen 10 und 20°C an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation rT. Durch den Einfluss der Temperatur lagert sich das Hämocyaninmolekül zunehmend um (siehe auch Kapitel 4.4.2), so dass im Temperaturbereich zwischen 20 und 30°C die Konformation rR dominiert und die Effektoren an diese Konformation binden. Menze et al. (2005) zeigten jedoch, dass bei einem pH-Wert von 7,55 bei 20°C die Konformation rT überwiegt. Der pH-Wert beeinflusst

somit die Konformationsverteilung des Hämocyanins.

4.3 Einfluss der Bindung von Xanthinderivaten auf die Sauerstoffbindung

Um die Uratbindungsstelle näher zu charakterisieren, wurden die Bindung der Methylxanthine Theobromin, Theophyllin, Paraxanthin, 7-Methylxanthin, 3-Methylxanthin und 1-Methylxanthin sowie von Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C untersucht. Es konnte bereits am Dohlenkrebs *Austropotamobius pallipes* gezeigt werden, dass auch Purinderivate wie Hypoxanthin und Adenin die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins beeinflussen können (Morris et al., 1986). Zeis et al. (1992) konnte am Hämocyanin des Europäischen Hummers zeigen, dass Purinanaloga wie Koffein, Theophyllin, Hypoxanthin, Trichlorpurin, Allopurinol, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin und Purin, Urat von seiner Bindungsstelle verdrängen können, Liganden wie Allantoin jedoch nicht. Die intakte Struktur des Puringerüsts schien daher bei der Bindung des Liganden essentiell zu sein. In dieser Arbeit wurden Xanthinderivate ausgewählt, die sich in ihrer Struktur durch die Position und die Anzahl an gebundenen Methylgruppen unterscheiden (siehe Abbildung 1.1), um die Effektorstrukturen zu charakterisieren, die neben dem Purinring für eine Bindung erforderlich sind.

Die Sauerstoffhalbsättigungswerte der Dimethylxanthine unterschieden sich signifikant zu denen der Methylxanthine. Der relative Einfluss auf die Sauerstoffbindung der einzelnen artifiziellen Effektoren wurde zwischen $\Delta\log P_{50}^{\text{Parax}} = 0,39$ und $\Delta\log P_{50}^{\text{TMH}} = 0,28$ bestimmt. Die verwendeten Xanthinderivate übten demnach alle einen höheren Einfluss auf die Sauerstoffbindung aus als der natürliche Modulator Urat ($\Delta\log P_{50}^{\text{Urat}} = 0,24$). Die Dimethylxanthine hoben sich dabei durch eine stärkere Beeinflussung der Sauerstoffbindung von den anderen Effektoren ab. Paraxanthin zeigte dabei den deutlich größten Einfluss auf die Sauerstoffaffinität. Innerhalb der Gruppe der Methylxanthine wurde die Sauerstoffaffinität durch 7-Methylxanthin mit einem $\Delta\log P_{50}^{7\text{M}} = 0,34$ am stärksten gesteigert. Die Methylgruppe an der Position 7 des Xanthingerüsts schien demnach die bedeutenste für eine verstärkte Steigerung der Sauerstoffaffinität zu sein. Paraxanthin beeinflusste zudem die Sauerstoffaffinität stärker als Koffein, das drei Methylgruppen besitzt. Isokoffein, das anstelle der Methylgruppe an Position 7 eine Methylgruppe an Position 9 besitzt, ist durch eine deutlich geringere Beeinflussung der Sauerstoffbindungsaffinität charakterisiert. Eine Auswertung der Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins *Homarus vulgaris* in Anwesenheit der genannten Xanthinderivate unter allosterischen Gesichtspunkten erfolgte wie in Kapitel 4.1 bereits für Koffein und Urat beschrieben mit dem Nested-MWC-Modell. Die Sauerstoffbindung konnte mit den in Tabelle 3.3 dargestellten Sauerstoffbindungskonstanten und den in Abbildung 3.6 und Tabelle 6.4 gezeigten Gleichgewichtskonstanten beschrieben werden. Die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Xanthinderivate zeigen

keinen signifikanten Unterschied. Die in Tabelle 6.5 dargestellten Einflussfaktoren sind alle in der gleichen Größenordnung. Die bestimmten Parameter ermöglichten es, die Konformationsverteilung nach der Effektorbindung zu berechnen und somit den Einfluss der Liganden auf die Konformationsverteilung zu beurteilen. Nach einer Bindung der Dimethylxanthine lagerte sich das mit Sauerstoff gesättigte Hämocyanin nicht um (zur Konformationsverteilung in Abwesenheit eines Effektors unter normoxischen Bedingungen siehe Abbildung 4.1 A). Im Falle der Methylxanthine ergab die Bindung des 7-Methylxanthins ebenfalls keinen Einfluss auf die Konformationsverteilung des Hämocyanins unter normoxischen Bedingungen. Die Bindung von Isokoffein, 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin und 1,3,7-Trimethylharnsäure ermöglichte eine Umlagerung in die Konformation rT. Die Auswertung der Konformationsverteilungen basierend auf dem Nested-MWC-Modell nach Bindung der unterschiedlichen Xanthinderivate bestätigt die schon für die Halbsättigungswerte aufgezeigte Hypothese des Zusammenhangs der unterschiedlichen Positionen der Methylgruppen zur Beeinflussung der Sauerstoffbindung. Die Affinität der Sauerstoffbindung scheint unter anderem durch eine, durch die Dimethylxanthine und 7-Methylxanthin im Gegensatz zu Urat nicht hervorgerufene Konformationsumlagerung, begünstigt zu werden. Somit konnte eine Auswertung der Daten unter allosterischen Gesichtspunkten die unterschiedliche Auswirkung der Xanthinderivate auf die Sauerstoffaffinität bekräftigen. Untersuchungen der Bindungseigenschaften der Xanthinderivate an das Hämocyanin des Europäischen Hummers sollten diesen Aspekt weiter erschließen.

4.4 Charakterisierung der Uratbindungsstelle

4.4.1 Bindung von Xanthinderivaten

Die Bindung der in Kapitel 4.3 beschriebenen Xanthinderivate wurde thermodynamisch mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Da Zeis (1994) bereits Verdrängungsexperimente mit verschiedenen Uratanaloga vorgenommen hat und so als Grundstruktur ein 6-Mono-Oxopurin bestimmen konnte, wurden in dieser Arbeit Xanthinderivate als Effektoren verwendet, um sowohl die stärker erhöhte Bindungsaffinität des Koffeins im Vergleich zum Urat zu klären als auch um die räumliche Struktur der Liganden in und zu der Bindungsstelle zu untersuchen. Die Bindungsisotherme der Xanthinderivate wurde nach der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Methode ausgewertet.

Im Falle der Dimethylxanthine konnten die Bindungskonstanten der unter normoxischen Bedingungen dominierenden Konformation als auch die der nicht-allosterischen Bindungsstellen zwischen 10 und 30°C bestimmt werden (siehe Tabelle 3.16). Die Abbildungen 4.7 A – C zeigen diese unter Berücksichtigung der allosterischen Konformationsverteilung im Temperaturspektrum. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Affinität der Dimethylxanthine mit zunehmender Temperatur abnimmt. Da bei einer Temperatur von 20°C Bindungsisotherme der Dimethylxanthine auch unter hypoxischen Bedingungen

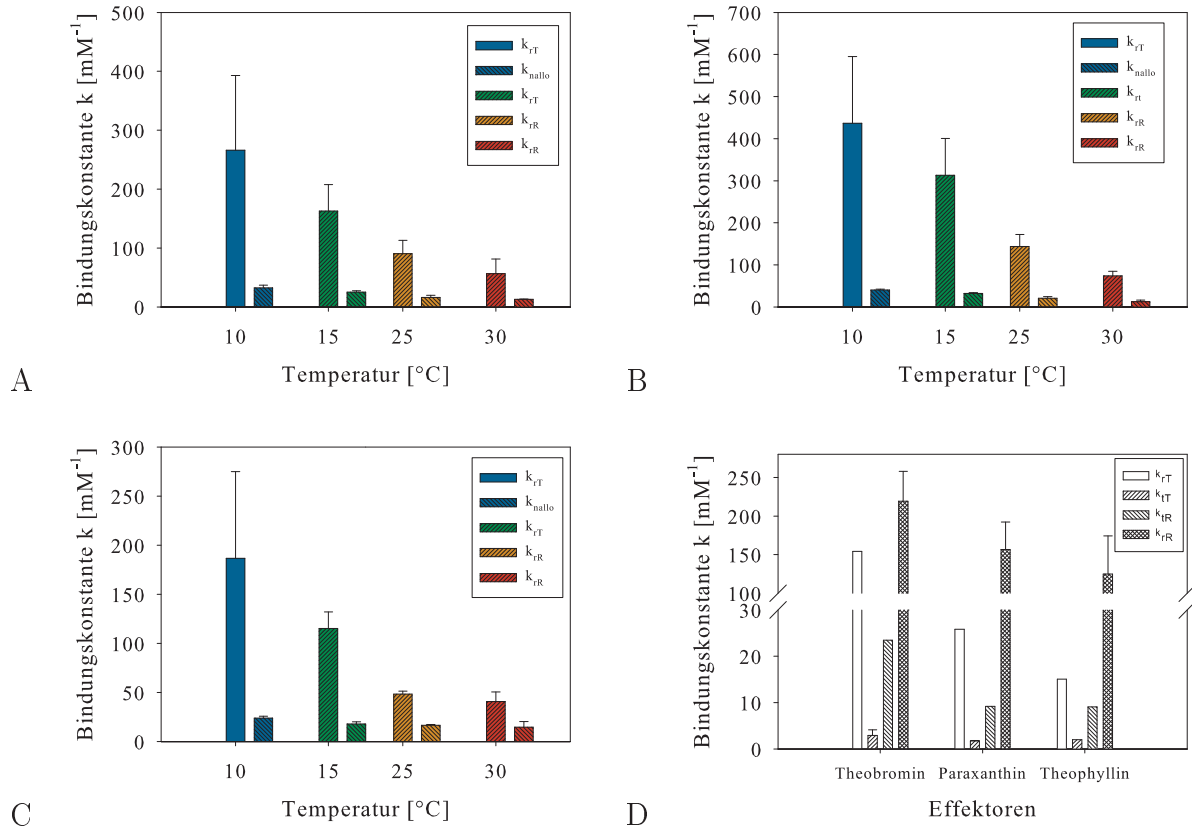


Abbildung 4.7: Darstellung der Bindungskonstanten k_{rT}^{eff} , k_{nallo}^{eff} und k_{rR}^{eff} in mM^{-1} der Xanthinderivate A: Paraxanthin, B: Theobromin und C: Theophyllin bei Temperaturen zwischen 10 und 30°C sowie D: k_{rT}^{eff} , k_{tT}^{eff} , k_{rR}^{eff} und k_{tR}^{eff} in mM^{-1} bei 20°C , die durch die Kombination von Sauerstoff- und thermodynamischen Bindungsdaten berechnet wurden. 10°C (blau), 15°C (grün), 25°C (orange) und 30°C (rot). ($X \pm SD$)

