

# 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 Erythrocrurine 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 Arthropodenhämocyanins 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 Hämocyanins, 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 Molluskenhämocyanin 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 Hämocyanine 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 Hämocyanin der Arthropoden wird durch zahlreiche allosterische Effektoren und Modulatoren beeinflusst. So reagiert das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins hochsensitiv auf einen veränderten pH-Wert. Das Hämocyanin unterliegt dabei dem klassischen Bohr-Effekt: Mit steigender Protonenkonzentration sinkt die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins (Mangum, 1983; Truchot, 1975). Werden Crustaceen einer veränderten Salinität ausgesetzt, so beeinflusst diese ebenfalls die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins. 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 Hämocyanin-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 Hämocyanins 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 Hämocyanins (Truchot, 1975).

Neben den hier aufgeführten anorganischen Modulatoren der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins 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 (Dykens, 1991). Morris et al. (1985) zeigten am Dohlenkrebs *Austropotamobius pallipes*, dass Urat die Sauerstoffaffinität des Krebshämocyanins 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  $\Delta H^0$  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  $\Delta S^0$  und freie Energie  $\Delta G^0$  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  $\Delta C_p^0$

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

lässt sich über die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H^0$  bestimmen, wobei  $\Delta H^0$  [kJ mol<sup>-1</sup>] die freie Bindungsenthalpie und  $T$  die Temperatur [K] darstellt. Im Falle einer bi-molekularen Interaktion verändert sich  $\Delta H^0$  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-

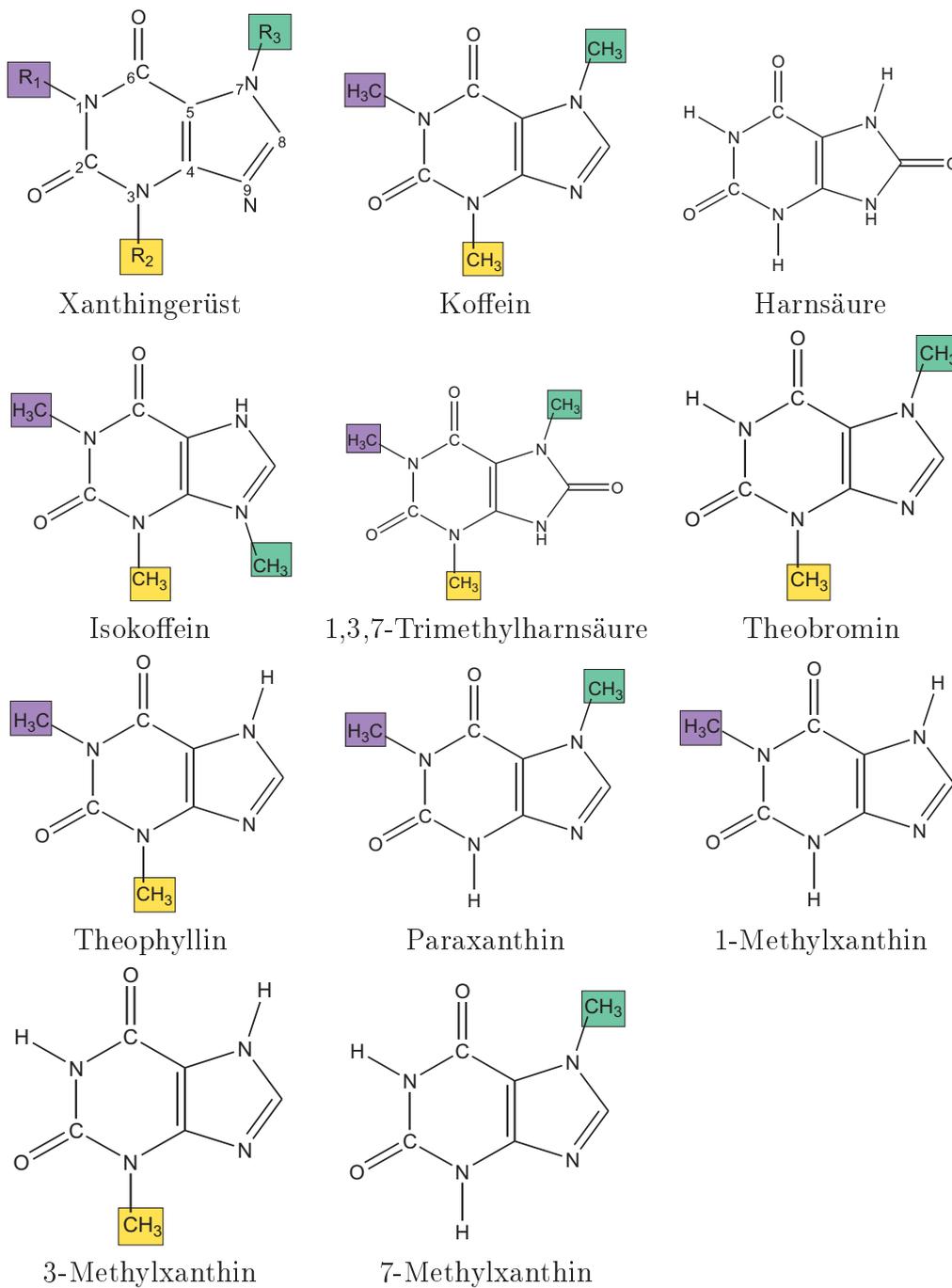


Abbildung 1.1: Strukturformeln der verwendeten Liganden und Effektoren. R = Methylrest

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.