



Fachbereich: Chemie und Biotechnologie  
Studiengang: Bioingenieurwesen  
Studienschwerpunkt: Umweltbiotechnologie

# Isolierung und Charakterisierung einer neuen extrazellulären Phosphatase aus dem Verdauungstrakt des Europäischen Hummers (*Homarus gammarus*)

---

**DIPLOMARBEIT**  
vorgelegt von

SANDRA DITZLER

Matrikelnummer: 966818

Helgoland, FEBRUAR 2009





Diese Arbeit ist von mir selbstständig abgefertigt und verfasst.

Es sind keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt worden

Helgoland, 12.02.2009

---

Sandra DITZLER



Diese Arbeit wurde betreut von:

**Prof. Dr. rer. Nat. Marcus Baumann**

Fachbereich Chemie und Biotechnologie, Fachhochschule Aachen, Campus Jülich

**Dr. Reinhard Saborowski**

Biologischen Anstalt Helgoland, Alfred Wegener Institut für Meeres und Polarforschung



## DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Hilfe ich dieses Studium nicht hätte absolvieren können. Dafür, dass sie mir nicht nur finanziell, sondern auch in schlechteren Zeiten immer mit Rat und Tat zur Seite standen („Augen zu und durch..!“).

Einen weiteren, besonders großen Dank möchte ich an meinen Betreuer Dr. Reinhard Saborowski von der Biologischen Anstalt Helgoland aussprechen. Zum Einen dafür, dass er mir über den gesamten Zeitraum sein Labor uneingeschränkt zur Verfügung stellte, zum Anderen für die unzähligen Stunden und vielen Ratschläge die er mir stets geduldig entgegenbrachte. Ich danke ihm sehr für die Unmenge an Wissen die er mir während meines Aufenthaltes auf Helgoland vermittelt hat und mir die Möglichkeit gab dieses in meine tägliche Arbeit einzubringen und umzusetzen.

Ich danke Prof. Baumann für seine Betreuung von seitens der Fachhochschule aus und dafür, dass er mein großes Interesse für die Marine Biotechnologie geweckt und gestärkt hat.

Ich danke meinen Verwandten, Freunden und Bekannten für ihr reges Interesse an meinem Studium und meiner Arbeit auf Helgoland. Ich danke ihnen dafür, dass sie mir stets das Gefühl gaben nie wirklich weit weg von zu Hause zu sein und immer wieder den Kontakt zu mir suchten. Besonders danke ich meiner besten Freundin die mir ebenfalls stets zur Seite stand. Die trotz der weiten Entfernung nie den Kontakt abbrechen lies und immer ein paar aufmunternde und vor allem freche Worte parat hatte.

Zuletzt danke ich der Biologischen Anstalt Helgoland und all ihren Mitarbeitern, die mir meinen Aufenthalt auf Helgoland sehr angenehm und unvergesslich gestaltet haben und mir stets das Gefühl vermittelten immer willkommen zu sein.

*„In der Zeit, da jeder das All als das letzte verbleibende Unbekannte ansieht, müssen wir uns bewusst machen, dass es für uns hier unten auf der Erde noch so manche Sachen zu entdecken gibt.“*

**Robert D. Ballard**



## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| μM               | Mikromol pro Liter                            |
| A. dem.          | demineralisiertes Wasser                      |
| ADP              | Adenosin 5´Diphosphat                         |
| Alk.P            | alkalische Phosphatase                        |
| APS              | Ammoniumpersulfat                             |
| ATP              | Adenosintriphosphat                           |
| ATPasen          | Adenosintriphosphatasen                       |
| bis-pNPP         | bis-4-Nitrophenylphosphat                     |
| Blast            | Basic Local Alignment Search Tool             |
| BSA              | Bovin Serum Albumin                           |
| CBB              | Coomassie Brilliant Blue                      |
| CPP              | Citrat-Phosphat Puffer                        |
| d-ALP            | digestive fluid alkalische Phosphatase        |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                              |
| DTT              | Dithiothreitol                                |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure                  |
| Hg               | <i>Homarus gammarus</i>                       |
| IEF              | Isoelektrische Fokussierung                   |
| kDa              | Kilodalton                                    |
| l-ALP            | lösliche alkalische Phosphatase               |
| m-ALP            | membrangebundene alkalische Phosphatase       |
| mL               | Milliliter                                    |
| mM               | Millimol pro Liter                            |
| MUF-NAG          | Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-glucosamide   |
| MUF-P            | -Methylumbelliferyl-Phosphat                  |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinucleotid                  |
| NADH             | Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form |
| NAGase           | N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase                  |
| NCBI             | National Center for Biotechnology Information |
| nm               | Nanometer                                     |
| PEP              | Phosphoenolpyruvat                            |
| PITC             | Phenylisothiocyanat                           |
| pNPP             | 4-Nitrophenylphosphat                         |
| PTH-AS           | Phenylthiohydantoin-Aminosäure                |
| PVDF             | Polyvinylidendifluorid                        |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| SAP   | Shrimp Alkalische Phosphatase    |
| SDS   | Sodium Dodecyl Sulfat            |
| TEA   | Triethanolamin                   |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abb. 2.1:</b> Einführung des Kunststoffschlauches durch den Ösophagus .....                     | 7  |
| <b>Abb. 2.2:</b> Nach der Einführung des Kunststoffschlauches wurde die Magenflüssigkeit.....      | 7  |
| <b>Abb. 2.3:</b> Abfolge der einzelnen chromatographischen Aufreinigungsschritte.....              | 11 |
| <b>Abb. 2.4:</b> FPLC Systeme zur chromatografischen Auftrennung von Proteinen.....                | 12 |
| <b>Abb. 3.1:</b> ApiZym Teststreifen nach Inkubation und Farbentwicklung .....                     | 29 |
| <b>Abb. 3.2:</b> pH-Profil der Phosphomonoesterase von <i>H. gammarus</i> .....                    | 30 |
| <b>Abb. 3.3:</b> pH-Profil der Phosphomonoesterase von <i>H. gammarus</i> .....                    | 31 |
| <b>Abb. 3.4:</b> pH-Profil der Phosphodiesterase von <i>H. gammarus</i> .....                      | 31 |
| <b>Abb. 3.5:</b> pH-Profil der Phosphodiesterase von <i>H. gammarus</i> .....                      | 32 |
| <b>Abb. 3.6:</b> Enzymstabilität der Phosphomonoesterase mit unterschiedlichen pH-Werten .....     | 33 |
| <b>Abb. 3.7:</b> Die Proben wurden bei den jeweiligen pH-Werten .....                              | 33 |
| <b>Abb. 3.8:</b> Graphische Darstellung der Phosphatase-Aktivität .....                            | 34 |
| <b>Abb. 3.9:</b> Graphische Darstellung der Phosphatase-Aktivität .....                            | 34 |
| <b>Abb. 3.10:</b> Bestimmung der Phosphataktivität bei unterschiedlichen .....                     | 35 |
| <b>Abb. 3.11:</b> Thermostabilität der Phosphatase in der Magenflüssigkeit .....                   | 36 |
| <b>Abb. 3.12:</b> Phosphatase Inhibierung durch Zusatz verschiedener Phosphatkonzentrationen.....  | 37 |
| <b>Abb. 3.13:</b> Phosphatase Inhibierung durch Zusatz verschiedener Phosphatkonzentrationen.....  | 37 |
| <b>Abb. 3.14:</b> Chromatographische Proteinauftrennung durch Gelfiltration.....                   | 38 |
| <b>Abb. 3.15:</b> Proteinauftrennung durch die Anionenaustauschchromatographie .....               | 39 |
| <b>Abb. 3.16:</b> Proteinauftrennung durch Anionenaustauschchromatographie über .....              | 40 |
| <b>Abb. 3.17:</b> Aktivitätsgel mit dem Substrat MUF-Phosphat inkubiert in Tris/HCl-Puffer.....    | 42 |
| <b>Abb. 3.18:</b> 1. RotiMark Standard, 2. Magenflüssigkeit.....                                   | 42 |
| <b>Abb. 3.19:</b> Aktivitätsgel mit dem Substrat MUF-Phosphat.....                                 | 43 |
| <b>Abb. 3.20:</b> ApiZym Teststreifen mit farblicher, deutlich erkennbarer Substratumsetzung ..... | 45 |
| <b>Abb. 3.21:</b> Darstellung der Phosphatase und $\alpha$ -Glucosidase .....                      | 46 |
| <b>Abb. 3.22:</b> Enzymaktivitäten nach der Anionenaustauschchromatographie .....                  | 46 |
| <b>Abb. 3.23:</b> Zymogramm mit den Substraten MUF-NAG und MUF-P.....                              | 48 |
| <b>Abb. 3.24:</b> Ein mit Coomassie angefärbtes Aktivitätsgel .....                                | 48 |
| <b>Abb. 3.25:</b> Phosphatase - Aktivität aufgetragen gegen die ATPase Aktivität .....             | 49 |
| <b>Abb. 3.26:</b> Einfluss unterschiedlicher pH-Werte des Universalpuffers.....                    | 50 |
| <b>Abb. 3.27:</b> Einfluss unterschiedlicher pH-Werte und unterschiedlicher Puffer .....           | 50 |
| <b>Abb. 3.28:</b> Die Enzymaktivität von Proben, die bei unterschiedlichen pH Werten.....          | 51 |
| <b>Abb. 3.29:</b> Einfluss von Zinkchlorid auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase .....  | 51 |
| <b>Abb. 3.30:</b> Inhibierende Wirkung unterschiedlicher Magnesiumchlorid Konzentrationen.....     | 52 |
| <b>Abb. 3.31:</b> Einfluss von L-Cystein auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase .....    | 53 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 3.32:</b> Einfluss von L-Cystein auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase.....        | 53 |
| <b>Abb. 3.33:</b> Inhibierung der Phosphatase Aktivität bei unterschiedlichen Phosphat .....          | 54 |
| <b>Abb. 3.34:</b> Inhibierung durch unterschiedliche ADP Konzentrationen .....                        | 54 |
| <b>Abb. 3.35:</b> Substrat-Sättigungskurve der aufgereinigten Phosphatase .....                       | 55 |
| <b>Abb. 3.36:</b> Temperaturstabilität der aufgereinigten Phosphatase .....                           | 56 |
| <b>Abb. 3.37:</b> Temperaturstabilität der aufgereinigten Phosphatase .....                           | 56 |
| <b>Abb. 3.38:</b> Gegenüberstellung einer nativen und denaturierten Phosphatase Probe .....           | 57 |
| <b>Abb. 3.39:</b> 1. IEF Standard, 2-3 aufgereinigte Probe.....                                       | 58 |
| <b>Abb. 3.40</b> geblottete Membran mit der zuvor aufkonzentrierten extrazellulären Phosphatase ..... | 58 |
| <b>Abb. 3.41:</b> Das zur Kontrolle mit Coomassie angefärbte Blotting Gel .....                       | 59 |
| <b>Abb. 3.42:</b> Vergleich der Aminosäuresequenz der SAP mit dem N-Terminus .....                    | 63 |
| <br>  |    |
| <b>Abb. 4.1:</b> Aktivität der Phosphatase aus der Magenflüssigkeit .....                             | 65 |
| <b>Abb. 4.2:</b> Alternative Hypothesen der Arthropoden Verwandtschaft.....                           | 74 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tab. 2.1:</b> Pipettierschema für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....             | 9  |
| <b>Tab. 2.2:</b> Pipettierschema für die Proteasebestimmung.....                                       | 10 |
| <b>Tab. 2.3:</b> Pipettierschema für die Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Puffer .....      | 11 |
| <b>Tab. 2.4:</b> Pipettierschema für die Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Metallionen ..... | 16 |
| <b>Tab. 2.5:</b> Herstellung von Trenn- und Sammelgel anhand der angegebenen Mengen .....              | 21 |
| <b>Tab. 2.6:</b> Ablauf der Silberfärbung mit Herstellungsangabe der einzelnen Lösungen.....           | 23 |
| <br>   |    |
| <b>Tab. 3.1:</b> Auflistung aller Enzyme des ApiZym Teststreifens .....                                | 29 |
| <b>Tab. 3.2:</b> Bestimmung der Phosphataseaktivität nach den einzelnen Aufreinigungsschritten .....   | 41 |
| <b>Tab. 3.3:</b> Auflistung aller Enzyme des ApiZym Teststreifens .....                                | 45 |



## Zusammenfassung

Phosphatasen gehören zu der Gruppe der Esterasen und katalysieren die hydrolytische Spaltung verschiedener phosphorylierter Verbindungen, darunter auch Phosphomonoester. Bei der Hydrolyse wird die Phosphatkomponente abgespalten. Die Phosphatasen werden aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften in saure- und alkalische Phosphatasen eingeteilt. Das Enzym ist in vielen verschiedenen Gewebearten nachgewiesen worden. Im Gegensatz zu den zellulär auftretenden Phosphatasen, ist jedoch über die Eigenschaften der extrazellulären Phosphatasen bisher nur sehr wenig bekannt. Extrazelluläre Phosphatasen wurden bisher nur bei sehr wenigen Organismen wie z.B. Bakterien und Pilzen, Insekten und wenigen Krebsen nachgewiesen. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen dekapoden Krebsen zeigten jedoch eine besonders hohe Phosphatase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von Hummern. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Flüssigchromatographie und Gelelektrophorese die extrazelluläre Phosphatase des Europäischen Hummers (*Homarus gammarus*) isoliert und die funktionellen und molekularen Eigenschaften untersucht.

Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Die enzymatische Aktivität war im Bereich von pH 5 bis pH 11 nachzuweisen, wobei das Maximum der Aktivität bei pH 9 lag. Das Enzym wurde bereits durch geringe Konzentrationen von  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , L-Cystein, Monophosphat und Adenosindiphosphat inhibiert. Die alkalische Phosphatase verlor 50% ihrer Aktivität bei einer Temperatur von 50°C und nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten. Die Sequenzierung des N-terminalen Endes der Phosphatase ergab eine Homologie zur alkalischen Phosphatase der Eismeergarnele *Pandalus borealis*. Die Sequenzierung einzelner Peptide des Enzyms erwies Homologien zu Phosphatasen und ATPasen von Insekten.

Der Grund für das Auftreten alkalischer Phosphatasen in der Magenflüssigkeit von Hummern ist unklar, denn der pH-Wert der Verdauungsflüssigkeit liegt bei pH 4 bis pH 5. Die extrazellulären Verdauungsenzyme werden zunächst in den Epithelzellen der Mitteldarmdrüse synthetisiert und anschließend für die Verdauung der Nahrungspartikel in den Kaumagen entlassen. Frühere histologische Untersuchungen ergaben, dass hohe Phosphatase Aktivitäten in den F- und B-Zellen der Mitteldarmdrüse vorhanden sind und dort auch nachweislich gebildet werden. Die anschließende Freisetzung der Enzyme erfolgt beim Europäischen Hummer durch die holokrine Sekretion in den Kaumagen. Es scheint also, dass das Auftreten von großen Mengen an Phosphatase auf zytologische Besonderheiten des Hummers beruht und auf die gemeinsame Synthese und gemeinsame holokrine Sekretion mit anderen Verdauungsenzymen zurück zu führen ist. Die katalytischen Eigenschaften und die leichte Gewinnung großer Mengen des Enzyms machen es jedoch zu einem interessanten Objekt für molekularbiologische Anwendungen.



# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| Danksagung.....   | III       |
| Abkürzungsverzeichnis.....  | IV        |
| Abbildungsverzeichnis .....   | VI        |
| Tabellenverzeichnis .....   | VIII      |
| Zusammenfassung.....  | IX        |
| <br>  |           |
| 1. EINLEITUNG .....   | 1         |
| 1.1. Theoretischer Hintergrund .....                                      | 3         |
| 1.1.1 Enzyme .....  | 3         |
| 1.1.2 Phosphatasen.....   | 4         |
| <br>  |           |
| 2. MATERIAL UND METHODEN .....  | 7         |
| <b>2.1 ISOLIERUNG .....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.1.1. Herkunft des Probenmaterials .....                                 | 7         |
| 2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes und der Enzymaktivitäten .....       | 8         |
| 2.1.2.1 Enzymnachweis mit dem ApiZym System.....                          | 9         |
| 2.1.2.2 Bestimmung der Phosphatase-Aktivität .....                        | 9         |
| 2.1.2.3 Bestimmung der Protease-Aktivität.....                            | 9         |
| 2.1.2.4 Schnelltest in Mikrotiterplatten .....                            | 10        |
| 2.1.2.5 Aktivitätsbestimmung in Küvetten.....                             | 10        |
| 2.1.3. Chromatografische Auftrennung der Magenflüssigkeit.....            | 11        |
| 2.2.3.1. Gelfiltration.....   | 12        |
| 2.1.3.2. Anionenaustauschchromatographie (FPLC) .....                     | 13        |
| <b>2.2 CHARAKTERISIERUNG .....</b>  | <b>14</b> |
| 2.2.1. Enzymnachweis mit dem ApiZym System .....                          | 14        |
| 2.2.2 Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die Enzymaktivität.....       | 14        |
| 2.2.3. Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymstabilität .....               | 15        |
| 2.2.4. Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität..... | 15        |
| 2.2.5. Einfluss von Inhibitoren auf die Enzymaktivität.....               | 16        |
| 2.2.5.1. L-Cystein .....  | 16        |
| 2.2.5.2 Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat.....                         | 16        |
| 2.2.5.3. Adenosin 5´ Diphosphat (ADP) .....                               | 16        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.6. Enzymkinetik.....   | 17        |
| 2.2.7. Thermostabilität.....   | 17        |
| 2.2.8. $\alpha$ -Glucosidase .....   | 18        |
| 2.2.9. N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase.....                                   | 18        |
| 2.2.9.1 Aktivitätsgel .....  | 18        |
| 2.2.10. ATPase Aktivität .....   | 19        |
| 2.2.11. Gelelektrophorese.....   | 20        |
| 2.2.11.1. Denaturierung .....  | 21        |
| 2.2.11.2. Aktivitätsgel.....   | 22        |
| 2.2.12. Diskontinuierlicher Western Blot.....                                      | 22        |
| 2.2.13. Isoelektrische Fokussierung .....  | 23        |
| 2.2.13.1 Coomassiefärbung .....  | 24        |
| 2.2.13.2 Silberfärbung .....   | 25        |
| <b>2.3. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG .....</b>                                     | <b>26</b> |
| 2.3.1. Massenspektrometrische Teilsequenzierung der isolierten Proteinbanden.....  | 26        |
| 2.3.2. N-terminale Aminosäuresequenzierung .....                                   | 28        |
| <b>2.4. Bioinformatik und Datenbanken .....</b>                                    | <b>28</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. ERGEBNISSE .....</b>   | <b>29</b> |
| <br>   |           |
| <b>3.1 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG ROHEXTRAKT .....</b>                         | <b>29</b> |
| 3.1.1. Enzymnachweis mit ApiZym .....  | 29        |
| 3.1.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert .....                            | 30        |
| 3.1.3 Abhängigkeit der Enzymstabilität vom pH-Wert.....                            | 32        |
| 3.1.4 Einfluss unterschiedlicher Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität | 33        |
| 3.1.4.1 Zinkchlorid Ionen .....  | 33        |
| 3.1.4.2 Magnesiumchlorid –Ionen .....  | 34        |
| 3.1.5 Enzymkinetik.....  | 35        |
| 3.1.6 Thermostabilität .....   | 35        |
| 3.1.7 Einfluss von Inhibitoren .....   | 36        |
| 3.1.7.1 Natriumdihydrogen Monophosphat.....  | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG</b> .....                                      | <b>38</b> |
| 3.2.1. Gelfiltration .....   | 38        |
| 3.2.2. Anionenaustauschchromatographie (FPLC) .....                                | 39        |
| 3.2.3. Reinigungs- und Anreicherungsschema .....                                   | 40        |
| 3.2.4 Gelelektrophorese .....  | 41        |
| <b>3.3. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER AUFGEREINIGTEN PHOSPHATASE</b> .....    | <b>45</b> |
| 3.3.1 Enzymnachweis mit ApiZym .....   | 45        |
| 3.3.2 $\alpha$ -Glucosidase .....  | 46        |
| 3.3.3 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase.....                                    | 47        |
| 3.3.3.1 Aktivitätsgel.....   | 47        |
| 3.3.4 ATPase Aktivität .....   | 49        |
| 3.3.5 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert .....                            | 49        |
| 3.3.6 Abhängigkeit der Enzymstabilität vom pH-Wert.....                            | 51        |
| 3.3.7 Einfluss unterschiedlicher Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität | 51        |
| 3.3.7.1 Zinkchlorid: .....   | 51        |
| 3.3.7.2. Magnesiumchlorid: .....   | 52        |
| 3.3.8 Einfluss von Inhibitoren auf die Enzymaktivität.....                         | 52        |
| 3.3.8.1 L-Cystein .....  | 52        |
| 3.3.8.2 Natriumdihydrogen Monophosphat .....                                       | 53        |
| 3.3.8.3 Adenosin 5' Diphosphat .....   | 54        |
| 3.3.9 Enzymkinetik.....  | 55        |
| 3.3.10 Temperaturstabilität.....   | 55        |
| 3.3.11 Gelelektrophorese.....  | 57        |
| 3.3.12 Isoelektrische Fokussierung .....   | 58        |
| 3.3.13 Diskontinuierlicher Western Blot.....                                       | 58        |
| 3.3.14 Teilsequenzierung isolierter Enzymbanden .....                              | 59        |
| 3.3.15 N-terminale Aminosäuresequenzierung .....                                   | 61        |
| 3.3.16 SAP-Sequenz und Peptide der Hummer-Phosphatase .....                        | 62        |
| <br>   |           |
| <b>4. DISKUSSION</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>5. AUSBLICK</b> .....   | <b>79</b> |
| Literaturverzeichnis.....  | 81        |
| Anhang .....   | 85        |

## 1. EINLEITUNG

Enzyme spielen in der Biotechnologie, in der Analytik und in der Diagnostik eine immer größere Rolle. Sie werden einerseits in großen Mengen für unterschiedlichste industrielle Produktionsprozesse eingesetzt und andererseits katalysieren sie in kleinstem Maßstab sehr spezifische Reaktionen wie z.B. die Polymerase-Kettenreaktion. Der weltweite Markt für Industrieenzyme beträgt derzeit rund 2 Milliarden US\$. Drei Viertel der industriell verwendeten Enzyme werden in Wasch- und Reinigungsmittel, in der Nahrungsmittel- und Futtermittelindustrie, sowie in der Textilverarbeitung eingesetzt (Ruttloff 1994, Kirk et al. 2002). Hinzu kommt die stark wachsende Produktion von biologischen Kraftstoffen (Stephanopoulos 2007).

Fast alle der kommerziell genutzten Enzyme stammen ursprünglich aus lebenden Organismen. Sie wurden zunächst identifiziert und charakterisiert und ggf. für spezifische Anwendungen isoliert und kloniert. Viele Enzyme wurden aus Bakterien isoliert. Jedoch liefern auch Pflanzen und höhere Tiere wertvolle Enzyme. Der Enzymgehalt pflanzlicher Rohstoffe ist eher gering, dennoch werden unter anderem Amylasen, Proteasen und Papain aus ihnen gewonnen. Trypsin, Chymotrypsin, Amylase und Lipasen sind einige der wichtigsten Enzyme die aus tierischen Organen, Muskel- oder Drüsengewebe gewonnen werden (Ruttloff 1994). Viele Enzyme werden auch aus dem Verdauungstrakt von Tieren gewonnen und ebenfalls industriell eingesetzt wie z.B. das Lab aus Kälbermägen.

Marine Organismen, besonders Krebse, sind für die Enzymproduktion ebenfalls interessant. Bei den Crustaceen findet die Verdauung der Nahrung rein enzymatisch statt (Saborowski et al. 2006). Es wird keine Säure abgesondert wie bei den Wirbeltieren. Verdauungsenzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Zersetzung, Resorption und Speicherung von Nahrungspartikeln und Nährstoffen (P.L. Barker und R. Gibson 1977). Die genaueren Eigenschaften und Funktionsweisen vieler Verdauungsenzyme wurden bisher noch nicht ausreichend untersucht (Saborowski et al. 2004). In diesem Zusammenhang stellt die biochemische Charakterisierung von Verdauungsenzymen mariner Krebsarten ein interessantes und vielversprechendes Forschungsgebiet dar.