aufgenommen wurden, konnte bei dieser Temperatur eine vollständige Auswertung unter den allosterischen Modellvorstellungen durchgeführt werden (siehe Abbildung 4.7 D). Die bestimmten Bindungskonstanten lassen sich ebenfalls in die abnehmende Affinität einfügen. Die Bindung der Dimethylxanthine bei 10 und 30°C konnte nur über die Bindung an die jeweils dominierende Konformation und die nicht-allosterischen Bindungsstellen charakterisiert werden (siehe Abbildung 4.1). Konformation rR ist unter normoxischen Bedingungen bei 20°C zu über 60% vorhanden, so dass die Effektoren vermehrt an jene Konformation binden. Theobromin zeigt über das gesamte Temperaturspektrum die höchste Bindungsaffinität an das Hämocyanin des Europäischen Hummers. Die Höhe der Affinität geht also nicht mit der Beeinflussung der Sauerstoffaffinität einher, da Paraxanthin den stärksten Einfluss mit $\Delta \log P_{50}^{\text{Parax}} = 0,39$ hatte. Sowohl Theobromin als auch Paraxanthin besitzen eine Methylgruppe an der Position 7 des Xanthingerüsts. Theophyllin dagegen, mit Methylgruppen an der Position 1 und 3, zeigt das deutlich schwächste Bindungsverhalten. Theobromin, das die Position 3 und 7 des Puringerüsts mit Methylgruppen besetzt hat, wird bei einem pH-Wert von 8 vermutlich nicht ionisieren, da bei einer Ionisierung zunächst an der Position 3 und anschließend an Position 7 deprotoniert

wird (Lister, 1966; Elguero et al., 1976). Es liegt somit nahe, dass eine Ionisierung des Liganden die Bindung erschwert.

Die nicht-allosterischen Bindungskonstanten nehmen nur geringfügig mit steigender Temperatur ab. Bezieht man die Methylxanthine, Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure in die Betrachtung mit ein (siehe Tabelle 3.18), so bestätigt die hohe Bindungskonstante des 7-Methylxanthins mit $k_{rR}^{7M} = 150,67 \pm 7,51 \text{ mM}^{-1}$ die Annahme, die Methylgruppe an Position 7 begünstige die Bindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers. Isokoffein zeigt zudem ein deutlich schwächeres Bindungsverhalten als Koffein, was auf die veränderte Position der Methylgruppe (Position 9 anstelle von 7) zurückgeführt werden kann. Weiterhin bindet 1,3,7-Trimethylharnsäure stärker an das Hämocyanin als der Modulator Urat. Methylgruppen am Xanthingerüst scheinen demnach die Bindung an das Hämocyanin (*Homarus vulgaris*) zu begünstigen, was den Schluss zulässt, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität die Bindung an das Hämocyaninmolekül begünstigt. Urat, dessen Purinring nicht methyliert ist, zeigt daher die geringste Bindungsaffinität.

Da die nicht-allosterische Bindungskonstante k_{nallo} des Isokoffeins mit $53,33 \pm 4,39 \text{ mM}^{-1}$ höher ist als die nicht-allosterischen Bindungskonstanten der anderen Xanthinderivate, könnte die Methylgruppe an der Position 9 die Bindungsaffinität an die nicht-allosterischen Bindungsplätze erhöhen. Die Oxy-Gruppe an der Position 8 des Xanthingerüsts, bzw. deren Ionisierung, scheint die Bindung zu behindern, da sich Urat als auch die 1,3,7-Trimethylharnsäure durch eine geringe Bindungsaffinität charakterisieren lassen. 1,3,7-Trimethylharnsäure hat eine geringere Affinität als Koffein an die unter normoxischen Bedingungen bei 20°C dominierende Konformation, was auf die Oxy-Gruppe an Position 8 zurückgeführt werden kann. Somit erschwert die Ionisierungsmöglichkeit an den Positionen 7 – 9 die Bindung. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von Koffein und Urat kann somit auf die erhöhte Hydrophobizität und die damit einhergehende nicht mögliche Ionisierung erklärt werden. Weitere Einblicke in das Bindungsverhalten der Xanthinderivate und des natürlichen Modulators kann eine thermodynamische Analyse der Bindungsdaten liefern.

4.4.2 Thermodynamische Analyse der Effektorbindung

Die freie Gibbs'sche Energie ΔG^0 (freie Reaktionsenthalpie) ist der bedeutendste thermodynamische Parameter, der die Lage des Gleichgewichts für eine Reaktion bestimmt (siehe Formel 1.1). ΔG^0 reagiert jedoch sehr unempfindlich auf Veränderungen im molekularen Umfeld eines Moleküls, da ΔH^0 und ΔS^0 die Tendenz haben, sich zu kompensieren und ΔG^0 sich aus Anteilen der Enthalpie und Entropie zusammensetzt (Lumry und Rajender, 1970). Es sind zahlreiche einfache Beispiele für diese Beobachtung bekannt (Bolen et al., 2001; Eftink et al., 1983; Cooper et al., 2001; Baxa et al., 2001). McPhail und Cooper (1997) zeigten dies unter anderem am Beispiel einer durch einen Liganden induzierten Assoziation von Vancomycin. Es gibt zahlreiche Arten von thermodynamischen Beiträgen

während einer Protein-Liganden-Interaktion. Einige sollen vor dem Hintergrund der Urat- bzw. Xanthinderivatbindung an das Hämocyaninmolekül diskutiert werden. Menze (2001) beschrieb die Bindung des Urats an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C mit $T\Delta S_{\text{Urat}}^0 = -112 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{\text{Urat}}^0 = -135,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ als enthalpiegetrieben. Die freie Reaktionsenthalpie der Bindung wurde von Menze (2001) mit $\Delta G_{\text{Urat}}^0 = -22,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt. Spätere Studien mit dem hier angewandten erweiterten Bindungsmodell (Menze et al., 2005) ergaben für die unter normoxischen Bedingungen dominierende Bindungsstelle ein $T\Delta S_{rT\text{Urat}}^0 = -27,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{\text{Urat}}^0 = -53,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei einem pH-Wert von 7,55 und eine daraus resultierende freie Reaktionsenthalpie $\Delta G_{rT\text{Urat}}^0 = -24,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. In dieser Arbeit konnte für die Bindung des Urats an die unter normoxischen Bedingungen bei 10°C dominierende Konformation ein $T\Delta S_{\text{Urat}}^0(10^\circ\text{C}) = -56,75$, $\Delta H_{\text{Urat}}^0(10^\circ\text{C}) = -65,78$ und $\Delta G_{rT\text{Urat}}^0(10^\circ\text{C}) = -25,79 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden. Es ergibt sich somit, dass die Bindung enthalpiegetrieben ist, da die Bindung trotz des ungünstigen Entropiebeitrags durch den negativeren Betrag der Reaktionsenthalpie ΔH^0 begünstigt ist. Durch die Betrachtungen der Koffeinbindung an das Hämocyanin (siehe Kapitel 3.3.1), ist zu erkennen, dass die freie Reaktionsenthalpie ΔG^0 mit zunehmender Temperatur eine Tendenz aufzeigt abzunehmen. Die hier bestimmte freie Reaktionsenthalpie stimmt somit gut mit der von Menze et al. (2005) bestimmten freien Enthalpie der Uratbindung überein. In Abbildung 4.8 A ist die Entropie-Enthalpie-Kompensation der Koffein- und Uratbindung dargestellt. Die Enthalpie und Entropie der Bindung an die unter normoxischen Bedingungen bei der jeweiligen Temperatur dominierende Konformation liegt in einem niedrigeren Energiebereich als die Bindung an die nicht-allosterische Bindungsstelle. Die Bindung wird zudem mit steigender Temperatur zunehmend exothermer. Hierdurch wird die Bindung jedoch nicht begünstigt, da der entropische Beitrag vom Betrag her stärker ansteigt als der enthalpische Beitrag und somit die Bindungsaffinität reduziert wird. Der bei 22,5°C gemessene Wert weicht als einziger mit einer größeren Bindungsenthalpie als der Bindung bei 25°C von der Temperaturreihe ab und ist als Ausreißer zu betrachten.

Die Bindungsenergien der nicht-allosterischen Bindungsstelle verhalten sich entgegengesetzt. Mit fallender Temperatur wird die Bindung zunehmend exothermer. Allerdings lassen die Werte eine weitaus geringere Abhängigkeit von der Temperatur erkennen als dies für die allosterische Bindungsstelle bestimmt wurde. Die Bindungsenergien der beiden Bindungsplatztypen der Uratbindung sind zwar in einem niedrigeren Energieniveau angesiedelt, weisen jedoch die gleichen entgegengesetzten Charakteristiken in Abhängigkeit von der Temperatur auf. Dies mag als Bestätigung für das angewendete Two-Sets-of-Sites-Modell gewertet werden, da die Auswertung mit dem Non-Interacting-Site-Modell genau gegenläufige Bindungsenergien der beiden Liganden ermittelte (siehe Tabelle 3.10 und 3.11), dies jedoch auf Grund der gleichen Bindungsplätze der beiden Liganden als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Die Entropie-Enthalpie-Kompensation der Dimethylxanthine liegt mit dem jeweiligen

