

Berichte aus der Biologie

Michael August Menze

**Analyse der Regulation von Haemocyanin
durch Urat beim europäischen Hummer
(*Homarus vulgaris*)**

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Menze, Michael August:

Analyse der Regulation von Haemocyanin durch Urat beim europäischen Hummer (*Homarus vulgaris*) / Michael August Menze.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9726-5

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9726-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Die Sauerstoffbindungseigenschaften des Haemocyanins der Arthropoden sind hochgradig homo- und heterotrop allosterisch reguliert. Die thermodynamische Charakterisierung der am Haemocyanin vorliegenden allosterischen Wechselwirkungen ist ein gutes Modellsystem zum Studium eines Informationstransfers auf molekularer Ebene. In der vorliegenden Arbeit wird die gegenseitige Beeinflussung der Bindung von Sauerstoff und Urat (bzw. des mit höherer Affinität bindenden Uratanalogons Koffein) an das Haemocyanin aus *Homarus vulgaris* untersucht und ein allosterisches Modell vorgestellt, das diese Wechselwirkungen erklären kann. Mit Hilfe der bestimmten Bindungsparameter wird dann die Frage nach der Bedeutung der Ergebnisse für die Biologie des Tieres erörtert.

Urat und das Uratanalogon Koffein steigern die Sauerstoffaffinität des Haemocyanins von *Homarus vulgaris*. Der natürliche Modulator Urat, sowie der artifizielle Effektor Koffein reduzieren dabei das Ausmaß des Bohr-Effektes. Zudem wird die Kooperativität, mit der Sauerstoff vom Pigment gebunden wird, durch beide Purinderivate deutlich reduziert. Die Beeinflussung der Sauerstoffbindung an das Pigment durch Urat oder Koffein wird somit über einen ähnlichen allosterischen Mechanismus vermittelt.

Mit einem isothermen Titrationskalorimeter wurden die Bindungsparameter von Urat und Koffein an gereinigtem, dodekamerem Haemocyanin (*H. vulgaris*) unter normoxischen ($P_{O_2} > 150$ Torr) und hypoxischen ($P_{O_2} < 1$ Torr) Bedingungen bestimmt. Das Haemocyanin weist zwei Bindungsplätze ($n = 2$) für Urat und Koffein auf. Die Bindung von Urat an vollständig oxygeniertes Haemocyanin erfolgt mit einer Bindungskonstante von $K = 8.500 \pm 1.600 \text{ M}^{-1}$ und einer Bindungsenthalpie von $\Delta H^0 = -135,0 \pm 9,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Koffein bindet an das Pigment mit schwach positiver Kooperativität. Die mikroskopischen Bindungskonstanten betragen $K_1 = 14.100 \pm 5.800 \text{ M}^{-1}$ und $K_2 = 40.400 \pm 4.500 \text{ M}^{-1}$. Die Bindungsenthalpien der sukzessiven Besetzungsschritte liegen in der gleichen Größenordnung und betragen $\Delta H^0_1 = -97,5 \pm 15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ sowie $\Delta H^0_2 = -113,4 \pm 10,4 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Unter hypoxischen Bedingungen sinkt die Affinität des Haemocyanins für Urat und Koffein. Die Bindungskonstante für Urat fällt auf $K = 4.200 \pm 580 \text{ M}^{-1}$ und die Bindungsenthalpie verringert sich auf $\Delta H^0 = -72 \pm 8,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die reduzierte Affinität des Pigmentes für Koffein äußert sich lediglich in einer niedrigeren Bindungskonstante des zweiten Besetzungsschrittes ($K_2 = 17.000 \pm 6.400 \text{ M}^{-1}$). Die unter hypoxischen Bedingungen reduzierte Affinität des Pigmentes für den artifiziellen Effektor geht mit einem Verlust der Kooperativität, mit der Kof-

fein gebunden wird, einher. Es kommt zu keiner signifikanten Veränderung in den Koffeinbindungsenthalpien.

Die Protonenkonzentration (pH 7,55 – 8,15) besitzt weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen Einfluß auf die Bindung von Urat oder Koffein. Es sind keine ionisierbaren Gruppen mit pK_a -Werten in diesem Bereich an der Ligandenbindung beteiligt. Zudem ist die gemessene Bindungsenthalpie unbeeinflußt von der Ionisationsenthalpie des verwendeten Puffers. Es wird kein Protonentransfer zwischen dem Atmungspigment und dem Umgebungsmedium durch die Ligandenbindung verursacht.

Die Befunde zur Urat- und Koffeinbindung unter norm- und hypoxischen Bedingungen können nicht mit einem klassischen MWC-Modell, das nur zwei Haemocyaninkonformationen zuläßt („H_{C_T“ und „H_{C_R“), beschrieben werden. Erst eine Erweiterung des Modells um zwei Konformationen unter normoxischen Bedingungen („H_{C_RA“ und „H_{C_RB““) ist hierzu in der Lage. Es muß davon ausgegangen werden, daß das Protein in drei möglichen Konformationen vorliegen kann. Entgegen dem „alles oder nichts“ Prinzip bindet die unter hypoxischen Bedingungen vorliegende Proteinkonformation (H_{C_T) beide Effektoren mit niedriger aber dennoch substanzieller Affinität.}}}}}

Unter Berücksichtigung der Verhältnisse *in vivo* läßt sich mit den in dieser Arbeit bestimmten Bindungsparametern für Urat und Sauerstoff zeigen, daß der Modulator Urat erst unter für das Tier ungünstigen Bedingungen Relevanz für die Physiologie des Tieres besitzt. Bemerkenswert ist, daß das Atmungspigment selbst erst unter funktions- oder biotopbedingter Hypoxie maßgeblich an der Sauerstoffversorgung des Tieres beteiligt ist. Des Weiteren läßt sich eine Transportfunktion des Pigmentes für Urat ausschließen. Das Haemocyanin des europäischen Hummers (*H. vulgaris*) kann als ein Protein aufgefaßt werden, das maßgeblich der Kompensation von Streßfaktoren dient.