Besonderes Interesse wecken die extrazellulären Phosphatasen der Krebse (Kapitel 1.1.2). Intrazelluläre Phosphatasen sind in vielen verschiedenen Gewebearten nachgewiesen worden (Olsen et al. 1991). Im Gegensatz zu den allgemeinen Charakteristika der zellulären Phosphatasen (siehe Kapitel 1.1.2) wurden die biochemischen und analytischen Merkmale extrazellulärer Phosphatasen bisher nur bei sehr wenigen Organismen wie zum Beispiel den Bakterien, Pilzen (Glew et al. 1970) und Pflanzen (Strojsova et al. 2005) nachgewiesen und

charakterisiert. Bei Crustaceen wurde das Auftreten extrazellulärer Phosphatasen bisher nicht systematisch untersucht. Jedoch liegen mehrere Hinweise vor, dass die Magenflüssigkeiten einiger Krebsarten hohe Phosphataseaktivitäten aufweisen (Saborowski et al. 2006). Deshalb wurden zunächst verschiedene Arten dekapoder Krebse aus der Familie der Nephropidae, Brachyura, Anomura und Langusten auf extrazelluläre Phosphatasen hin untersucht. Nur wenige Arten verfügen über eine hohe Aktivität dieses Enzyms. Jedoch wies der Europäische Hummer (*Homarus gammarus*) und der Amerikanische Hummer (*Homarus americanus*) besonders hohe Phosphatase-Aktivitäten auf. Aufgrund der örtlich günstig gelegenen Hummerpopulation in der Nordsee vor Helgoland (Ulrich et al. 1991) wurde der Europäische Hummer als Untersuchungsobjekt für diese Arbeit ausgewählt. *Homarus gammarus* gehört zur Familie der Nephropidae und ernährt sich überwiegend carnivor (P.L. Barker und R. Gibson 1977). Aufgrund seiner Körpergröße produziert der Hummer auch eine größere Menge an Verdauungsflüssigkeit, die sich im Kaumagen ansammelt und dem Tier ohne Schaden entnommen werden kann.

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung und die funktionelle, sowie molekulare Charakterisierung einer extrazellulär auftretenden Phosphatase aus der Magenflüssigkeit des Europäischen Hummers (*Homarus gammarus*). Die zentrale Aufgabe liegt zum einen in der Bestimmung von Einflüssen verschiedener Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Metallionen und Inhibitoren. Zum anderen soll die Phosphatase mit Hilfe von verschiedenen aufeinander abgestimmten chromatographischen Trennmethoden isoliert und charakterisiert werden. Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist die molekulare Charakterisierung des aufgereinigten Enzyms über eine Sequenzanalyse und die Bestimmung des N-Terminus.

Ziel der Arbeit ist es einerseits die Eigenschaften der Phosphatase im Hinblick auf die Physiologie und die Nahrungsverwertung des Hummers zu untersuchen. Vergleiche mit bekannten Phosphatasen anderer mariner und terrestrischer Organismen sollen Hinweise auf den Ursprung und die Funktion der extrazellulären Phosphatase des Hummers geben. Andererseits sollen die katalytischen Eigenschaften der Hummer-Phosphatase im Hinblick auf eine biotechnologische Nutzung geprüft werden.

## 1.1 THEORETISCHER HINTERGRUND

### 1.1.1. Die Enzyme

Enzyme sind Katalysatoren die den Ablauf chemischer Reaktionen beschleunigen oder erst ermöglichen. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung und an der Koordination aller Stoffwechselprozesse in lebenden Organismen beteiligt. Chemisch betrachtet gehören Enzyme zu den Proteinen, bzw. Proteiden. Sie besitzen häufig eine globuläre und flexible Struktur. Aufgrund dieser Eigenschaften sind reversible Konformationsänderungen möglich die nicht nur für die Substratbindung, sondern auch für den katalytischen Mechanismus von großer Bedeutung sind. Ein so genanntes „aktives Zentrum“ ist für die katalytische Wirkung verantwortlich. Dieses aktive Zentrum wird von mehreren Abschnitten einer Peptidkette gebildet und schließt ein Substrat von mehreren Seiten in einer Spalte ein. Die Aminosäuren der Peptidseitenketten greifen in die katalytische Reaktion mit ein. Die Bindung erfolgt über ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken- oder auch hydrophobe Bindungen. Die ionischen Wechselwirkungen können teilweise unter der Mitwirkung von Metallionen wie  $Zn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  erfolgen.

Die Wirkung von Enzymen wird bereits seit Jahrtausenden bei vielen Völkern, wenn auch unbewusst, im täglichen Leben genutzt. Nicht nur die Herstellung von Brot und Bier, sondern auch die Produktion von Sauermilch, Quark, Käse und Essig ist weit verbreitet. Im Jahre 1850 untersuchte der französische Chemiker Louis PASTEUR die Prozesse der Fäulnis und Gärung durch lebende Mikroorganismen. Diese Prozesse werden von ausgeschiedenen Enzymen der Mikroorganismen hervorgerufen. Erst 1878 bezeichnete der deutsche Mediziner Wilhelm Friedrich KÜHNE die rein chemisch wirkenden Katalysatoren als „Enzyme“, abgeleitet vom griechischen Begriff „zyme“ = Hefe.

Im Jahre 1961 hat eine internationale Kommission Regeln für die Einteilung der Enzyme erlassen und eine Nomenklatur erstellt. Demnach gibt es 6 Hauptklassen von Enzymen, die sich aufgrund der Art der enzymkatalytischen Reaktion unterscheiden. Innerhalb dieser Hauptklassen werden die Enzyme nach ihren spezifischen katalytischen Eigenschaften in Unterklassen unterteilt. Alle ausreichend charakterisierten Enzyme sind in einer Liste zusammengestellt und durch eine Klassifizierungsnummer (EC-Nr.) gekennzeichnet. Gemäß dem Enzym-Nomenklatur-Komitee sind zurzeit etwa 3200 Enzyme bekannt (Karlson et al. 1984). In der Natur existieren vermutlich weit mehr als 10000 verschiedene Enzyme.

### 1.1.2. Die Phosphatasen

Die Phosphatasen (EC: 3.1.3) gehören zu der Gruppe der Hydrolasen und, spezieller, zu den Esterasen. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphomonoestern, wobei Phosphat abgespalten wird (Olsen et al. 1991). Aufgrund ihres pH – Optimums werden die Enzyme in saure und alkalische Phosphatasen eingeteilt.

Die sauren Phosphatasen kommen in verschiedenen tierischen Geweben vor wie zum Beispiel den Nieren, der Prostata und im Fettgewebe. Die saure Phosphatase dient aufgrund ihres Auftretens in Lysosomen und im Cytosol auch als Marker für die Identifizierung von subzellulären Zellfraktionen (Blasco et al. 1993). In Weizen, Kartoffeln und anderen Pflanzen sind sie ebenfalls nachgewiesen worden. Sie treten als mono- und auch als dimere Enzyme auf (De Prada et al. 1997) und benötigen keine Metallionen als Cofaktoren (Olsen et al. 1991).

Alkalische Phosphatasen werden dagegen bevorzugt aus Bakterien, niederen Tieren, Organen von höheren Tieren (Leber, Knochen) sowie aus Milch isoliert. Die höchsten Aktivitäten sind in Dünndarm, Knochen, Leber, Gallenwegen und in der Plazenta nachweisbar (De Backer et al. 2002). Die alkalische Phosphatase enthält ein bis zwei Zinkatome pro Untereinheit und benötigt Magnesiumionen als Cofaktor (Olsen et al. 1991). Teilweise werden jedoch auch Calcium Ionen benötigt (De Prada 1997). Viele alkalische Phosphatasen sind im Bereich von 47-62°C thermostabil (Menzorova et al. 2006).

Inhibiert werden die Phosphatasen z.B. durch Fluorid, Arsenit, Arsenat, L-Homoarginin (Olsen et al. 1991) oder L-Cystein (Wöltgens 1977, Zhu et al. 1999). Mit Hilfe von 0,1 – 1% Glucose-, Pyruvat-, Glycerol- und Lactat – Konzentrationen kann die Aktivität gesteigert werden (Sharipova et al. 1999). Die Mikroorganismen benötigen die Phosphatasen um Phosphat von organischen Komponenten ab zu spalten, z.B. wenn anorganisches Phosphat nur limitiert verfügbar ist (De Prada et al. 1997). Mit Hilfe eines osmotischen Schocks zum Beispiel kann das Enzym aus den Zellen der Mikroorganismen freigesetzt werden (Glew et al. 1970).

### Anwendungsgebiete in der Medizin

In der klinischen Diagnostik werden alkalische Phosphatasen als Indikatoren verwendet (Zhu et al. 2006). Beim Menschen kann eine Erhöhung des alkalischen Phosphatase-Spiegels als Indikator für Knochen-, Leber- oder Bauchspeicheldrüsenerkrankungen dienen. Beispiele hierfür sind Prostatakarzinome (Ruttloff 1994), Knochenmetastasen oder auch Vitamin D Mangel (De Backer et al. 2002).

### Anwendungsgebiete in der Lebensmittel Industrie

Die Messung der alkalischen Phosphatase wird für die Kontrolle der Pasteurisierung von Lebensmitteln, z.B. Milch oder Honig, herangezogen (Ruttloff 1994). Alkalische Phosphatasen denaturieren bei rund 72°C nach wenigen Minuten. Bei diesen Temperaturen werden die meisten pathogenen Keime in der Milch zerstört. Für die Kontrolle der Pasteurisierung haben sich 2 Methoden durchgesetzt. Zum Einen wird der *Scharer Test* eingesetzt, durch den Phenol in der Probe nachgewiesen wird. Zum Anderen der *Aschaffenberg & Mullen Test* (Chávarriet et al. 1998) durch den die Freisetzung von p-Nitrophenol untersucht wird. Sind beide Tests negativ, dann wurden auch keine alkalischen Phosphatasen nachgewiesen und die Zerstörung der pathogenen Keime war erfolgreich.

### Anwendungsgebiete in der Analytik

In der Molekularbiologie werden sogenannte *thermolabile Phosphatasen* für die Entfernung von Nukleotiden nach einer DNA/RNA Polymerase Behandlung *in vitro* aus Reaktionsgemischen eingesetzt. Diese Phosphatasen entfernen störende Cofaktoren wie ATP und NADP aus den Gemischen. Bei einer Hitzeeinwirkung von 65°C für 15 Minuten ist das Enzym inaktiviert. Dadurch kann die Reaktion schnell beendet und somit kontrolliert werden. Für die Dephosphorylierung der 5' Enden von Klonierungsvektoren wird häufig eine thermolabile Phosphatase aus Nordmeergarnelen verwendet.

Alkalische Phosphatasen werden ebenso bei immunologischen Analysen zum Beispiel an Antikörper konjugiert und anschließend für ELISA, Western Blot oder histochemische Bestimmungen verwendet.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 ISOLIERUNG

#### 2.1.1 Herkunft des Probenmaterials

Europäische Hummer (*Homarus gammarus*) wurden im Rahmen eines Hummerzuchtprogramms in der Züchtungshalle der Biologischen Anstalt Helgoland gehalten. Während dieser Hälterungszeit konnten von den Tieren wiederholt Proben aus dem Magen entnommen werden ohne die Tiere dabei zu schädigen.



**Abb. 2.1** Einführung des Kunststoffschlauches durch den Ösophagus. Das Tier liegt auf der dorsalen Seite.



**Abb. 2.2** Nach der Einführung des Kunststoffschlauches wurde die Magenflüssigkeit langsam entnommen.

Die Magenflüssigkeit wurde den Tieren mithilfe von Einweg-Injektionsspritzen entnommen, die anstelle einer Injektionsnadel mit einem dünnen Kunststoffschlauch bestückt waren. Die Tiere wurden zunächst aus dem Hälterungsbecken entnommen und auf die dorsale Seite gelegt. Der Schlauch konnte nun vorsichtig durch den Ösophagus in den Magen eingeführt werden (Abb. 2.1).

Pro Tier wurden 1-2 mL (max. 5 ml) Magenflüssigkeit entnommen (Abb.2.2) und jeweils ca. 1 ml in vorbereitete Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proben bei 15000 g für 15 Minuten und bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren und gelagert.

Für vergleichende Untersuchungen wurden bereits entnommene und bei -80°C gelagerte Proben zur Verfügung gestellt. Diese Proben stammten von den Arten *Cancer Pagurus*, *Hyas araneus*, *Discoplax hirtipes*, *Nephrops norvegicus*, *Homarus americanus*, *Birgus latro*, *Lithodes santolla*, *Panulirus interruptus* und *Panulirus inflatus*. Die Messung der Phosphatase-Aktivität erfolgte wie unter Punkt 2.1.2.5 beschrieben.

### **2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes und der Enzymaktivitäten**

Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Folgende Reagenzien wurden benötigt:

1. Proteinstandard: Rinderserumalbumin ( $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in demineralisiertem Wasser)
2. Probe (Proteinextrakt ggf. Verdünnt)
3. Farbreagenz (BioRad, 600-0005)
4. Arbeitsreagenz: Farbreagenz 1:5 mit A. dem. Verdünnt.