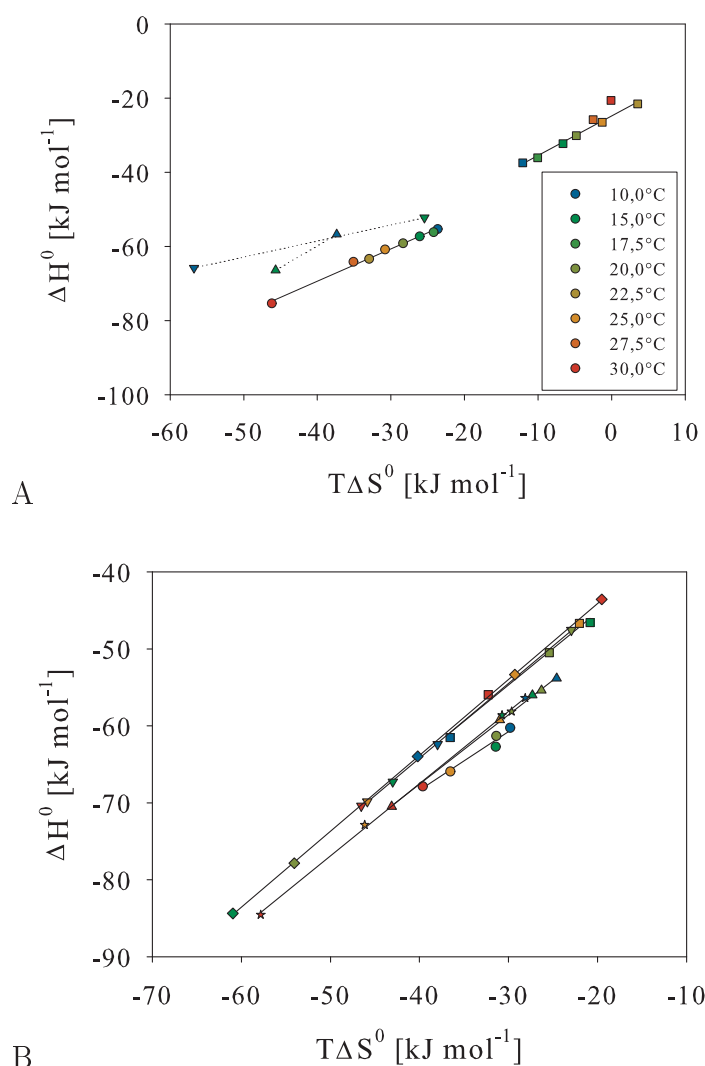


Abbildung 4.8: Entropie-Enthalpie-Kompensation der A: Koffein- (Bindung an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation ($\circ$); Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen ($\square$)) und Uratbindung (Bindung an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation (∇); Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen ($\triangle$)) und B: Theobromin- (Bindung an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation ($\circ$); Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen ($\square$)), Paraxanthin (Bindung an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation ($\star$); Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen ($\diamond$)) und Theophyllinbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*). – Lineare Regression

Bindungsplatztyp im gleichen Energiebereich wie die Bindung des Koffeins. Das Energieniveau der nicht-allosterischen Uratbindung weicht jedoch von den Energiebereichen der anderen Effektoren ab. Dies ist mit der geringen Bindungsaffinität und der damit einhergehenden fehlerbehafteten Berechnung der Bindungsparameter der nicht-allosterischen Bindungsplätze des Urats zu erklären. Die hier aufgezeigte Entropie-Enthalpie-Kompensation in Abhängigkeit von der Temperatur ist eine einfache thermodynamische Konsequenz aus den deutlichen Temperaturabhängigkeit von ΔH^0 und ΔS^0 (siehe Abbildungen 3.15 und 3.16 und Tabellen 3.14 und 3.16). Bereits McPhail und Cooper (1997) konnten zeigen, dass

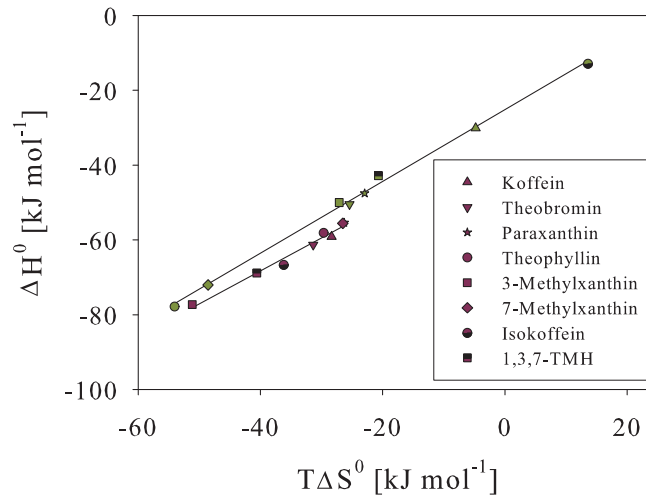


Abbildung 4.9: Entropie-Enthalpie-Kompensation der Bindung von Koffein, Theobromin, Paraxanthin, Theophyllin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Isokoffein und 1,3,7-Trimethylharnsäure an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation (violett) und an die nicht-allosterischen Bindungsstellen (grün). – Lineare Regression

eine Änderung der Wärmekapazität zu einer Entropie-Enthalpie-Kompensation führt.

Abbildung 4.9 zeigt die Entropie-Enthalpie-Kompensation der Bindung der Xanthinderivate an Hämocyanin. Auch hier sind die verschiedenen Energieniveaus der unterschiedlichen Bindungsplatztypen deutlich zu erkennen. Die Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsplätze liegt in einem höheren Energiebereich als die Bindung an die allosterischen und unter normoxischen Bedingungen dominierenden Bindungsplätze. Zudem ist eine lineare Abhängigkeit bei beiden Bindungsplatztypen bei allen Temperaturen und Xanthinderivaten zu erkennen.

Die Bindung der Xanthinderivate an das Hämocyanin ist enthalpiegetrieben. Die Entropie wurde nur für $T\Delta S_{nallo,Koffein}^0$ (22,5 °C) > 0 bestimmt. Vergleicht man die Bindung des Urats und des Koffeins miteinander, so zeigt sich, dass sich für die Bindung des Urats an die allosterischen Bindungsplätze unter normoxischen Bedingungen ungünstigere Änderungen in der Entropie ergeben ($T\Delta S_{oxy,Koffein}^0$ (10°C) = -23,63 kJ mol $^{-1}$, $T\Delta S_{oxy,Urat}^0$ (10°C) = -56,75 kJ mol $^{-1}$), wohingegen die den Bindungsprozess initiiierenden Enthalpieänderungen günstiger für die Bindung des Urats bestimmt werden konnten. ($\Delta H_{oxy,Koffein}^0$ (10°C) = -55,31 $\pm$ 0,12 kJ mol $^{-1}$, $\Delta H_{oxy,Urat}^0$ (10°C) = -65,78 $\pm$ 4,94 kJ mol $^{-1}$). Die Uratbindung ist somit bei dieser Temperatur zu einem stärkeren Ausmaß entropiekompensiert als die Bindung des Koffeins. Es findet vermutlich während der Bindung des hydrophoberen, ungeladenen Koffeins eine hydrophobe Interaktion statt, die eine erhöhte Entropie nach sich zieht (Sturtevant, 1977; Calderone und Williams, 2001). Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer vermehrten Freisetzung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche, was den entropischen Beitrag zu der Bindung des Koffeins erhöht. Urat hingegen bildet durch seine Ladung zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen in der wässrigen Lösung. Die Freisetzung

an Wasser und die damit einhergehende Erhöhung der Entropie ist somit geringer als die des Koffeins (Cooper, 2005). Es ergibt sich somit für Koffein mit $\Delta G_{oxy,Koffein}^0(10^\circ\text{C}) = -31,68 \pm 0,05 \text{ kJ mol}^{-1}$ eine günstigere freie Reaktionsenthalpie als für die Bindung des Urats $\Delta G_{oxy,Urat}^0(10^\circ\text{C}) = -25,51 \pm 1,00 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Bindung des Modulators Urat an die unter hypoxischen Bedingungen dominierende Konformation erweist sich mit einem $T\Delta S_{hypUrat}^0(10^\circ\text{C})$ von $-4,33 \text{ kJ mol}^{-1}$ als entropiegetrieben ($T\Delta S_{hypKoffein}^0(10^\circ\text{C}) = -51,37 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die freie Energie der Bindung verringert sich jedoch mit $\Delta G_{oxy,Urat}^0(10^\circ\text{C}) = -9,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ deutlich und deutet somit auf die verringerte Affinität zu der Bindungstasche hin.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, geht die Bindung der Liganden an das Hämocyanin unter hypoxischen Bedingungen vermutlich mit einer Konformationsänderung einher und die so initiierte Makromolekülmagerung führt sowohl zu einer Freisetzung von Wassermolekülen als auch zu einer weniger dichten Molekülstruktur und einer damit einhergehenden Erhöhung von Freiheitsgraden des Moleküls, was für die Bindung des Urats einen höheren entropischen Beitrag hervorruft (Eftink und Biltonen, 1980; Griko und Remeta, 1999; Sarkhel und Desiraju, 2004). Die Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsstellen ist für Urat und Koffein entropisch günstiger ($T\Delta S_{nallo,Urat}^0(10^\circ\text{C}) = -37,34 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{nallo,Koffein}^0(10^\circ\text{C}) = -12,09 \text{ kJ mol}^{-1}$). Der hydrophobe Effekt des Koffeins kommt hier somit stärker zum tragen. Die Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsplätze führt zum einem zu einer verstärkten Wasserfreisetzung und zum anderen zu einer Erhöhung der Freiheitsgrade des Moleküls.

Weiteren Aufschluss über die thermodynamischen Bindungseigenschaften der Effektorbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers kann eine Betrachtung der Wärmekapazität der Bindung liefern. In Tabelle 4.2 sind die Änderungen der Wärmekapazitäten der Bindung von Urat, Koffein, Paraxanthin, Theophyllin und Theobromin zu finden. Die Wärmekapazität der Dimethylxanthine und des Koffeins ist temperaturabhängig; in niedrigen Temperaturbereichen wird eine geringe Änderung und mit zunehmender Temperatur eine negative Änderung der Wärmekapazität beobachtet. Die Wärmekapazität für Urat konnte nur aus zwei Messpunkten berechnet werden, so dass hier von einer geschätzten Angabe ausgegangen werden muss, die allerdings auch schon bei den geringen Temperaturen von 10 bis 15°C mit $\Delta C_{p(oxy,Urat)} \approx -2,27 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ negativ ist. Negative Änderungen der Wärmekapazität wurden in wässrigen Systemen schon mehrfach gemessen z. B. von Spolar und M. T. Record (1994) sowie Gupta et al. (2006) und sind für Ligand-Makromolekül-Interaktionen charakteristisch (Sturtevant, 1977; Eftink und Biltonen, 1980). Clarke et al. (2001) konnten für die Interaktion von Trisacchariden mit dem Lectin Concanavilin-A Wärmekapazitäten von $-0,46$ und $-0,39 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ aufzeigen. Eine Erklärung für negative Wärmekapazitätsänderungen ist die Überführung des Liganden aus dem Wasser in die Bindungstasche (Wadsö, 1972). Demnach müsste die Überführung stark hydrophober Liganden aus einem wässrigen Medium in die Bindungs-

Tabelle 4.2: Wärmekapazität der Bindung von Urat und Koffein, sowie der verwendeten Dimethylxanthine in $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$

Effektor	$\Delta C_{p(oxy)} [\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}]$
	10 – 30°C
Urat	$\approx -2,27$
Koffein	0,48 – -2,10
Paraxanthin	0,71 – -2,13
Theobromin	-0,12 – -0,66
Theophyllin	0,61 – -3,42

tasche zu einer negative Wärmekapazität führen. Studien wie die von Clarke et al. (2001) zeigen jedoch, wie schwierig die Analyse solch einer Protein-Ligand-Interaktion ist, da in jener Studie eine Erhöhung des Kohlenstoffanteils eines Moleküls nicht zu der erwarteten Erniedrigung der Wärmekapazität führte (Cooper, 2005).

Die hier verwendeten Purinderivate sind in Wasser löslich und unlöslich in den meisten unpolare Lösungsmitteln. Von daher kann der Beitrag an der negativen Wärmekapazität durch die Hydrophobizität des Effektors schwer beurteilt werden (Elguero et al., 1976; Eftink und Biltonen, 1980; Cooper, 2005). Je höher der Anteil an Methyl-Gruppen im Effektormolekül, desto negativer wäre die erwartete Wärmekapazität bei der Überführung in die Bindungstasche des Hämocyanins. Theophyllin zeigt jedoch eine deutlich negativere Wärmekapazität als das vermeintlich hydrophobere Koffein. Zudem ist die Wärmekapazität des Oxopurins Urat ebenfalls stark negativ. Es muss somit noch eine andere Erklärung für die negative Wärmekapazität bei der Ligandenbindung geben.

Negative Wärmekapazitäten können auch durch Konformationsänderungen erklärt werden, die durch die Temperatur sowie durch den Liganden induziert werden können. Geht man davon aus, dass das Molekül unter normoxischen Bedingungen in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann (siehe Kapitel 4.1) und die Umlagerung bei einer bestimmten Temperatur (T_c) erfolgt, so kann dies in einer negative Wärmekapazität resultieren. Dies spiegelt sich am deutlichsten in der Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität wieder (Privalov und Privalov, 2000).

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten ist nun eine weitere Charakterisierung der Uratbindungsstelle möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Xanthinderivate alle an das Hämocyanin des Europäischen Hummers binden und dass eine erhöhte Hydrophobizität die Bindung der artifiziellen Effektoren an das Hämocyanin im Gegensatz zu dem natürlichen Modulator Urat erhöht. Dies steht im Einklang mit der von Zeis (1994) aufgestellten Hypothese, dass unpolare Wechselwirkungen des Effektors mit dem Hämocyaninmolekül die Bindung begünstigen, denn je besser die Ionisierungsmöglichkeit des Moleküls und die damit einhergehende Ladung des Effektors ist, desto geringer ist die Bindungsaffinität zur Bindungstasche. Die hydrophobe allosterische Bindungstasche könnte somit mit einem aromatischen Rest von einem Phenylalanin, Tyro-

sin oder Tryptophan bestückt sein und diese eine unpolare Wechselwirkung über eine π -Komplexbildung eingehen. Da jedoch ein 6-Oxopurin für die Bindung erforderlich ist, müssen auch polare Wechselwirkungen bei der Bindung eine Rolle spielen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte, da alle hier verwendeten Xanthinderivate und damit 2,6-Oxopurine affiner an die Bindungsstellen binden als das von Zeis (1994) verwendete Hypoxanthin. Die Formierung von Wasserstoffbrückenbindungen geht immer mit einem Verlust an Entropie einher und erklärt somit den ungünstigen Entropieanteil der Bindung.

4.5 Allosterische Modellvorstellungen

Die hier dargestellten Ergebnisse und Auswertungen lassen auf ein komplexes allosterisches Bindungsverhalten des Sauerstoffs und des Effektors Urat an das Hämocyanin des Europäischen Hummers schließen. Nach dem angewendeten Nested-MWC-Modell kann Hämocyanin in verschiedenen allosterischen Konformationen vorliegen (rT, tR, tT, rR). Die Verteilung der Konformationen in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung sowie der Temperatur konnte über die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven bestimmt werden. Durch die kalorimetrischen Bindungsstudien konnte die Bindung des Urats an das Hämocyanin über vier Bindungsplätze, zwei allosterische und zwei nicht-allosterische, charakterisiert werden. Die Bindung an die allosterischen Bindungsplätze kann mit einer Konformationsänderung einhergehen.

Abbildung 4.10 zeigt ein aus den Ergebnissen dieser Arbeit gewonnenes allosterisches Bindungsmodell des Urats an das Hämocyanin des Europäischen Hummers in Abhängigkeit von der Temperatur. Auf dem Nested-MWC-Modell basierend wurde in vorhergehenden Kapiteln bereits dargestellt, dass das Hämocyanin mit zunehmender Temperatur eine Konformationsänderung durchläuft. Zudem scheint die Bindung des Urats bei bestimmten Temperaturen ebenfalls eine Konformationsänderung hervorzurufen. Diese konnte jedoch in dem hier für die kalorimetrischen Kurven verwendeten Modell nicht berücksichtigt werden, spiegelt sich jedoch in der Annahme zweier allosterischer Bindungsstellen wieder. Urat bindet bei geringer Temperatur und geringer Sauerstoffkonzentration zunächst an die Konformation tR. Die Bindung des Urats führt zu einer Konformationsänderung von ca. 1/3 der Hämocyaninmoleküle zur Konformation tT. Bei hohen Temperaturen ist der Anteil der unter Hypoxie durch die Uratbindung umgelagerten Moleküle deutlich geringer. Die Affinität des Sauerstoffs ist bei 10°C für die Konformation tT höher, so dass Urat die Bindung des Sauerstoffs erleichtert. Unter normoxischen Bedingungen hat die Bindung des Urats bei geringen Temperaturen keinen Einfluss auf die Konformationsverteilung. Erhöht sich die Temperatur, so erfolgt eine durch die Temperatur induzierte Konformationsumlagerung von Konformation rT zu Konformation rR. Die Bindung des Urats induziert auch schon bei moderaten Sauerstoffkonzentrationen eine erneute Konfor-

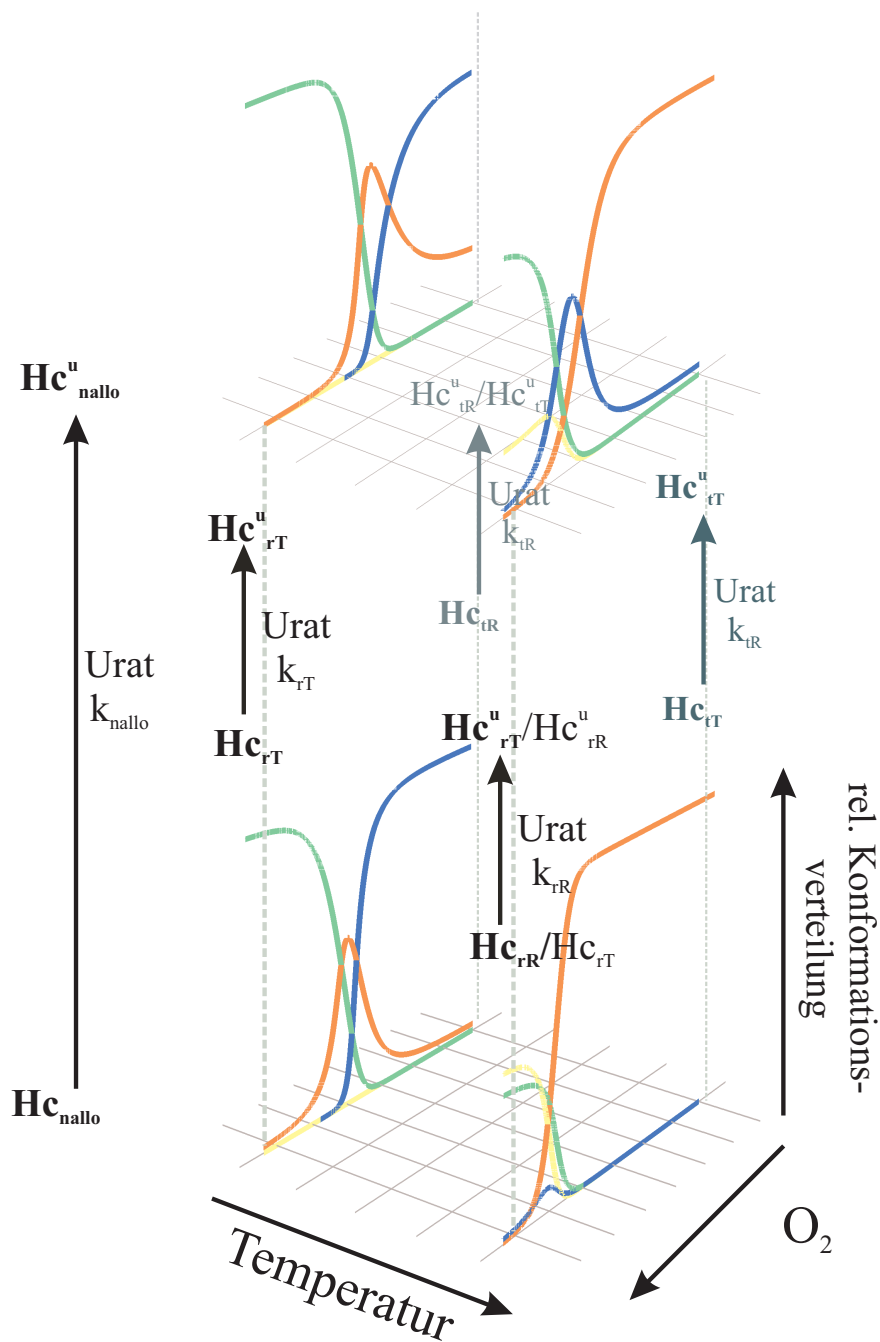


Abbildung 4.10: Allosterisches Modell des Bindungsverhaltens des Urats als auch der weiteren hier verwendeten Xanthinderivate an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*). Auftragung der relativen Konformationsverteilung bei 10 und 30 °C in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in An- und Abwesenheit des Modulators. $Hc_{\alpha\beta}$: Hämocyanin in der Konformation $\alpha\beta$ ohne gebundenen Modulator; $Hc_{\alpha\beta}^u$: Hämocyanin in der Konformation $\alpha\beta$ mit gebundenem Urat bzw. anderem Xanthinderivat; Hc_{nallo} : nicht-allosterische Bindungsplätze des Hämocyanins; Hc_{nallo}^u : mit dem Modulator Urat besetzte nicht-allosterische Bindungsplätze; $k_{\alpha\beta}$: Bindungskonstante des Urats an die entsprechende Konformation $\alpha\beta$. $\alpha\beta$ stellt die jeweilige Konformation rT (grün), tT (rot), tR (blau) und rR (gelb) des Hämocyanins dar, an die der Effektor bindet. Für Details siehe Text.

mationsänderung zur Konformation rT. Sauerstoff bindet bei Temperaturen zwischen 10 und 25°C mit einer höheren Affinität an die Konformation rT. Da bei höheren Temperaturen die Sauerstoffbindungskapazität des Hämocyanins deutlich reduziert ist, ermöglicht Urat eine verbesserte Sauerstoffaufnahme.