Der Reaktionsansatz wurde in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert (Tab. 2.1) und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

**Tab. 2.1** Pipettierschema für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

|  | <b>Lösung</b> | <b>Standard</b> | <b>Testansatz</b> |
|--|---------------|-----------------|-------------------|
| Standard <sup>1</sup>                      | 1             | 0-50 µL         | -                 |
| Probe                                      | 2             | -               | 30 µL             |
| A. dem                                     |               | ad. 50 µL       | 20 µL             |
| Inkubation 5-15 Minuten bei Raumtemperatur |               |                 |                   |
| Messung im Mikrotiterphotometer, 600 nm    |               |                 |                   |

### 2.1.2.1 Enzymnachweis mit dem ApiZym System

Die Proben wurden mit Hilfe einer semiquantitativen Mikro – Bestimmungsmethode, dem ApiZym Testkit (bioMérieux, Nr. 787151501, Frankreich) auf die Präsenz von 19 Enzymen hin untersucht. Ein Teststreifen besteht aus 19 Vertiefungen. In diese Vertiefungen wurden jeweils 50 µL der Probe pipettiert. Anschließend wurden die Streifen bei 30°C für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach tropfenweiser Zugabe der Reagenzien Zym A und Zym B erfolgte die Farbentwicklung. Die visuelle Auswertung der Teststreifen erfolgte nach Angaben der Herstellungsfirma. Die Aktivitäten wurden in Kategorien von „0“ (keine Aktivität) bis „5“ (höchste Aktivität) eingestuft. Der Rohextrakt wurden für den Test 1:10 und die aufgereinigten Proben 1:2 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

### 2.1.2.2 Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Für die Messung der Phosphomonoesterase wurde das Substrat 4-Nitrophenylphosphat disodium salt hexahydrat (Sigma, N4645) verwendet. Die Aktivität der Phosphodiesterase wurde mit dem Substrat bis-(p-Nitrophenyl)phosphat sodium salt (Sigma, N3002) bestimmt.

### 2.1.2.3 Bestimmung der Protease-Aktivität

Für die Messung der Protease-Aktivität wurde das Azo-Casein (Fluka 11615) und folgender Phosphatpuffer verwendet.

Phosphatpuffer pH 6,8

50 mM Natriumdihydrogenphosphat

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat

150 mM Natriumchlorid

---

<sup>1</sup> 0, 10, 20, 30, 40, 50 µL des Standards entsprechen 0, 1, 2, 3, 4, 5 µg BSA im Reaktionsansatz

**Durchführung:**

Es wurden 200  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer mit 20  $\mu\text{L}$  Probe versetzt und für 5 Minuten bei 30°C auf dem Thermoschüttler vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Azo-Casein gestartet (Tab.2.2). Die Proben und Blindwerte wurden bei 30°C für 30 Minuten auf dem Thermomixer inkubiert. Durch die Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  TCA (20%) wurde die Reaktion anschließend gestoppt. Die Cups wurden für wenige Minuten in Eiswasser gekühlt und anschließend bei 15000g für 15 Minuten und 4°C zentrifugiert. Die Messung der Extinktion vom Überstand erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm.

**Tab. 2.2** Pipettierschema für die Proteasebestimmung

| Zugabe                         | Probe             | Blindwert         |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Phosphatpuffer                 | 200 $\mu\text{L}$ | 200 $\mu\text{L}$ |
| Probe                          | 20 $\mu\text{L}$  | -                 |
| Inkubation 30°C für 5 Minuten  |                   |                   |
| Azo-Casein                     | 100 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |
| Inkubation 30°C für 30 Minuten |                   |                   |
| TCA 20%                        | 500 $\mu\text{L}$ | 500 $\mu\text{L}$ |
| Probe                          | -                 | 20 $\mu\text{L}$  |

**2.1.2.4 Schnelltest in Mikrotiterplatten**

In die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  der einzelnen Fraktionen mit 250  $\mu\text{L}$  einer Substrat-Stammlösung (1,3 mM) versetzt. Die Substrate wurden im Universalpuffer pH 10 (pNPP für Phosphatase) oder pH 6 (bis-pNPP für Phosphodiesterase) gelöst. Die Platte wurde einige Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

**2.1.2.5 Aktivitätsbestimmung in Küvetten**

Es wurden 950  $\mu\text{L}$  Puffer mit 50  $\mu\text{L}$  einer 20 mM 4-NPP (bzw. bis-p-NPP) Stammlösung versetzt (Endkonzentration 1 mM). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  Probe (verdünnt) gestartet (Tab.2.3Tab. ). Die Proben und Blindwerte wurden bei 30°C auf einem Thermoschüttler inkubiert bis sich eine leichte Gelbfärbung (Substratumsetzung) erkennen ließ (ca. 15 min). Durch die Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  einer 1 M NaOH-Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die Inkubationszeit notiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=405$  nm photometrisch bestimmt.

**Tab. 2.3** Pipettierschema für die Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Puffer auf die Enzymaktivität

|  | <b>Blindwert</b>  | <b>Probe</b>      |
|--|-------------------|-------------------|
| Puffer (pH 3-12)                       | 950 $\mu\text{L}$ | 950 $\mu\text{L}$ |
| Substrat                               | 50 $\mu\text{L}$  | 50 $\mu\text{L}$  |
| Probe                                  | -                 | 10 $\mu\text{L}$  |
| Start der Reaktion: T=30°C, t = 15 min |                   |                   |
| Stop 1 M NaOH                          | 400 $\mu\text{L}$ | 400 $\mu\text{l}$ |
| Probe (verdünnt)                       | 10 $\mu\text{L}$  | -                 |

Die Aktivität wurde als Änderung der Extinktion pro Zeit und Probenvolumen angegeben.

### 2.1.3 Chromatographische Auftrennung der Magenflüssigkeit

Der Ablauf der chromatographischen Aufreinigung ist zunächst in einer Übersicht dargestellt (Abb. 2.3). Nach der Entnahme der Magenflüssigkeit wurde der Rohextrakt über die G25-Säule entsalzt und umgepuffert. Zudem lassen sich auf diesem Wege eventuell vorhandene Zellfragmente und Schmutzpartikel entfernen. Diese Probe wurde anschließend auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Fraktionen, die eine Phosphatase Aktivität aufwiesen, wurden anschließend durch 2 weitere Anionenaustauschchromatographien aufgereinigt. Für die Aufreinigungen wurde eine FPLC-Sation (Amersham Pharmacia) verwendet.

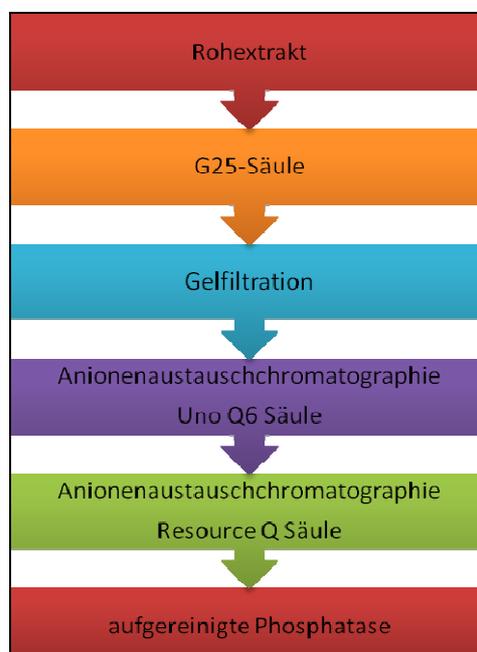
**Abb. 2.3** Abfolge der einzelnen chromatographischen Aufreinigungsschritte



Abb. 2.4 FPLC Systeme zur chromatografischen Auftrennung von Proteinen

### 2.1.3.1 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden verschiedene Moleküle nach ihrer Größe getrennt (Abb. 2.4, linke Seite). Das Trennmedium in der Säule besteht aus porösen sphärischen Partikeln, z.B. Sephadex. Kleinere Moleküle können in diese Poren eindringen und verbleiben während des Durchflusses länger auf der Säule. Größere Moleküle haben hingegen weniger Möglichkeiten in das Säulenmaterial einzudringen und durchlaufen die Säule schneller als kleine Moleküle.

#### Durchführung

Vor Beginn der Gelfiltration wurde 1 mL des Rohextraktes über eine G25 Säule (GE Healthcare, 17-0854-02) vorgereinigt. Nachdem die Probe in die Säule eingesickert war, wurde die Säule mit 1,5 mL des Gelfiltrationspuffers eluiert. Die so vorgereinigte Probe wurde auf die vorher auf 2°C gekühlte Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia, Superdex 200 HiLoad, 16/60) aufgetragen.

Für die Gelfiltration wurde ein Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,5 mit 0,1 M NaCl) verwendet. Die Durchflussrate betrug  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Es wurden 25 Fraktionen á 5 mL gesammelt.

Zu Beginn der Gelfiltration lag die Leitfähigkeit des Elutionspuffers bei ca.  $10 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  und blieb während der gesamten Auftrennung konstant. Die Empfindlichkeit des Analogschreibers wurde, abhängig von der eingesetzten Probemenge, auf 50-100mV eingestellt.

Unmittelbar im Anschluss an die Gelfiltration wurde ein Enzymschnelltest auf Phosphatase und Phosphodiesterase durchgeführt (2.1.2.4). Ebenfalls wurde von jeder Fraktion die Protease-Aktivität bestimmt (2.1.2.3).

Für die Entsalzung und Aufkonzentrierung der Fraktionen wurden Amicon Ultra-15 Membran-Filtrationsröhrchen (Millipore) verwendet. Die entsprechenden Fraktionen wurden nach der Gelfiltration in ein Filtrationsröhrchen pipettiert und für 12 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 5 mL eines Tris/HCl-Puffers (25 mM, pH 8) hinzu pipettiert und die Probe erneut unter den gleichen Bedingungen auf ca. 2 ml konzentriert. Durch die Zugabe des salzfreien Tris/HCl Puffers wurde der Salzanteil im Puffer verringert.

### **2.1.3.2 Anionenaustauschchromatographie**

Zur weiteren Isolierung der Phosphatase wurden zwei Anionenaustauschchromatographie-Schritte durchgeführt. Die hierfür verwendeten Säulen waren die Uno Q6 (BioRad, 720-0003) im ersten Schritt und die Resource Q (Amersham Pharmacia, 17-1177-01) im zweiten Schritt. Die Uno Q6 Säule besitzt ein „continuous bed“ derivatisiert mit  $-N^+(CH_3)_3$  Gruppen. Die Resource Q Säule dagegen besitzt eine Grundmatrix aus monodispersen Polystyren und eine gebundene Matrix aus einer quartären Ammoniumverbindung.

Nach dem Auftragen der Probe binden die Proteinmoleküle zunächst an die Ladungen der stationären Phase. Die steigende Salzkonzentration im Laufe der Auftrennung bewirkt die Verdrängung der Proteine durch  $Cl^-$  und somit deren Elution.

#### Durchführung

Die Flussrate betrug  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  und das Fraktionsvolumen 0,5 mL. Die Empfindlichkeit des Schreibers wurde auf 10 mV bzw. 20 mV eingestellt. Für die Pumpe A wurde ein 25 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) verwendet. Um den Salzgehalt während der Auftrennung zu steigern wurde der gleiche Puffer, jedoch mit 1 M NaCl, eingesetzt.

Nach jedem der beiden FPLC-Läufe wurde ein Enzymschnelltest (s. 2.1.2.4) durchgeführt.

## 2.2. CHARAKTERISIERUNG

### 2.2.1. Enzymnachweis mit dem ApiZym System

Die Proben wurden mit Hilfe der semiquantitativen Mikro – Bestimmungsmethode, dem ApiZym Testkit (bioMérieux, Nr. 787151501, Frankreich) auf die Präsenz von 19 Enzymen hin untersucht. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.1.2.1 beschrieben.

### 2.2.2 Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die Enzymaktivität

Phosphat ist ein Inhibitor für Phosphatasen. Jedoch wird Phosphat häufig als Puffer im pH-Bereich von 5-8 verwendet. Der Universalpuffer besitzt neben weiteren Zusätzen eine Phosphat-Komponente. Der Vorteil dieses Puffers ist sein breites Pufferspektrum von pH 2 bis pH 13. Um einen möglichen negativen Effekt des Phosphat-Anteils zu vermeiden wurden weitere 4 Puffer mit pH-Werten im Bereich von 3 bis 11 getestet und für vergleichende Untersuchungen verwendet.

Diese Puffer waren:

- a) Citratpuffer: 0,1 M Citrat pH 3-4
- b) Acetatpuffer: 0,1 M Essigsäure/Acetat pH 3-5
- c) Tris/HCl-Puffer: 25 mM, pH 8-11
- d) Glycinpuffer: 0,1 M, pH 3 und pH 8-11
- e) Universalpuffer: 25 mM pH 3-11
  - 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
  - 0,1 M Sodium Carbonate
  - 0,1 M 2-Amino-2 methylpropan 1:3 diol
  - 0,1 M Citronensäure

#### Durchführung

Von dem jeweiligen Puffer wurden 950 µL mit 50 µL einer 20 mM 4-NPP (bzw. bis-p-NPP) Stammlösung versetzt (Endkonzentration 1 mM). Die Inkubation und die Messung der Extinktion erfolgten wie unter 2.1.2.5 beschrieben.

### 2.2.3. Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymstabilität

Da der Universalpuffer ein breites Pufferspektrum von pH 3 bis pH 12 besitzt, erfolgte die Bestimmung der Enzymstabilität mit diesem Puffer. Die Proben wurden mit dem Universalpuffer pH 3 bis 12 im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend bei 30°C für 60 Minuten im Thermomixer inkubiert.

Für die Aktivitätsbestimmung wurden 950 µL des Universalpuffers (pH 10) mit 50 µL einer Substrat-Stammlösung (20 mM 4-NPP, bzw. bis-p-NPP) versetzt. (Endkonzentration 1 mM in der Lösung) Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µL der vorinkubierten Probe gestartet. Die Proben und Blindwerte wurden bei 30°C für 60 Minuten auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zugabe von 400 µL einer 1 M NaOH-Lösung beendete die Reaktion. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 405 nm.

### 2.2.4. Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität

Es wurde untersucht, ob unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Metallionen einen positiven oder auch negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Dafür werden MgCl<sub>2</sub> und ZnCl<sub>2</sub> verwendet (Tab.2.4)

850 – 950 µL Tris/HCl, pH 9 wurden mit 0 bis 100 µL einer 0,1 M MgCl<sub>2</sub> Stammlösung (oder 0,1 M ZnCl<sub>2</sub>) und 50 µL einer 20 mM pNPP Stammlösung versetzt (die Endkonzentration des Substrates im Reaktionsansatz war 1 mM). Nach dieser Zugabe hatten alle Reaktionsansätze ein Gesamtvolumen von 1 mL. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µL der Probe gestartet.

Alle Cups wurden für 30 Minuten bei 30°C in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 400 µL einer 1 M NaOH Lösung gestoppt und die Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Cups mit den MgCl<sub>2</sub>-Ansätzen wurden nach dem Stoppen durch das NaOH bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

**Tab. 2.4** Pipettierschema für die Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität

|   | <b>Blindwert</b>          | <b>Probe</b>            |
|---|---------------------------|-------------------------|
| Puffer  | 850 bis 950 $\mu\text{L}$ | 850 – 950 $\mu\text{L}$ |
| 0,1 M $\text{MgCl}_2$ oder<br>0,1 M $\text{ZnCl}_2$   | 0 – 100 $\mu\text{L}$     | 0-100 $\mu\text{L}$     |
| Substrat  | 50 $\mu\text{L}$          | 50 $\mu\text{L}$        |
| Probe (1:10 verdünnt)                                 | -                         | 10 $\mu\text{L}$        |
| Start der Reaktion: $T=30^\circ\text{C}$ ; $t=30$ min |                           |                         |
| 1 M NaOH  | 400 $\mu\text{L}$         | 400 $\mu\text{L}$       |
| Probe (1:10 verdünnt)                                 | 10 $\mu\text{L}$          | -                       |
| Messung bei $\lambda=405$ nm                          |                           |                         |

## 2.2.5. Einfluss von Inhibitoren auf die Enzymaktivität

### 2.2.5.1. L-Cystein

Zu 850 – 950  $\mu\text{L}$  Tris/HCl-Puffer (pH 9) wurden 0 bis 100  $\mu\text{L}$  einer 0,1 M L-Cystein Stammlösung und 50  $\mu\text{L}$  einer 20 mM p-NPP Stammlösung gegeben (Endkonzentration des Substrates im Reaktionsansatz 1 mM). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  des Enzyms gestartet.

Alle Cups wurden für 30 Minuten bei  $30^\circ\text{C}$  auf einem Thermomixer inkubiert. Durch die Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  einer 1 M NaOH-Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die Extinktion 405 nm photometrisch bestimmt.

### 2.2.5.2 Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat

Die Aktivitäten der Phosphatase wurden bei Inhibitorkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 100 mM bestimmt. Die Durchführung erfolgte wie bei der Messung mit L-Cystein.

### 2.2.5.3. Adenosin 5' Diphosphat (ADP)

Die Aktivitäten der Phosphatase wurden bei ADP-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM bestimmt. Die Durchführung entsprach dem Schema der Aktivitätsbestimmung mit L-Cystein.

### 2.2.6. Enzymkinetik

Die Charakterisierung der Phosphatase-Kinetik erfolgte bei Substratkonzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10 mM. Die Reaktionsgeschwindigkeit, also der Substratverbrauch pro Zeiteinheit, wurde dabei bestimmt.

#### Durchführung:

Die Substratendkonzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10 mM im Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 1 mL) wurden durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen an Stammlösungen erzielt. Es wurden Substratstammlösungen mit den Konzentrationen 10 mM, 20 mM, 1 M erstellt. Das Puffervolumen wurde jeweils so angepasst, dass ein Gesamt-Reaktionsvolumen von 1 mL vorlag.

Zu 800-1000  $\mu$ L des 25 mM Tris/HCl Puffers pH 9 wurden 0-200  $\mu$ L Substratlösung hinzu gegeben. Durch die Zugabe von 10  $\mu$ L verdünnter Probe (1:10) wurde die Reaktion gestartet. Nach 5-10 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 400  $\mu$ L 1 M NaOH gestoppt. Kontrollen (Blindwerte) wurden parallel durchgeführt indem die Reaktion zuerst durch die Zugabe der NaOH gestoppt und erst anschließend die Probe hinzu gegeben wurde. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 405 nm photometrisch.

### 2.2.7. Thermostabilität

Die Proben wurden für 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen von 0°C bis 60°C vorinkubiert. Direkt nach der Inkubation wurde eine Aktivitätsmessung (Kapitel 2.1.2.4, Tab.2.3) bei 30°C für 15 Minuten durchgeführt worden.

#### Durchführung

Der Tris/HCl-Puffer (950  $\mu$ L, pH 9) wurde mit 50  $\mu$ L einer 20 mM 4-NPP (bzw. bis-p-NPP) Stammlösung versetzt (Endkonzentration 1 mM). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10  $\mu$ L Probe (1:10 verdünnt) gestartet. Die Inkubationszeit der Proben und der Kontrollen betrug 15 min bei 30°C. Durch die Zugabe von 400  $\mu$ L einer 1 M NaOH Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 405 nm.

### 2.2.8. $\alpha$ -Glucosidase

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Glucosidase erfolgt in einer Mikrotiterplatte mit den Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie.

Substrat: 15 mM p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid (Sigma N-1377)

Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 6,5

Das Substrat wurde in dem Tris/HCl-Puffer gelöst.

#### Durchführung:

Die Probe (20  $\mu$ L) wurde mit 250  $\mu$ L der Puffer/Substrat Mischung versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 30 Minuten. Die Reaktion wurde mit 20  $\mu$ L einer 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Messung erfolgte photometrisch bei 405 nm. Als Blindwert diente die geringste gemessene Extinktion.

### 2.2.9. N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase

Diese Messung wurde ebenfalls in einer Mikrotiterplatte mit den Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Substrat: 0,3% 4-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamide (Sigma-N9376)

Puffer: 0,2 M Natrium Citrate und 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat pH 5,5

Das Substrat wurde in dem Citrat-Phosphat-Puffer gelöst.

#### Durchführung:

Fünfzig  $\mu$ L einer unverdünnten Probe wurden mit 50  $\mu$ L Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,5 für 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50  $\mu$ L Substrat gestartet. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 30°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100  $\mu$ L einer 0,01 M NaOH-Lösung gestoppt. Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 405 nm.

#### 2.2.9.1 Aktivitätsgel

Substrat: 0,1mM Methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide (Sigma)

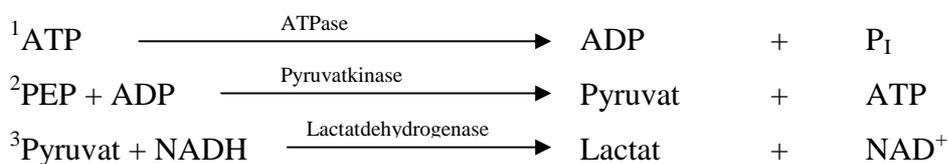
Puffer: 0,2 M Natrium Citrate und 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat pH 5,5

Die Durchführung wie unter Punkt 2.2.11.2 beschrieben.

Das Substrat wurde zunächst in 1 mL DMSO gelöst und anschließend in 50 mL CPP-Puffer überführt. Die Inkubationszeit des Gels in der Substratlösung betrug ca. 10 bis 15 Sekunden.

### 2.2.10. ATPase Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach [Palmgren \(1990\)](#). Die gekoppelte enzymatische Reaktion verläuft nach dem folgenden Schema:



ATP wird durch die ATPase in der Probe zu ADP und freiem Phosphat gespalten<sup>1</sup>. Phosphoenolpyruvat reagiert anschließend mit dem freigewordenen ADP unter Einfluss der Pyruvatkinase zu ATP und Pyruvat<sup>2</sup>. Die Umsetzung von 1 Mol Pyruvat durch die Pyruvatkinase erfolgt zeitgleich zur Umsetzung von ADP zu ATP<sup>2</sup>. Die ATPase Aktivität ist an die Oxidation von NADH durch die Lactatdehydrogenase gekoppelt<sup>3</sup>. Ein Molekül Pyruvat wird gemeinsam mit NADH mittels Lactatdehydrogenase zu Lactat und NAD<sup>+</sup> umgesetzt<sup>3</sup>. Die Konzentration an ADP, welche durch die ATPase<sup>1</sup> gebildet wurde, ist proportional zur Bildung von ATP<sup>2</sup>, als auch zur Umsetzung von NADH zu NAD<sup>+</sup>. Dadurch, dass die Oxidation des NADH an die ATPase Aktivität gekoppelt ist, ist diese somit ein Maß für die ATPase Aktivität.

#### Durchführung:

*TEA-Puffer:* 0,1 M Triethanolamin-Puffer pH 7,6

*Pyruvatkinase:* 2000 µg·mL<sup>-1</sup> (1000 Units, P-7768, Sigma)

*Lactatdehydrogenase:* Hierbei wurden 50 µL einer 5 mg·mL<sup>-1</sup> Stammlösung verwendet (Nr. 11978543, Roche).

Stammlösungen der folgenden Substanzen wurden in TEA-Puffer pH 7,6 hergestellt. Die im Folgenden angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf ein Endvolumen von 1 mL in der Küvette: 2 mM ATP; 1 mM EDTA; 1 mM PEP; 1 mg·mL<sup>-1</sup> BSA; 1 mM DTT; 140 mM KCl;

4 mM MgCl<sub>2</sub>. Die 0,25 mM NADH Lösung wird frisch und mit 1 mM Phosphoenolpyruvat hergestellt.

Fünfzig µL der Stammlösungen von ATP, EDTA, BSA, DTT, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NADH, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase wurden zu 530 µL TEA-Puffer in Glasküvetten pipettiert. Die Küvetten wurden bei 30°C für 3 Minuten im Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 20 µL Probe gestartet. Die Aufzeichnung der Extinktion erfolgte für 4 Minuten bei 340 nm. Als Blindwert diente die Extinktion einer Küvette ohne Probenzugabe.

### 2.2.11. Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) nach [Laemmli \(1970\)](#) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Die Trennung beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten der Proteine im Gel und ist von ihrer Größe sowie vom Vernetzungsgrad des Acrylamids abhängig. Die Porengröße hängt hierbei von der Konzentration des Crosslinkers C (%) und der Gesamtkonzentration der Monomere T (%) umgekehrt proportional ab.

$$T\% = \frac{g_{\text{Acrylamid}} + g_{\text{Bisacrylamid}}}{\text{Gesamtvolumen}} * 100 \quad C\% = \frac{g_{\text{Bisacrylamid}} * 100}{g_{\text{Bisacrylamid}} + g_{\text{Acrylamid}}}$$

*Lösungen für die Gele:*

- 1) Acrylamid 30%
- 2) *Trenngelpuffer*: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- 3) *Sammelgelpuffer*: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
- 4) 10%ige Natriumdodecylsulfat Lösung (SDS)
- 5) 10%ige Ammoniumpersulfat Lösung (APS)
- 6) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 7) *5x Elektrodenpuffer pH 8,3*:
  - 0,025 M Tris
  - 0,192 M Glycin
  - 0,1% SDS

8) *Probenpuffer:*

2,0 mg Bromphenolblau

2,5 mL Sammelgel Puffer

3,0 mL Glycerin

4 mL 10% SDS

Auffüllen auf 10 mL mit demineralisiertem Wasser

Die Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt (Tab. 2.5) und in einem Gel-Caster (Hoefler Mighty small) gegossen. Die Gelgröße war 8 x 10 cm.