Die Sauerstoffaffinitätserhöhung durch den Effektor Urat nimmt mit zunehmender Temperatur ab, die des Effektors Koffein jedoch zu. Zusätzlich zeigte sich, dass sich die Bindungsaffinität des Sauerstoffs an die Konformation rT mit zunehmender Temperatur deutlich verringerte und bei 30°C sogar Konformation rR eine höhere Affinität zugewiesen werden konnte. Koffein ermöglicht im Gegensatz zu Urat durch die Bindung keine Konformationsumlagerung zu der Konformation rT. Urat fungiert daher nur in den physiologischen Bereichen von zwei bis ca. 25°C als effektiver Modulator der Sauerstoffbindungsaffinität.

4.6 Physiologische Betrachtungen

Dekapode Hummer leben in ihrem natürlichen Habitat in Wassertemperaturen von ca. zwei bis 25°C auf Grund von jahreszeitlich bedingten Schwankungen. Experimente mit an bestimmte Temperaturen und Sauerstoffkonzentrationen akklimatisierten Tieren, zeigten, dass Hummer in einem Temperaturbereich von 0 bis 30°C überleben können und plötzliche Temperaturänderungen von +16 und -21°C tolerieren (McLeese, 1959; Aiken, 1980; van Olst et al., 1980). Es gibt zahlreiche Anpassungen der Crustaceen an eine veränderte Umgebungstemperatur. So führt eine erhöhte Umgebungstemperatur zu einem erniedrigten Hämolymphe-pH-Wert (Truchot, 1971). Decker und Föll (2000) zeigten eine Änderung der Hämocyaninzusammensetzung sowohl auf Ebene der Hexamere als auch der Di-Hexamere bei *Astacus leptodactylus* nach Adaption an verschiedene Temperaturen. In dieser Arbeit wurde die Anpassung des Hämocyanins des Europäischen Hummers an unterschiedliche Temperaturen und Sauerstoffkonzentrationen unter allosterischen Modellvorstellungen beschrieben.

Urat akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen in der Hämolymphe dekapoder Crustaceen (Lallier et al., 1987; Lallier und Truchot, 1989) und ist ein Abbauprodukt des Purinstoffwechsels. Unter normoxischen Bedingungen wird es durch die Uricase zu Allantoin oxidiert und weiter über Allantoinsäure und Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut (Claybrook, 1983). Da die Uricase jedoch Sauerstoff als Co-Substrat benötigt (Dyken, 1991), akkumuliert Urat unter Sauerstoffmangel (Czytrich, 1990; Lallier et al., 1987). Während einer biotopbedingten Hypoxie konnten für den Flusskrebs *Astacus leptodactylus* Uratkonzentrationen von 369 μM nach acht Stunden und von ca. 400 μM nach 20 Stunden gemessen werden. Es scheint jedoch eine Grundkonzentration von 106 μM im Tier vorzuliegen (van de Meer, 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden für *Carcinus maenas* beschrieben. Hier wurden Grundkonzentrationen von 79 μM und

nach einer 12 stündigen Inkubation eine Erhöhung auf $113 \mu\text{M}$ gemessen (Lallier et al., 1987). Im Falle des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) konnte Zeis (1994) nach einer vierstündigen hypoxischen Inkubation Uratkonzentrationen von $80 \mu\text{M}$ aufzeigen, während unter normoxischen Bedingungen Uratkonzentrationen von ca. $20 \mu\text{M}$ gemessen wurden (Zeis, 1994). Nach erhöhter muskulärer Aktivität konnte van de Meer (2004) weder eine signifikante Erhöhung der Konzentration von Adenosin noch von dessen Abbauprodukten Inosin und Urat im Flusskrebs *Astacus leptodactylus* messen. Ähnliche Ergebnisse erzielten Lallier und Walsh (1990) nach einer 30 minütigen Schwimmphase der Krabbe *Callinectes sapidus*.

Da Urat unter funktionsbedingter Hypoxie bei den hier aufgeführten Crustaceen nicht akkumuliert, ist es wahrscheinlich, dass auch beim Europäischen Hummer keine Akkumulation des Urats während einer erhöhten muskulären Aktivität stattfindet. Somit könnten die Grundkonzentration des Urats einen ausreichenden Einfluss auf die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) haben.

Simulationen basierend auf den aus den kalorimetrischen und den Sauerstoffbindungsdaten gewonnenen Ergebnissen im Bezug auf physiologische Bedingungen der Sauerstoff- als auch Uratkonzentration der Hämolymphe des Hummers, könnten das Verständnis für die Funktion des Urats im Tier im Bezug auf die saisonalbedingten Temperaturschwankungen im Habitat erhöhen. Es konnten jedoch keine Bindungsparameter für die Bindung des Urats an das Hämocyanin bei 30°C mit dem Two-Sets-of-Sites-Modell bestimmt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Urat an das Hämocyanin bindet, da mit dem One-Set-of-Site-Modell eine Auswertung unter der Bestimmung einer geringen Bindungskonstante möglich war und nach einer Sättigung des Hämocyanins mit Urat eine Änderung der Sauerstoffbindungsaffinität verzeichnet werden konnte. Da für 10°C Bindungsparameter bestimmt werden konnten und dort der relative Zusammenhang der Bindungskurven begutachtet werden kann, wurden die Bindungskurven basierend auf hypothetischen Uratbindungsdaten bei 30°C und eine Uratkonzentration von $20 \mu\text{M}$ (Zeis, 1994) simuliert.

Unter normoxischen Bedingungen beträgt der Sauerstoffpartialdruck der Hämolymphe des Europäischen Hummers vor der Kiemenpassage 21 Torr und nach den Kiemen 50 Torr (Butler et al., 1978; McMahon et al., 1978). In Abbildung 4.11 A sind Sauerstoffbindungskurven bei 10 , 25 und 30°C in Anwesenheit von 0 , $0,02$ (Normoxie) und $0,40 \text{ mM}$ (Hypoxie) Urat aufgetragen. Unter normoxischen Bedingung ist eine Grundkonzentration von $20 \mu\text{M}$ Urat in der Hämolymphe bestimmt worden (Zeis, 1994). Es kommt somit unter normoxischen Bedingungen bei 10°C zu einer maximalen Entladung des Hämocyanins von 4% , unter physiologischen Bedingungen mit einer Grundkonzentration von ca. $0,020 \text{ mM}$ Urat sogar nur von 2% . Bei tiefen Temperaturen dient Hämocyanin unter Normoxie somit vermutlich nicht als Sauerstofftransporter, wie auch schon Menze et al. (2005) für 20°C berechneten.

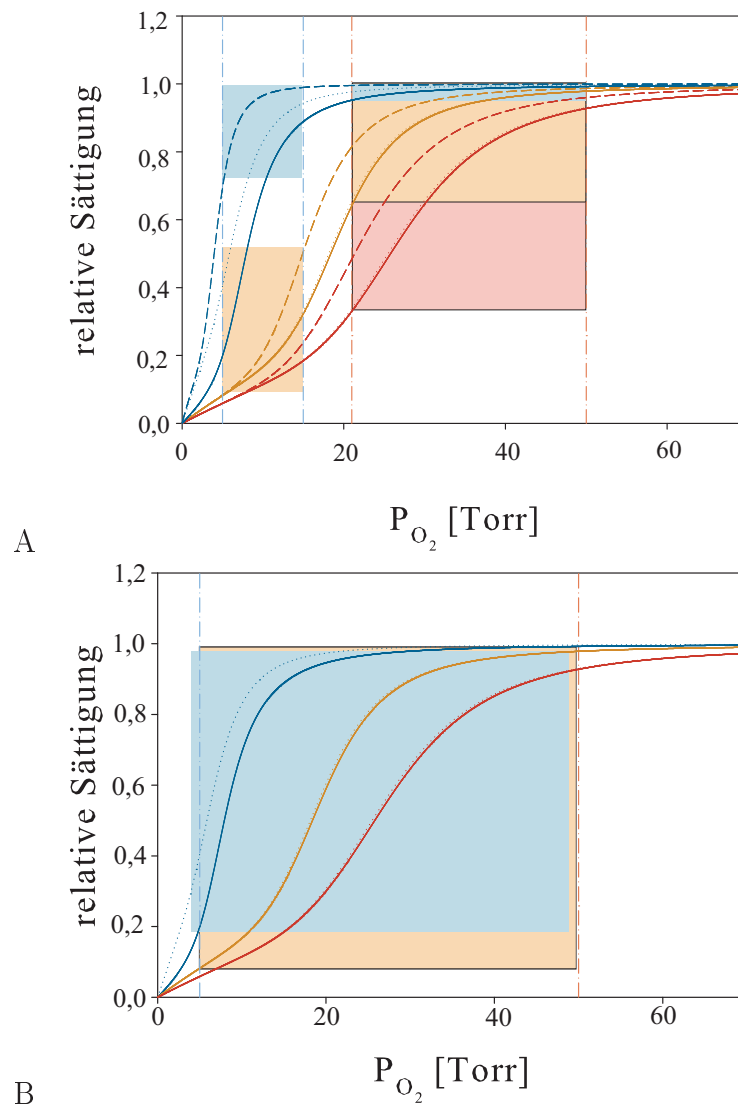


Abbildung 4.11: Sauerstoffbeladungsgrade des Hämocyanins des Europäischen Hummers unter verschiedenen physiologischen Bedingungen bei 10°C (blau), 25°C (orange) und 30°C (rot) A: Normoxie und biotopbedingte Hypoxie. Referenzlinie bei 5 Torr: P_{O_2} vor der Kiemenpassage bei biotopbedingter Hypoxie; Referenzlinie bei 15 Torr: P_{O_2} nach der Kiemenpassage bei biotopbedingter Hypoxie Referenzlinie bei 21 Torr: P_{O_2} vor der Kiemenpassage bei Normoxie; Referenzlinie bei 50 Torr: P_{O_2} nach der Kiemenpassage bei Normoxie; Die blauen Bereiche zeigen die Sauerstoffkapazität des Hämocyanins bei 10°C, die orangen Bereiche bei 25°C und die roten Bereiche bei 30°C. Da es hier zu Überschneidungen kommt, kann die Sauerstoffbeladung bei der jeweiligen Temperatur an der Referenzlinie bei 50 bzw. 15 Torr abgelesen werden. B: Funktionsbedingte Hypoxie. – ohne Effektor; mit 0,02 mM Urat; — mit 0,4 mM Urat

Wie oben beschrieben lebt der Hummer in seinem natürlichen Habitat in Temperaturbereichen von zwei bis 25°C und kann einen Temperaturbereich von 0 bis 30°C tolerieren. Unter normoxischen Bedingungen kommt es bei 25°C zu einer Entladung von ca. 33% des Hämocyanins, in Ab- und in Anwesenheit von 0,02 mM Urat. Somit fungiert Hämocyanin vorwiegend bei hohen Temperaturen als Sauerstofftransportprotein.