**Tab. 2.5** Herstellung von Trenn- und Sammelgel anhand der angegebenen Mengen

| Lösungen        | Trenngel (mL) | Sammelgel (mL) |
|-----------------|---------------|----------------|
|                 | 12% T, 2,7% C | 4% T, 2,7% C   |
| A.dem           | 4,18          | 2,80           |
| Trenngelpuffer  | 3,13          | ----           |
| Sammelgelpuffer | ----          | 1,0            |
| Acrylamid (30%) | 5,0           | 0,6            |
| SDS (10%)       | 0,125         | 0,045          |
| APS (10%)       | 0,063         | 0,022          |
| TEMED           | 0,01          | 0,01           |
| Gesamtvolumen   | 12,5          | 4,5            |

Nach dem Polymerisieren wurden die Gele in die Elektrophoresekammer geklemmt. Diese wurde anschließend mit 250 mL, bzw. 400 mL Elektrodenpuffer (Lösung 7; 1:5 verdünnt) befüllt. Die Proben wurden 1:2 mit der Lösung 8 verdünnt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Stromstärke betrug 15 mA pro Gel. Der Lauf dauerte ca. 1 Stunde bei kleinen Gelen und 1,5 Stunden bei größeren Gelen. Die Spannung betrug 15mA pro Gel und der Strom wurde auf 300V eingestellt.

#### 2.2.11.1. Denaturierung

Zur Bestimmung des Molekulargewichts sind die Proben denaturiert worden. Vor dem Auftragen wurde die Probe mit dem Probenpuffer im Verhältnis 1:2 verdünnt. Der Probenpuffer enthielt zusätzlich 5% Mercaptoethanol. Die Denaturierung der Proben auf dem Thermoschüttler dauerte 15 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf das SDS Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese ist das Gel mit A. dem. gewaschen und mit Coomassie (siehe Kapitel 2.3.13.1) angefärbt worden.

### 2.2.11.2. Aktivitätsgel

#### Puffer für den sauren Bereich:

0,1 M Essigsäure/Acetat, pH 4

0,1 M Essigsäure/Acetat, pH 5

#### Puffer für den alkalischen Bereich:

25 mM Tris/HCl, pH 9

25 mM Universalpuffer, pH 10

Die Proben wurden nicht denaturiert, da sie sonst ihre Aktivität verloren hätten. Nach dem Lauf wurden die Gele zuerst mit A. dem gewaschen und anschließend in 50 mL Puffer mit 2,5% Triton für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gele ebenfalls mehrfach mit demineralisiertem Wasser gründlich gewaschen. Die Gele wurden für 5 Minuten in 50 mL Puffer mit 1mM Methylumbelliferyl-Phosphat (gelöst in DMSO) inkubiert. Die Betrachtung des Geles erfolgte unter UV-Licht.

### 2.2.12. Diskontinuierlicher Western Blot

Die Trennung der Proteine erfolgt zunächst über die SDS-PAGE. Anschließend werden diese auf eine dünne Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF Pro Blott Membranes, Nr. 0507038 Applied Biosystems) übertragen. Das Gel wird auf die Membran platziert und anschließend wurde eine Spannung senkrecht zur Gelebene angelegt.

Es wurden für die Anode und für die Kathode unterschiedliche Blotting-Puffer eingesetzt (diskontinuierlicher Western Blot).

*Anode-Puffer:* 50 mM Borax (Natrium-tetraborat), 15% Methanol, pH 9,4

*Kathode-Puffer:* 50 mM Borax s.o.; 0,1% SDS

100% Methanol zum vorinkubieren der PVDF Membran und zum Entfärben der Membran

#### Durchführung:

Die SDS-Gele wurden nach der Proteinauftrennung kurz mit demineralisiertem Wasser gewaschen und für 5 Minuten im Kathoden-Blotpuffer vorinkubiert. Die ersten 3 Lagen eines dickeren Filterpapiers und 2 Lagen eines dünneren Filterpapiers wurden mit dem Anode-

Puffer gut getränkt und auf das Blotting Gerät (BioRad Transfer-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell) gelegt. Eventuelle Luftblasen wurden entfernt indem ein Glasröhrchen vorsichtig über das Filterpapier gerollt wurde. Die Membran wurde zunächst in 100% Methanol für 2 Minuten aktiviert und anschließend für 30 Minuten im Anode-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf das Filterpapier gelegt. Die Platzierung der SDS-Gele erfolgte nun passend und mittig auf die Membran. Weitere 3 Lagen eines dickeren Filterpapiers und 2 dünnere Lagen wurden im Kathode-Puffer getränkt und anschließend über dem Gel platziert. Durch erneutes Rollen mit dem Glasröhrchen wurden neu entstandene Luftblasen entfernt. Überschüssiger Puffer wurde mit einem Papiertuch sorgfältig entfernt. Das Gerät wurde verschlossen und ein Strom von  $1,5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  angelegt. Der Transfer dauerte 1 Stunde.

Anschließend wurde die Membran zunächst mit demineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend in 100% Methanol gelegt. Das Methanol verdrängt dabei das restliche Wasser. Die trockene Membran wurde dann in eine Coomassie Färbelösung (siehe Kapitel 2.2.13.1) gelegt. Sobald die Banden nach einigen Minuten sichtbar wurden wurde die Membran kurz mit 100% Methanol entfärbt und getrocknet.

### **2.2.13. Isoelektrische Fokussierung**

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine hochauflösende Technik für die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Ladung. Der Isoelektrische Punkt (pI) beschreibt den pH-Wert, bei dem das Protein eine ausgeglichene Nettoladung annimmt. In einem pH-Gradienten wandert das geladene Protein bis es an seinem pI keine Nettoladung mehr aufweist und dort verbleibt.

Für die Durchführung wurde das PhastSystem (Amersham Biosciences) und die PhastGel IEF 3-9 Gele (GE Healthcare, 17-0543-01) verwendet. Die Gele bestehen aus einem homogenen Polyacrylamid Medium aus 5% T und 3% C. Sie beinhalten 2-6% Pharmalyte, die während des Laufes einen stabilen linearen pH Gradienten innerhalb des Gels erzeugen.

#### Probenvorbereitung:

Die Proben müssen weitestgehend entsalzt werden, da zu hohe Salzgehalte die Trennung negativ beeinflussen. Die Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen und nicht, wie bei der SDS-PAGE, mit einem Probenpuffer versetzt.

Durchführung:

Das PhastGel IEF 3-9 wurde in dem PhastSystem auf der markierten Fläche platziert. Die IEF umfasste 3 Schritte:

1. Vorfokussierung: Aufbau des pH-Gradienten
2. Auftragung der Probe
3. Fokussierung und Entfernung des Probenkamms

Nachdem das Gel platziert war, wurde die Methode 1 (PhastGel 3-9) gestartet. Das Programm lief automatisch ab und dauerte ca. 30 Minuten.

Programmschritte der Methode 1:

SEP 1.1 2000V 2,5 mA 3,5 W 15°C 75 Vh

SEP 1.2 200V 2,5 mA 3,5 W 35°C 15 Vh

SEP 1.3 2000V 2,5 mA 3,5 W 35°C 410 Vh

Fixierung und Anfärbung:

Nach der Isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel zunächst 5 Minuten in 20% TCA fixiert. Anschließend wurde es für 10 Minuten in einem Gemisch aus 30% Methanol/ 10% Essigsäure gewaschen. Die Anfärbung erfolgte wie bei der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue (2.2.13.1).

**2.2.13.1 Coomassiefärbung**

Die Anfärbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue bewirkte eine Fixierung und gleichmäßige Blaufärbung der Banden. Die Gele wurden anschließend wieder entfärbt um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

*Färbelösung:* 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% Methanol, 10% Essigsäure

*Entfärbelösung:* 40% Methanol, 7% Essigsäure

### 2.2.13.2 Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde das Silver Staining Kit, Protein Plus One (Amersham Pharmacia Biotech AB, 17-1150-01) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte exakt nach den Anweisungen des Herstellers (Tab.2.6):

**Tab. 2.6** Ablauf der Silberfärbung mit Herstellungsangabe der einzelnen Lösungen

| Schritt                | Lösungen  | Inkubationszeit |
|------------------------|---|-----------------|
| <b>Fixierung</b>       | Ethanol   | 100mL           |
|                        | Essigsäure  | 25mL            |
|                        | Mit A.dem auf ein Gesamtvolumen von 250mL auffüllen |                 |
|                        | 30min   |                 |
| <b>Sensitivierung</b>  | Ethanol   | 75mL            |
|                        | Glutardialdehyd (25% w/v)                           | 1,25mL          |
|                        | Sodium Thiosulfat (5% w/v)                          | 10mL            |
|                        | Natriumacetat (17g)                                 | 1 Packung       |
|                        | Mit A.dem auf ein Gesamtvolumen von 250mL auffüllen |                 |
| <b>Waschen</b>         | Destilliertes Wasser                                | 3x5min          |
| <b>Silber Reaktion</b> | Silber Nitrat Lösung (2,5% w/v)                     | 25mL            |
|                        | Formaldehyd (37% w/v)                               | 100µL           |
|                        | Mit A.dem auf ein Gesamtvolumen von 250mL auffüllen |                 |
|                        | 20 min  |                 |
| <b>Waschen</b>         | Destilliertes Wasser                                | 2x1min          |
| <b>Entwicklung</b>     | Natriumcarbonat (6,25g)                             | 1 Packung       |
|                        | Formaldehyd (37% w/v)                               | 50µL            |
|                        | Mit A.dem auf ein Gesamtvolumen von 250mL auffüllen |                 |
|                        | 2-5 min   |                 |
| <b>Stoppen</b>         | EDTA-Na <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O (3,65g)     | 1 Packung       |
|                        | Mit A.dem auf ein Gesamtvolumen von 250mL auffüllen |                 |
|                        | 10min   |                 |
| <b>Waschen</b>         | Destilliertes Wasser                                | 3x5min          |

## 2.3. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG

### 2.3.1. Massenspektrometrische Teilsequenzierung der isolierten Proteinbanden

Zunächst wurden die Proben mit der Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die als Phosphatase identifizierten Banden vorsichtig mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Diese Gelfragmente wurden in ein Eppendorf Cup überführt und über Nacht gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4 LSC). Die getrockneten Proben wurden anschließend für die Massenspektrometrische Sequenzierung nach Leipzig in das Helmholtzzentrum für Umweltforschung, AG Proteomics, geschickt. Dort wurden die Gele nach folgendem Schema behandelt:

#### Trypsin-Verdau

##### Lösungen:

- A: Waschpuffer: 200 mM Ammoniumbicarbonat  
B: Entfärber: 200 mM Ammoniumbicarbonat  
50% Acetonitril  
C: Verdau: 20 mM Ammoniumbicarbonat  
5% Acetonitril

Nachdem die Spots ausgeschnitten wurden, sind 100 µL vom Puffer A hinzugegeben worden. Die Gelfragmente wurden für 30 Minuten bei 37°C im Thermoschüttler (1400 rpm) inkubiert. Anschließend ist das Kondensat abzentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen und 100 µL von Puffer B wurden hinzupipettiert. Das Cup wurde erneut für 30 Minuten auf dem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert (1400 rpm). Das Kondensat wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis der Spot ausreichend entfärbt wurde. Anschließend wurden 100 µL von Puffer C hinzupipettiert. Das Cup wurde erneut für 30 Minuten bei 37°C und 1400 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Nachdem das Kondensat wiederum abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, wurden 20-50 µL 100% Acetonitril hinzugegeben. Das Cup wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Probe für 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert. Nachdem das Trypsin hinzugegeben wurde, sind die Proben über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert worden. Am nächsten Tag wurden die Cups zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 15 µl Acetonitril

(100%) wurden auf das Gelfragment pipettiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand kam ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß und die gesamte Lösung wurde in der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Dieser Vorgang dauerte in etwa 1 bis 1,5 Stunden.

#### Herstellung der Trypsin-Lösung:

eine Flasche Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega), 20 µg

dazu 200 µl Trypsin Resuspensions Puffer

portionieren (je 20 µl)

zu diesen 20 µl 400 µl Puffer C (20 mM Ammoniumbicarbonat + 5% Acetonitril)

zu jedem Eppi 21 µl zugeben

#### **nach dem Trypsin Verdau:**

- die völlig eingeeengten Proben in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure) aufnehmen
- 10 min bei 20°C im Thermoschüttler schütteln (1400 rpm)

#### **Probenvorbereitung mit Zip Tip für ESI**

##### Lösungen:

Lösung 1: 50% Acetonitril + 0,1% TFA

Lösung 2: 0,1% TFA

Lösung 3: 60% Acetonitril + 0,1% TFA

##### Durchführung:

Entsorgung mit Zip Tip<sub>C18</sub>-Spitzen

1. Spitze in Lösung 1 → langsam 10 µl ansaugen, langsam wieder entleeren
2. Spitze in Lösung 2 → langsam 10 µl ansaugen, langsam wieder entleeren
3. Spitze in Probe → 10 mal ansaugen, langsam wieder entleeren
4. Spitze in Lösung 2 → langsam 10 µl ansaugen, langsam wieder entleeren
5. Wiederholung: Spitze in Lösung 2
6. Spitze in Lösung 3 → bis kurz über die Markierung der Spitze ansaugen, langsam in ein neues Eppi geben und ca. 5 mal ansaugen und entleeren.