Urat akkumuliert bei biotopbedingter Hypoxie bis auf eine Konzentration von 0,4 mM in der Hämolymphe. Der Sauerstoffpartialdruck ändert sich zudem auf ca. 5 Torr vor der Kiemenpassage und erreicht 15 Torr nach der Kiemenpassage (Butler et al., 1978; McMahon et al., 1978). Bei 10°C verringert sich durch die mit der Akkumulation einhergehenden Bindung an das Hämocyanin und der anschließenden Affinitätserhöhung sogar die Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe um 25% (siehe Abbildung 4.11A, biotopbedingte Hypoxie). Hämocyanin wirkt hier dennoch als Sauerstofftransportprotein, die Wirkung des Urats liegt jedoch nicht in der erhöhten Sauerstoffabgabe. Bei erhöhten Temperaturen kann es jedoch durch die verringerte Konzentration des Sauerstoffs im Gewässer zu einer biotopbedingten Hypoxie kommen. Durch eine Akkumulation des Urats gibt das Hämocyanin 42% des gebundenen Sauerstoffs bei 25°C an das Gewebe ab. Würde Urat nicht akkumulieren, so könnten nur 25% Sauerstoff entladen werden. Hämocyanin wirkt demnach mit gebundenem Urat bei einer mit der erhöhten Gewässertemperatur einhergehenden biotopbedingten Hypoxie als effektiver Sauerstofftransporter, da sich die Sauerstofftransportkapazität um 17% erhöht. Bei 30°C sinkt der Wirkungsgrad des Hämocyanin-Urat-Komplexes ab, da nur noch eine Kapazitätserhöhung von ca. 5% zu verzeichnen ist. Damit wird deutlich, dass es sich bei dieser Temperatur um die Grenze des Toleranzbereichs des Hummers handelt.

Da funktionelle Hypoxie beim Amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*) mit einer Erniedrigung des pH-Wertes einhergeht (Rose et al., 1998) und man davon ausgehen kann, dass es sich bei dem Europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*) ähnlich verhält, kann eine funktionelle Hypoxie hier nur bedingt simuliert werden, da pH-Wert-abhängige Bindungsparameter bei erhöhten Temperaturen nicht zur Verfügung stehen. Abbildung 4.11 B zeigt die Wirkung des Hämocyanins als Sauerstofftransporter nach muskulärer Aktivität. Die pH-Wert-Änderung wurde hierbei nicht einbezogen. Da Urat bei funktionsbedingter Hypoxie nicht akkumuliert, muss hier von der Grundkonzentration von 0,02 μ M Urat in der Hämolymphe ausgegangen werden. So kommt es bei einer Temperatur von 10°C zu einer 60%igen Entladung des Hämocyanins am Gewebe, bei einer Temperatur von 25°C sogar von 89%. Da die Affinität des Hämocyanins durch den abgesenkten pH-Wert verringert wird, ist davon auszugehen, dass die Sauerstoffkapazität des Hämocyanins geringer ist. Es wurde jedoch für die Blaukrabbe *Callinectes sapidus* (Booth et al., 1982) und den Taschenkrebs *Cancer magister* (Graham et al., 1983) eine Akkumulation von L-Laktat während funktionsbedingter Hypoxie nachgewiesen. L-Laktat könnte somit auch beim Europäischen Hummer die Funktion des Urats zur Affinitätserhöhung

übernehmen. Hämocyanin wirkt dennoch auch unter funktioneller Hypoxie als potenter Sauerstofftransporter, die Bindung des Urats ist hier jedoch über die Grundkonzentration hinaus nicht relevant.

5

Zusammenfassung

Hämocyane sind multimere, allosterisch regulierte Proteine, die sich durch eine hoch kooperative Sauerstoffbindung charakterisieren. Zahlreiche Effektoren können die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins beeinflussen.

In dieser Arbeit wird der Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoff- und Effektorbindung an das Hämocyanin des Europäischen Hummers (*Homarus vulgaris*) untersucht. Urat akkumuliert unter biotopbedingter Hypoxie in der Hämolymphe des Hummers und beeinflusst die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins. Um dessen Bindungsstelle näher zu charakterisieren, wurden Koffein und weitere Xanthinderivate als artifizielle Effektoren in Sauerstoffbindungs- und thermodynamischen Studien verwendet.

Die Bindung des Urats und der weiteren Effektoren konnte durch das Two-Set-of-Sites-Modell mit zwei allosterischen und zwei nicht-allosterischen Bindungsplätzen charakterisiert werden. Die Sauerstoffbindung an das Hämocyanin wurde mit dem Nested-MWC-Modell beschrieben. Eine Kombination der Daten ermöglichte die Einordnung der thermodynamischen Bindungsdaten in ein allosterisches Modell, das den Einfluss der Temperatur auf das Hämocyaninmolekül berücksichtigte.

Eine Erhöhung der Temperatur über einen Bereich von 10 bis 30°C erniedrigt die Sauerstoffaffinität als auch die Kooperativität der Sauerstoffbindung des Hämocyanins. Urat und Koffein erhöhen die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins, der relative Einfluss nimmt dabei mit zunehmender Temperatur für Koffein zu und für Urat ab.

Urat und die weiteren Xanthinderivate erhöhen die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins und senken die Kooperativität der Sauerstoffbindung. Urat bindet bei 10°C unter hypoxischen Bedingungen ($P_{O_2} < 1$ Torr) mit der Bindungskonstante $K_{tR}^{Urat} = 0,55 \pm 0,026 \text{ mM}^{-1}$ an die Konformation tR. Die Bindung des Urats führt zu einer partiellen Umlagerung des Moleküls in die Konformation tT. Mit zunehmender Temperatur lagert sich das Hämocyaninmolekül unter hypoxischen Bedingungen in Abwesenheit der Effektoren in die Konformation tT um. Unter normoxischen Bedingungen ($P_{O_2} > 150$ Torr) bindet Urat mit einer höheren Affinität ($K_{rT}^{Urat} = 35,37 \pm 13,33 \text{ mM}^{-1}$) an die Konformation rT. Durch eine Erhöhung der Temperatur von 10 auf 30°C lagert sich Hämocyanin

in die Konformation rR um. Durch die Bindung des Urats erfolgt auch bei hohen Temperaturen ab moderaten Sauerstoffkonzentrationen ($P_{O_2} \approx 30$ Torr) eine Umlagerung in die Konformation rT. Die übrigen Xanthinderivate haben keinen oder einen geringen Einfluss auf die Konformationsverteilung unter normoxischen Bedingungen. Somit resultiert der unterschiedliche relative Einfluss des Koffeins und Urats auf die Sauerstoffaffinität mit zunehmender Temperatur aus der durch das Urat initiierten Konformationsumlagerung.

Die Bindung des Urats und der Xanthinderivate an das Hämocyanin ist enthalpiegetrieben. Dabei liegt die Bindung an die unter normoxischen Bedingungen dominierende Konformation in einem niedrigeren Energiebereich als die Bindung an die nicht-allosterischen Bindungsplätze. Die Änderung der Wärmekapazität ist für alle verwendeten Liganden negativ und von der Temperatur abhängig. Die mit dem Nested-MWC-Modell aufgestellte Hypothese, dass in Abhängigkeit von der Temperatur das Molekül einer Konformationsumlagerung unterliegt, konnte somit bestätigt werden.

Die thermodynamischen Analysen der Bindung der Xanthinderivate an das Hämocyanin zeigten, dass eine hohe Hydrophobizität des Effektors die Affinität zu dem Makromolekül erhöht. Daher bindet der artifizielle Effektor Koffein sowie die verwendeten Di- und Mono-Methylxanthine bei jeder gemessenen Temperatur mit einer höheren Affinität an das Hämocyanin als der natürliche Modulator Urat.

Das Hämocyanin des Europäischen Hummers dient unter physiologischen Bedingungen bei hohen Temperaturen ($\geq 25^\circ\text{C}$) als Sauerstofftransportprotein. Unter biotopbedingter Hypoxie akkumuliert Urat in der Hämolymphe und verstärkt bei hohen Temperaturen die Sauerstoffabgabe an das Gewebe um 17% im Vergleich zu der Abgabe bei einer physiologischen Grundkonzentration von Urat. Urat hat demnach einen bedeutenden Einfluss auf den Sauerstofftransport bei höheren Temperaturen. Bei tiefen Temperaturen und Hypoxie hat die Akkumulation des Urats kaum einen Effekt auf die Sauerstoffabgabe an das Gewebe. Unter funktionsbedingter Hypoxie fungiert Hämocyanin im gesamten Temperaturspektrum als Sauerstofftransporter, da jedoch Urat vermutlich unter diesen Bedingungen nicht akkumuliert, hat es bei funktionsbedingter Hypoxie keinen relevanten Einfluss auf den Sauerstofftransport im Tier.

Literaturverzeichnis

- Adair, G. (1925). The hemoglobin system, VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 63:529–545.
- Aiken, D. E. (1980). *The Biology and Management of Lobsters Volume I: Physiology and Behavior*, chapter Molting and Growth. Academic Press.
- Arnaud, A. und Bouteiller, L. (2004). Isothermal titration calorimetry of supramolecular polymers. *Langmuir*, 20(16):6858–6863.
- 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.
- Bolen, D. W., Flogel, M., und Biltonen, R. (2001). Calorimetric studies of protein–inhibitor interaction. I. Binding of 3'-cytidine monophosphate to ribonuclease A at pH 5.5. *Biochemistry*, 10(2):4136–4140.
- Bonaventura, J. und Bonaventura, C. (1980). Hemocyanin: Relationship and their structure, function and assembly. *Amer. Zool.*, 20:7–17.
- Booth, C. E., McMahon, B. R., und Pinder, A. (1982). Oxygen uptake and the potentiating effects of increasing hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Comp. Physiol.*, 80A:69–73.
- Bouchet, J. Y. und Truchot, J. P. (1985). Effects of hypoxia and L-lactate on the haemocyanin-oxygen affinity of the lobster *Homarus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80A:69–73.
- Bridges, C., Bicudo, J., und Lykkeboe, G. (1979). Oxygen-content measurement in blood containing hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 62(2):457–462.

- Bridges, C. R. (1990). Purines and their interaction with other factors controlling haemocyanin oxygen affinity. *Invertebrate Dioxygen Carriers*, pages 401–405.
- 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.
- Burmester, T. (1999). Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. *J. Biol. Chem.*, 274(19):13217–13222.
- 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.
- Calderone, C. T. und Williams, D. H. (2001). An enthalpic component in cooperativity: the relationship between enthalpy, entropy, and noncovalent structure in weak associations. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(26):6262–6267.
- Clarke, C., Woods, R. J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M. A., und Boons, G. J. (2001). Involvement of water in carbohydrate-protein binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(49):12238–12247.
- Claybrook, D. L. (1983). *The Biology of Crustacean Volume V Internal anatomy and physiological regulation*, chapter Nitrogen metabolism. Academic Press.
- Cooper, A. (2005). Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. *Biophys. Chem.*, 115(2-3):89–97.
- Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H., und Nollmann, 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.
- Czytrich, H. M. (1990). *Der Purinnukleotidstoffwechsel des Flusskrebsses Astacus leptodactylus in Abhängigkeit von einer funktionellen und biotopbedingten Anaerobiose*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Davis, B. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404–421.
- Decker, H. und Föll, R. (2000). Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol*, 127(2):147–154.

- Decker, H. und Sterner, R. (1990). Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurytelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons. *J. Mol. Biol.*, 211(1):281–293.
- Dykens, J. A. (1991). Purineolytic capacity and origin of hemolymph urate *Carcinus maenas* during hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: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*, pages 343–449. Academic Press.
- Elguero, J., Marzin, C., Katritzky, A. R., und Linda, P. (1976). The tautomerism of heterocycles: Purines and other condensed five-six ring systems with heteroatoms in both rings. *Adv. Heterocycl. Chem.*
- 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.
- Graham, R. A. (1985). A model for L-lactate binding to *Cancer magister* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol B*, 81(4):885–887.
- Graham, R. A., Mangum, C. P., Terwilliger, R. C., und Terwilliger, N. B. (1983). The effect of organic acids on oxygen binding of hemocyanin from the crab *Cancer magister*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74A:45–50.
- 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.
- Gupta, S., Das, L., Datta, A., Poddar, A., Janik, M., und Bhattacharyya, B. (2006). Oxalone and lactone moieties of podophyllotoxin exhibit properties of both the B and C rings of colchicine in its binding with tubulin. *Biochemistry*, 45(20):6467–6475.
- Hagerman, L. und Vismann, B. (1999). Effects of thiosulphate on haemocyanin oxygen affinity in the isopod *Saduria entomon* (L.) and the brown shrimp *Crangon crangon* (L.). *J. Comp. Physiol. B*, 169(8):549–554.
- Hardison, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(12):5675–5679.

- Hartmann, H., Lohkamp, B., Hellmann, N., und Decker, H. (2001). The allosteric effector L-lactate induces a conformational change of 2x6-meric lobster hemocyanin in the oxy state as revealed by small angle x-ray scattering. *J Biol.Chem.*, 276(23):19954–19958.
- Hellmann, N. (2004). Bohr-effect and buffering capacity of hemocyanin from the tarantula *E. californicum*. *Biophys. Chem.*, 109(1):157–167.
- Hellmann, N., Jaenicke, E., und Decker, H. (2001). Two types of urate binding sites on hemocyanin from the crayfish *Astacus leptodactylus*: an itc study. *Biophys. Chem.*, 90(3):279–299.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Proc. of the phy.*
- Indyk, L. und Fisher, H. F. (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.*, 295:350–364.
- Inobe, T., Makio, T., Takasu-Ishikawa, E., Terada, T., und Kuwajima, K. (2001). Nucleotide binding to the chaperonin groel: non-cooperative binding of ATP analogs and ADP, and cooperative effect of ATP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1545(1-2):160–173.
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L., und Bott, M. (1999). The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol. Microbiol.*, 33(4):858–872.
- Klotz, I. M. (1997). *Ligand-Receptor-Energetics – A Guide for the Perplexed*. University Science Books, Mill Valley, California.
- Kusche, K. und Burmester, T. (2001). Molecular cloning and evolution of lobster hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(4):887–892.
- 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.
- 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. (1989). Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respir. Physiol.*, 77(3):323–336.
- 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.

- Lamy, J., Green, B., Toulmond, A., Wall, J., Weber, R., und Vinogradov, S. (1996). Giant hexagonal bilayer hemoglobins. *Chem. Rev.*, 96(8):3113–1324.
- Lee, S., Lee, B., und Soderhall, K. (2004). Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 322(2):490–496.
- Lieb, B., Altenhein, B., Lehnert, R., Gebauer, W., und Markl, J. (1999). Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. *Eur. J. Biochem.*, 265(1):134–144.
- Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A. F., Schneider, H. J., Schartau, W., Moore, M. D., Yokota, E., Behrens, P. Q., Nakashima, H., Takagi, T., und . (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 229(4713):519–524.
- Lister, J. H. (1966). Physicochemical aspects of the chemistry of purines. *Adv. Heterocycl. Chem.*, 6:1–43.
- 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.
- Mangum, C. P. (1983). The biology of crustacea: Vol 7: Oxygen transport in blood. Serial (Book, Monograph).
- Markl, J., Hofer, A., Bauer, G., Kempter, B., Brenzinger, M., und Linzen, B. (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanin: II. Crustacea. *J. Comp. Physiol. B*, 133:167–175.
- Mason, R. P., Mangum, C. P., und Godette, G. (1982). The influence of inorganic ions and acclimation salinity on hemaocyanin-oxygen binding in the blue crab *Calinectes sapidus*. *Biol. Bull.*, 164:104–123.
- McLeese, D. W. (1959). Temperature, salinity and oxygen relationships of the lobster. *Anatomical Record*, 134(3):603–603.
- 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.

- 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.
- 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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71(4):1418–1421.
- Mizoue, L. S. und Tellinghuisen, J. (2004). The role of backlash in the “first injection anomaly” in isothermal titration calorimetry 30. *Anal. Biochem.*, 326(1):125–127.
- Monod, J., Wyman, J., und Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12:88–118.
- 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.
- Morris, S., Bridges, C. R., und Grieshaber, M. K. (1986). The potentiating effect of purine bases and some of their derivatives on the oxygen affinity of haemocyanin from the crayfish *Austropotamobius pallipes*. *J. Comp. Physiol. B*, 156:431–440.
- Morris, S. und McMahon, B. R. (1989). Neurohumor effects on crustacean haemocyanin oxygen affinity. *J. Comp. Physiol. B*, 249:334–337.
- 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.

- O'Brien, R., Chowdhry, B. Z., und Ladbury, J. E. (2000). Protein-ligand-interactions: hydrodynamics and calorimetry: Chapter 10: Isothermal titrations calorimetry of biomolecules. Serial (Book, Monograph).
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:321–349.
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., und Flannery, B. P. (1992). *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Privalov, G. P. und Privalov, P. L. (2000). Problems and prospects in microcalorimetry of biological macromolecules. *Methods Enzymol.*, 323:31–62.
- 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.
- Rose, R. A., Wilkens, J. L., und Walker, R. L. (1998). The effects of walking on heart rate, ventilation rate and acid-base status in the lobster *homarus americanus*. *J Exp. Biol.*, 201(18):2601–2608.
- Rothe, G. und Purkhanbaba, H. (1982). Determination of molecular-weights and stokes radii of non-denatured proteins by polyacrylamide gradient gel-electrophoresis. 1. an equation relating total polymer concentration, the molecular-weight of proteins in the range of 104-106, and duration of electrophoresis. *Electrophoresis*, 3(1):33–42.
- Sanna, M., Olinas, A., Castagnola, M., Sollai, L., Manconi, B., Salvadori, S., Giardina, B., und Pellegrini, M. (2004). Oxygen-binding modulation of hemocyanin from the slipper lobster *Scyllarides latus*. *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 139(2):261–268.
- Sarkhel, S. und Desiraju, G. R. (2004). N-H...O, O-H...O, and C-H...O hydrogen bonds in protein-ligand complexes: strong and weak interactions in molecular recognition. *Proteins*, 54(2):247–259.
- Sick, H. und Gersonde, K. (1969). The O₂-binding properties of *chironomus th. thummi* larval hemoglobin. *Eur. J. Biochem.*, 7(2):273–279.
- Spolar, R. S. und M. T. Record, J. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*, 263(5148):777–784.
- Sturtevant, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(6):2236–2240.

- Taylor, A. C., Johns, A. R., Atkinson, R. J. A., und Bridges, C. R. (1999). Effects of sulphide and thiosulphate on the respiratory properties of the haemocyanin of the benthic crustaceans *Calocaris macandreae* Bell, *Nephrops norvegicus* (L.) and *Carcinus maenas* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 233(2):163–179.
- 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. (1971). Temperature and acid-base regulation in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir. Physiol.*, 17(1):11–20.
- 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 Sumpfkrebsses* *Astacus leptodactylus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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.
- van Olst, J. C., Carlberg, J. M., und Hughes, J. T. (1980). *The Biology and Management of Lobsters Volume II: Ecology and Management*, chapter Aquaculture. Academic Press.
- Wadsö, I. (1972). Physical chemistry. In *MTP International Review of Science*, volume 10 of 1. Butterworths, London.
- 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.
- 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*. University Science Books, Mill Valley, California.
- Zeis, B. (1994). *Einfluss von Urat auf die funktionellen Eigenschaften von Hämocyanin*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- 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* I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen-affinity. *J. Exp. Biol.*, 168:93–110.

6

Anhang

Tabelle 6.1: Gleichgewichtskonstante l_R , l_T und Λ basierend auf dem Nested-MWC-Modell der Sauerstoffbindung in Abwesenheit eines Effektors ($X \pm SD$)

T	l_T	Λ	l_R
10	$2,0 \times 10^{13} \pm 5,8 \times 10^{11}$	$0,005 \pm 0,0007$	$9 \times 10^{12} \pm 1,4 \times 10^{10}$
15	$2,3 \times 10^{12} \pm 5,0 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{-4} \pm 5,0 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^8 \pm 2,9 \times 10^8$
20	$2,0 \times 10^{11} \pm 8,0 \times 10^{10}$	$0,035 \pm 0,002$	$1,0 \times 10^{10} \pm 1,0 \times 10^8$
25	$8,0 \times 10^{10} \pm 1,8 \times 10^2$	$0,15 \pm 0,07$	$1,1 \times 10^8 \pm 3,6 \times 10^5$
30	$1,0 \times 10^{11} \pm 6,0 \times 10^{10}$	$6,05 \pm 1,4$	$3,0 \times 10^9 \pm 9,0 \times 10^8$

Tabelle 6.2: Gleichgewichtskonstante l_R^{Urat} , l_T^{Urat} und Λ^{Urat} basierend auf dem Nested-MWC-Modell der Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Urat ($X \pm SD$)

	l_T	Λ	l_R
10	$2,0 \times 10^{12} \pm 2,5 \times 10^{11}$	$0,007 \pm 0,003$	$2,3 \times 10^{11} \pm 5,8 \times 10^{10}$
15	$1,5 \times 10^{11} \pm 1,0 \times 10^{11}$	$0,17 \pm 0,24$	$5,0 \times 10^9 \pm 5,7 \times 10^9$
20	$2,0 \times 10^{11} \pm 2,0 \times 10^8$	$3,39 \pm 0,41$	$1,0 \times 10^9 \pm 4,0 \times 10^8$
25	$6,0 \times 10^9 \pm 5,0 \times 10^6$	$0,69 \pm 0,23$	$4,2 \times 10^8 \pm 9,8 \times 10^6$
30	$1,0 \times 10^{10} \pm 2,0 \times 10^9$	$28,27 \pm 3,26$	$1,0 \times 10^{10} \pm 3,0 \times 10^8$