Jeweils 10 µl der Lösungen 1 + 2 wurden verworfen. Die Proben wurden eingengt, in ESI-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 20°C im Thermoschüttler bei 1400 rpm geschüttelt.

### **2.3.3. N-terminale Aminosäuresequenzierung**

Diese N-terminale Sequenzierung wurde nicht selbst durchgeführt sondern bei der Firma Proteome Factory AG, D-10117 Berlin in Auftrag gegeben. Die Proteinsequenz wurde vorher auf eine PVDF Membran geblottet und mit Coomassie angefärbt. (siehe Kapitel 2.3.2, diskontinuierlicher Westernblot). Die übertragenen, isolierten Phosphatase-Banden wurden anschließend vorsichtig mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf Cup überführt. Die Probe ließ sich anschließend bis zum Versenden per Post bei 4°C im Kühlschrank lagern.

Die Firma Proteome Factory setzte für die Sequenzierung einen Applied Biosystems Model 491 Procise Edman Sequencer mit online ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyser ein. Die N-terminale Sequenzierung des Proteins verläuft nach dem Schema des Edman-Abbaus. Die freie N-terminale Aminosäure wird mit Phenylisothiocyanat (PITC) unter alkalischen Bedingungen (pH 8) markiert. Anschließend erfolgt die Abspaltung der markierten Aminosäure. Als Produkt entsteht eine Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-AS) und ein Restpeptid. Mit dem Restpeptid wird dieser Zyklus beliebig wiederholt. Die PTH-AS werden chromatographisch bestimmt.

## **2.4. Bioinformatik und Datenbanken**

Die KM-Werte der Phosphatase wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism erstellt. Die Suche nach homologen Aminosäure Sequenzen wurde in der NCBI-Datenbank mit dem Programm Blast (Altschul et al. 1990) durchgeführt. Alignments wurden mit dem Programm ClustalW ([www.ebi.ac.uk/tools/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw)) erstellt (Thompson et al. 1994).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. CHARAKTERISIERUNG ROHEXTRAKT

##### 3.1.1. Enzymnachweis mit ApiZym

Der Rohextrakt wurde für die Api-Zym Teststreifen 1:10 mit A. dem. verdünnt. Eine sehr intensive Farbentwicklung war bei den Phosphatasen (siehe Markierung in Tab. 3.1) zu verzeichnen (Abb. 3.1). Die semiquantitative Auswertung (Tab. 3.1) zeigt, dass einige der Enzyme sehr aktiv sind. Die Phosphatasen wurden mit einer Intensität von „5“ eingestuft und farblich unterlegt (Tab. 3.1).  $\alpha$ -Galactosidase und  $\alpha$ -Mannosidase konnte in der Magenflüssigkeit nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3.1:** ApiZym Teststreifen nach Inkubation und Farbentwicklung. Die Enzymaktivität ist proportional zur Intensität der Färbung

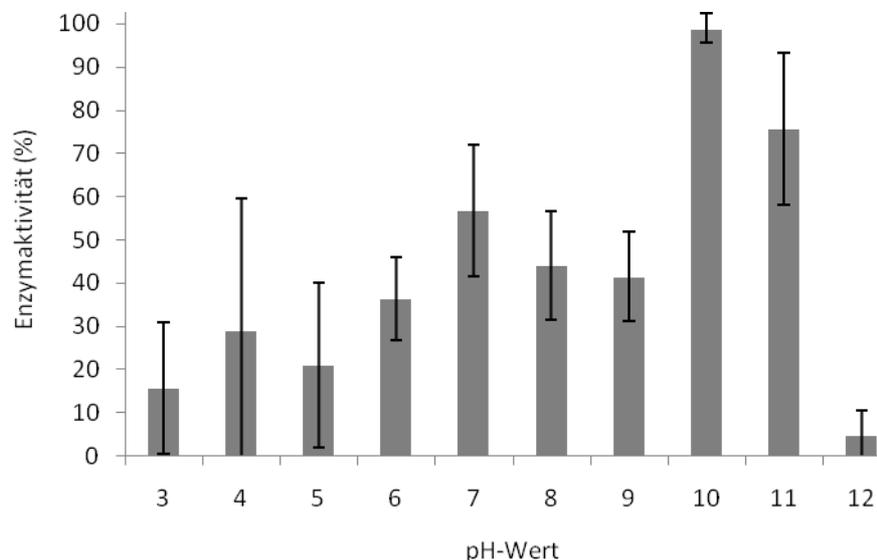
**Tab. 3.1:** Auflistung aller Enzyme des ApiZym Teststreifens und Bewertung der farblich entwickelten Enzymaktivität von "0" (nicht aktiv) bis "5" (hoch aktiv)

| Nr. | Enzymnachweis                      | Substrat  | pH-Wert | Magenflüssigkeit |
|-----|------------------------------------|---|---------|------------------|
| 1   | Kontrolle                          | -   | -       | 0                |
| 2   | Alkalische Phosphatase             | 2 Naphtylphosphat                                     | 8,5     | 5                |
| 3   | Esterase (C4)                      | 2 Naphtylbutyrat                                      | 6,5     | 2                |
| 4   | Esterase Lipase (C8)               | 2 Naphtylcaprylat                                     | 7,5     | 2                |
| 5   | Lipase (C14)                       | 2 Naphtylmyristat                                     | 7,5     | 1                |
| 6   | Leucin Arylamidase                 | L - Leucyl - 2 - Naphtylamid                          | 7,5     | 5                |
| 7   | Valin Arylamidase                  | L - Valyl - 2 - Naphtylamid                           | 7,5     | 3                |
| 8   | Cystin Arylamidase                 | L - Cystyl - 2 - Naphtylamid                          | 7,5     | 2                |
| 9   | Trypsin                            | N- Benzoyl - DL - Arginin - 2 - Naphtylamid           | 8,5     | 5                |
| 10  | $\alpha$ -Chymotrypsin             | N - Glutaryl - Phenylalanin - 2 Naphtylamid           | 7,5     | 5                |
| 11  | Saure Phosphatase                  | 2 Naphtyl - Phosphat                                  | 5,4     | 5                |
| 12  | Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase     | Naphtol - AS - BI - Phosphat                          | 5,4     | 5                |
| 13  | $\alpha$ -Galactosidase            | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\alpha$ -D - Galactopyranosid | 5,4     | 0                |
| 14  | $\beta$ -Galactosidase             | 2 - Naphtyl - $\beta$ -D - Galactopyranosid           | 5,4     | 4                |
| 15  | $\beta$ -Glucuronidase             | Naphtol - AS - BI - $\beta$ -D - Glucuronid           | 5,4     | 5                |
| 16  | $\alpha$ -Glucosidase              | 2 Naphtyl - $\alpha$ -D - Glucopyranosid              | 5,4     | 5                |
| 17  | $\beta$ -Glucosidase               | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\beta$ -D - Glucopyranosid    | 5,4     | 3                |
| 18  | N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase | 1 - Naphtyl - N - Acetyl - $\beta$ -D - Glucosaminid  | 5,4     | 5                |
| 19  | $\alpha$ -Mannosidase              | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\alpha$ -D - Mannopyranosid   | 5,4     | 0                |
| 20  | $\alpha$ -Fucosidase               | 2 - Naphtyl - $\alpha$ -L - Fucopyranosid             | 5,4     | 4                |

### 3.1.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

Für die Bestimmung der pH-Profile wurden die Magenflüssigkeiten von mehreren Individuen verwendet. Die Aktivitäten wurden bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von pH 3 bis pH 12 mit dem Universalpuffer und dem Substrat p-NPP gemessen. Im Bereich von pH 3 und pH 4 streuten die Einzelmesswerte der Tiere besonders stark (Abb. 3.2). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei einigen Individuen nach dem Start der Reaktion Präzipitate auftraten. Die Trübung blieb während der gesamten Reaktionszeit bestehen. Erst nach der Zugabe von 1 M NaOH erschien die gelbliche Färbung des Produktes.

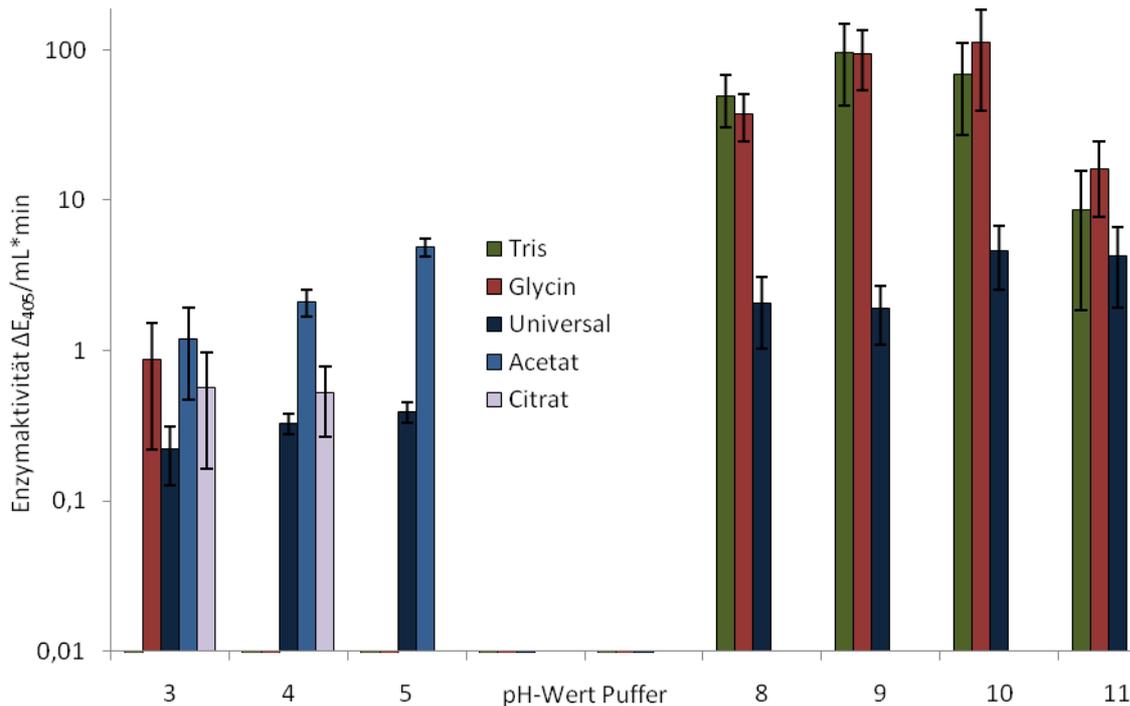
Das Enzym zeigte eine erhöhte Aktivität bei pH 7 und eine besonders hohe Aktivität bei pH 10.



**Abb. 3.2:** pH-Profil der Phosphomonoesterase von *H. gammarus* gemessen in Universalpuffer und mit dem Substrat p-NPP (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10)

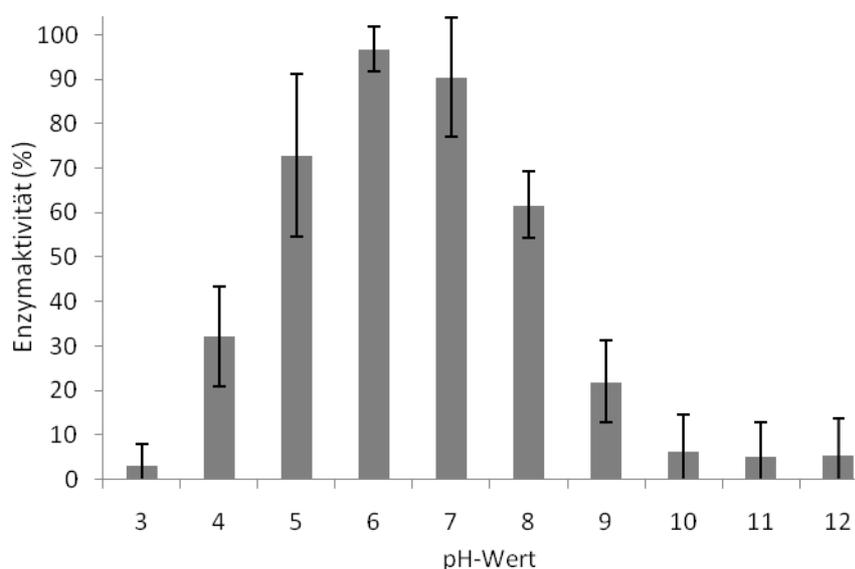
Da Phosphat eine inhibierende Wirkung auf die Phosphatase hat (Glew und Heath 1970) wurden weitere nicht-phosphathaltige Puffer im alkalischen und sauren Bereich getestet.