Tabelle 6.3: Gleichgewichtskonstante l_R^{Koffein} , l_T^{Koffein} und Λ^{Koffein} basierend auf dem Nested-MWC-Modell der Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Koffein ($X \pm SD$)

	l_T	Λ	l_R
10	$2,0 \times 10^{12} \pm 5,8 \times 10^{11}$	$0,004 \pm 0,007$	$2,0 \times 10^{11} \pm 2,2 \times 10^{-1}$
15	$2,0 \times 10^{10} \pm 1,7 \times 10^{10}$	$0,0001 \pm 0,0002$	$9,9 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^8$
20	$2,9 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^9$	$0,018 \pm 0,003$	$1,1 \times 10^8 \pm 1,0 \times 10^7$
25	$1,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^8$	$0,24 \pm 0,04$	$1,8 \times 10^8 \pm 3,0 \times 10^7$
30	$1,0 \times 10^9 \pm 3,0 \times 10^8$	$1,94 \pm 0,85$	$2,0 \times 10^9 \pm 3,0 \times 10^8$

Tabelle 6.4: Gleichgewichtskonstante l_R^{eff} , l_T^{eff} und Λ^{eff} basierend auf dem Nested-MWC-Modell der Sauerstoffbindung der aufgeführten Xanthinderivate. ($X \pm SD$)

	l_T	Λ	l_R
Paraxanthin	$9,0 \times 10^8 \pm 6,0 \times 10^8$	$0,019 \pm 0,015$	$6,5 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$
Theobromin	$2,0 \times 10^9 \pm 8,0 \times 10^8$	$0,012 \pm 0,004$	$1,1 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^7$
Theophyllin	$2,0 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^9$	$0,017 \pm 0,004$	$1,1 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^7$
1-Methylxanthin	$2,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^8$	$0,077 \pm 0,019$	$1,3 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^7$
3-Methylxanthin	$1,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^8$	$0,23 \pm 0,034$	$2,2 \times 10^8 \pm 5,0 \times 10^7$
7-Methylxanthin	$1,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^8$	$0,034 \pm 0,007$	$7,1 \times 10^7 \pm 9,0 \times 10^6$
Isokoffein	$9,2 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^8$	$0,267 \pm 0,05$	$2,0 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^7$
1,3,7-TMH	$2,0 \times 10^9 \pm 6,0 \times 10^8$	$0,15 \pm 0,04$	$1,4 \times 10^8 \pm 1,0 \times 10^7$

Tabelle 6.5: Einflussfaktoren F_T^{eff} , F^{eff} und F_R^{eff} der Sauerstoffbindung der Xanthinderivate. Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um die Standardabweichung ($X \pm SD$)

Ligand	F_T^{eff}	F^{eff}	F_R^{eff}
Paraxanthin	$0,013 \pm 0,003$	$0,029 \pm 0,014$	$0,065 \pm 0,003$
Theobromin	$0,011 \pm 0,009$	$0,50 \pm 0,26$	$0,11 \pm 0,02$
Theophyllin	$0,05 \pm 0,008$	$0,016 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,009$
1-Methylxanthin	$0,007 \pm 0,0008$	$6,94 \pm 0,69$	$0,18 \pm 0,35$
3-Methylxanthin	$0,008 \pm 0,001$	$4,17 \pm 0,51$	$0,19 \pm 0,36$
7-Methylxanthin	$0,01 \pm 0,001$	$7,66 \pm 1,06$	$0,18 \pm 0,02$
Isokoffein	$0,008 \pm 0,0007$	$74,98 \pm 0,98$	$0,18 \pm 0,04$
1,3,7-Trimethylharnsäure	$0,05 \pm 0,005$	$0,02 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,003$

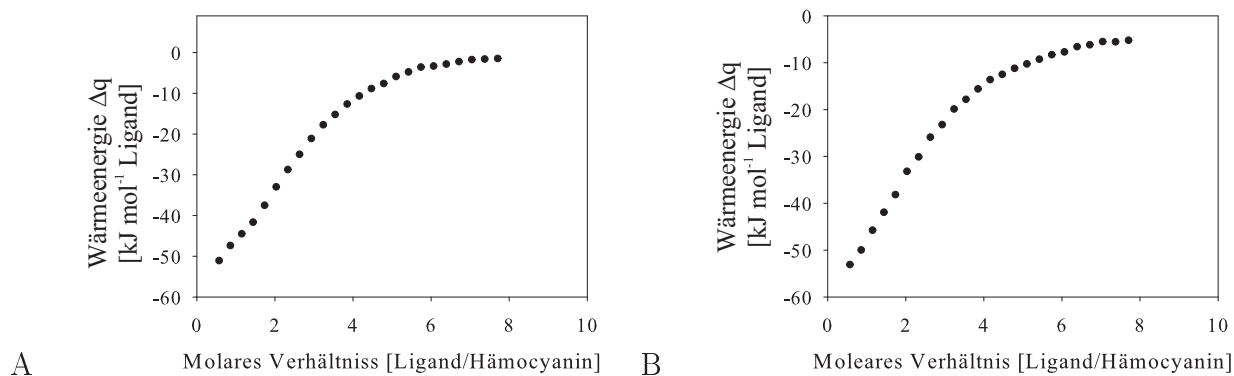


Abbildung 6.1: Beispielhafte Bindungsisotherme der Bindung von A: Isokoffein und B: 1,3,7-Trimethylharnsäure an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C

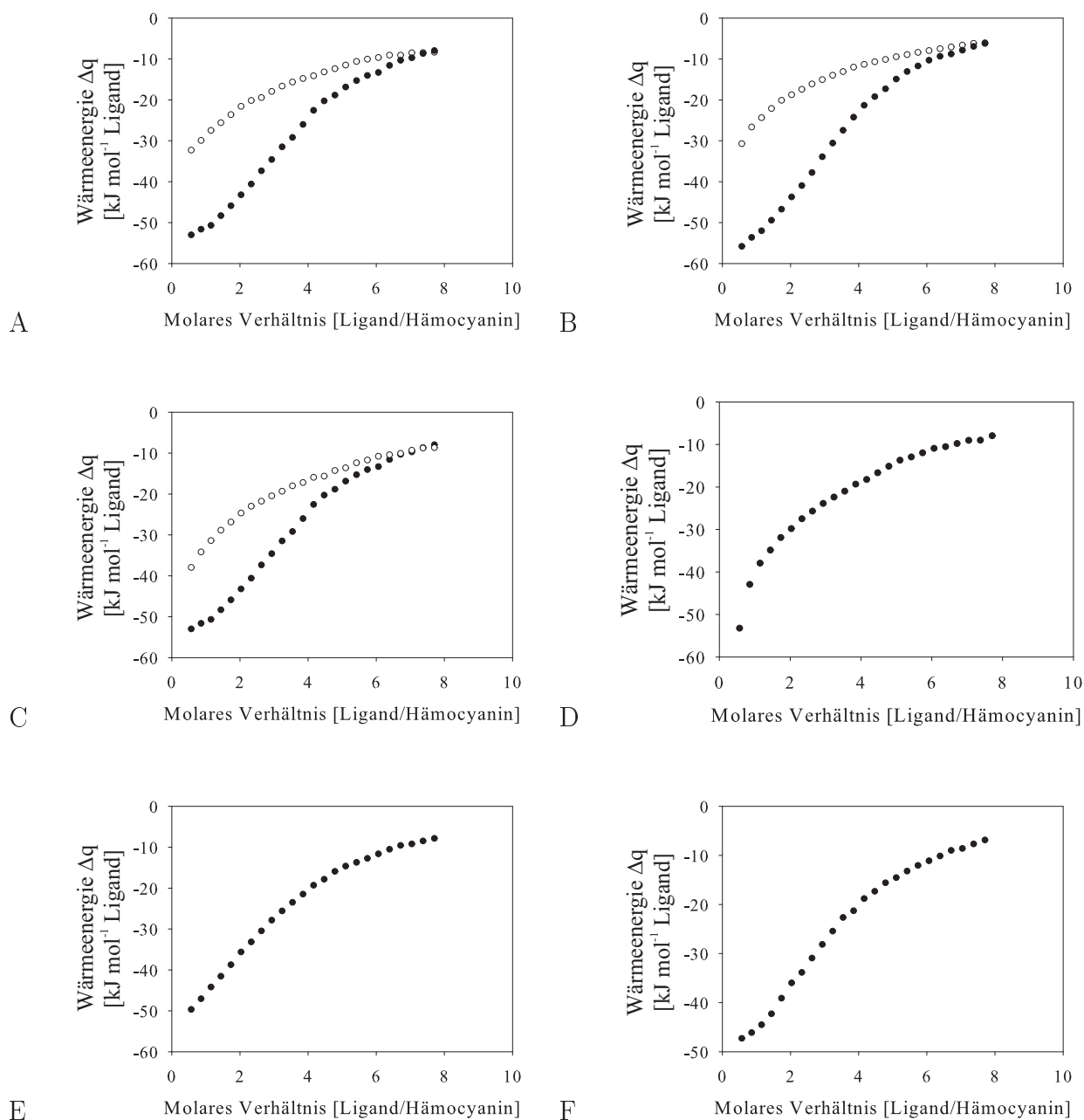


Abbildung 6.2: Beispielhafte Bindungsisotherme der Bindung von A: Paraxanthin, B: Theobromin, C: Theophyllin, D: 1-Methylxanthin, E: 3-Methylxanthin und F: 7-Methylxanthin an das Hämocyanin des Europäischen Hummers bei 20°C. Bindung unter normoxischen Bedingungen (●); Bindung unter hypoxischen Bedingungen (○)

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber herzlich für seine Förderung und Unterstützung meiner Arbeit. Sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft waren mir immer sehr hilfreich.

Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zoophysiology sei für ihre Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik, sowie für die vielen schönen Stunden außerhalb des Instituts gedankt. Insbesondere danke ich meinen Kolleginnen am isothermen Titrationskalorimeter, Nadine van Os und Astrid Wänke, für ihren Teamgeist und die hilfreichen Diskussionen.

Dr. Michael Menze gebührt herzlicher Dank für seine Hilfsbereitschaft als auch für seine Unterstützung und Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Vor allem bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich die vielen Jahre in jeglicher Weise unterstützten und stets für mich da waren.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Andreas Pott für seinen Rückhalt und seine liebevolle Unterstützung in den Jahren der Erstellung meiner Arbeit.

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, 02.11.2006

Ariane Pott