Enzymtests mit dem Tris/HCl-Puffer als auch mit dem Glycinpuffer (Abb. 3.3) zeigten rund zehn Mal höhere Aktivitäten als Tests mit dem Universalpuffer (Abb. 3.2). Für die weiteren Charakterisierungen im alkalischen Bereich wurde ein Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 9) als Standardpuffer verwendet.

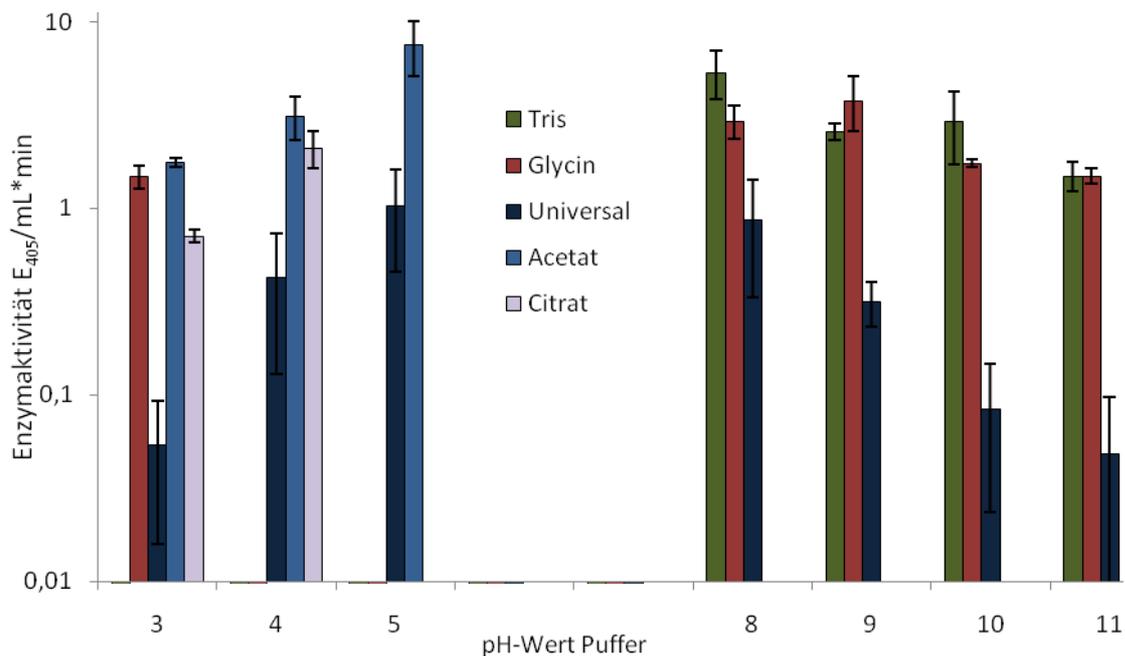


**Abb. 3.3:** pH-Profil der Phosphomonoesterase von *H. gammarus* gemessen mit verschiedenen Puffern und mit dem Substrat p-NPP (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ ).  
Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Ordinate.

Im Gegensatz zur Phosphomonoesterase zeigte die Phosphodiesterase mit dem Universalpuffer ein ausgeprägtes Optimum im Bereich von pH 5 bis pH 7 (Abb. 3.4). Im alkalischen Bereich (pH 10 – 12) war hingegen nur eine sehr geringe Aktivität zu verzeichnen. Ein Ausfallen der Probe im sauren Bereich wie bei der Monophosphatase konnte bei den Diphosphatase-Messungen nicht festgestellt werden.



**Abb. 3.4:** pH-Profil der Phosphodiesterase von *H. gammarus* gemessen mit dem Universalpuffer und mit dem Substrat bis-p-NPP (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 10$ )

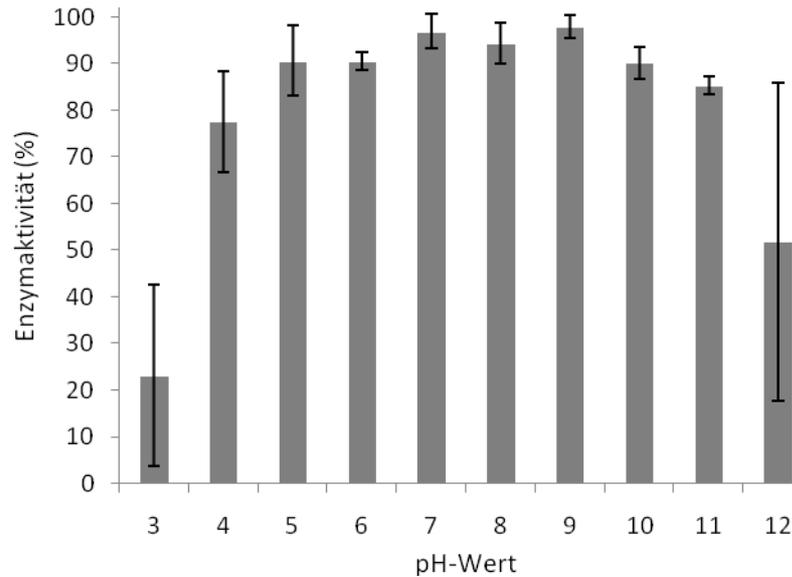


**Abb. 3.5:** pH-Profil der Phosphodiesterase von *H. gammarus* gemessen mit verschiedenen Puffern und mit dem Substrat bis-p-NPP (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 3). Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Ordinate.

Sowohl mit dem Tris-Puffer als auch mit dem Glycinpuffer war eine Aktivitätszunahme im alkalischen Bereich um den Faktor 10 zu verzeichnen (Abb. 3.5). Auch die Phosphodiesterase wurde durch das Phosphat gehemmt. Die Hemmung war am stärksten im alkalischen Bereich von pH 9 bis pH 11. Ebenso war eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 10 im sauren Bereich beim Acetat- und Citrat Puffer festzustellen. Für die pH Werte 6 und 7 konnte keine Alternative zum Phosphatpuffer eingesetzt werden. Auffällig war jedoch, dass zum neutralen Bereich hin, also pH 5 und pH 6, sich die Aktivitätsunterschiede der einzelnen Puffer im Bezug zum Universalpuffer verringern (Abb. 3.5).

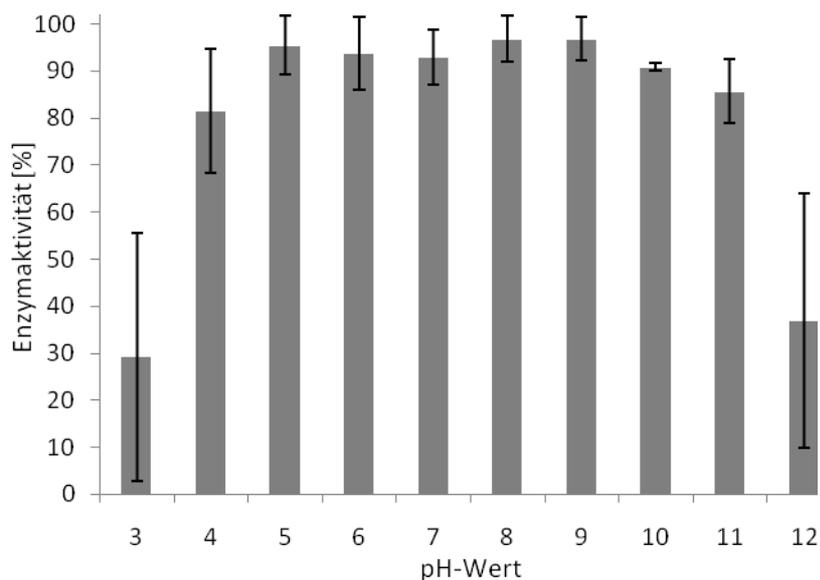
### 3.1.3 Abhängigkeit der Enzymstabilität vom pH-Wert

Aufgrund des breiten Pufferspektrums wurde die Enzymstabilität mit dem Universalpuffer ermittelt. In einem weiten pH Bereich von pH 4 bis pH 11 wiesen sowohl die Phosphomonoesterase (Abb. 3.6), als auch die Phosphodiesterase (Abb. 3.7) eine fast gleich bleibend hohe Aktivität auf. Die höchste Variabilität der Enzymaktivität war im extrem sauren (pH 3) und extrem alkalischen Bereich (pH 12) zu verzeichnen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.6:** Enzymstabilität der Phosphomonoesterase mit unterschiedlichen pH-Werten. Die Proben wurden bei den jeweiligen pH-Werten 60 min lang inkubiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei pH 10.

(Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10)



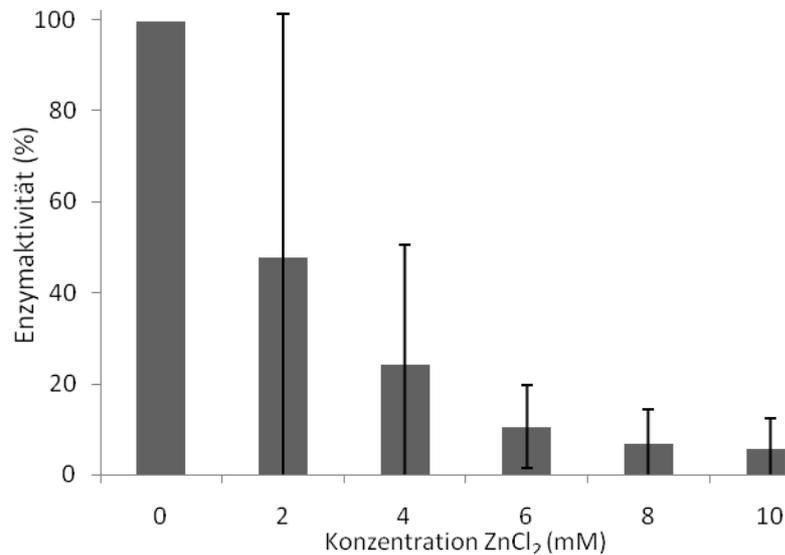
**Abb. 3.7:** Die Proben wurden bei den jeweiligen pH-Werten 60 min lang inkubiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei pH 6. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10)

### 3.1.4 Einfluss unterschiedlicher Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität

#### 3.1.4.1 Zinkchlorid Ionen

Des Weiteren wurde der Einfluss von  $\text{ZnCl}_2$  auf die Enzymaktivität getestet. Die Aktivität der Phosphatase sank bei der Zugabe der Zinkchlorid-Ionen drastisch ab. Bereits bei einer

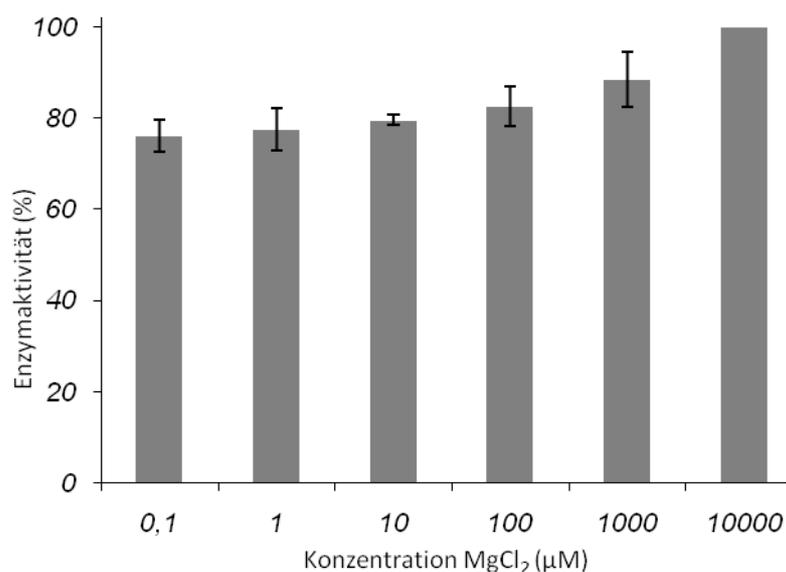
Konzentration von 2 mM  $\text{ZnCl}_2$  war ein Aktivitätsverlust von rund 50% zu verzeichnen (Abb. 3.8). Bei einer Zn-Konzentration von 10 mM betrug die Aktivität weniger als 10% des Ansatzes ohne Zn.



**Abb. 3.8:** Graphische Darstellung der Phosphatase-Aktivität nach der Zugabe von verschiedenen Zinkchlorid Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3)

#### 3.1.4.2 Magnesiumchlorid –Ionen

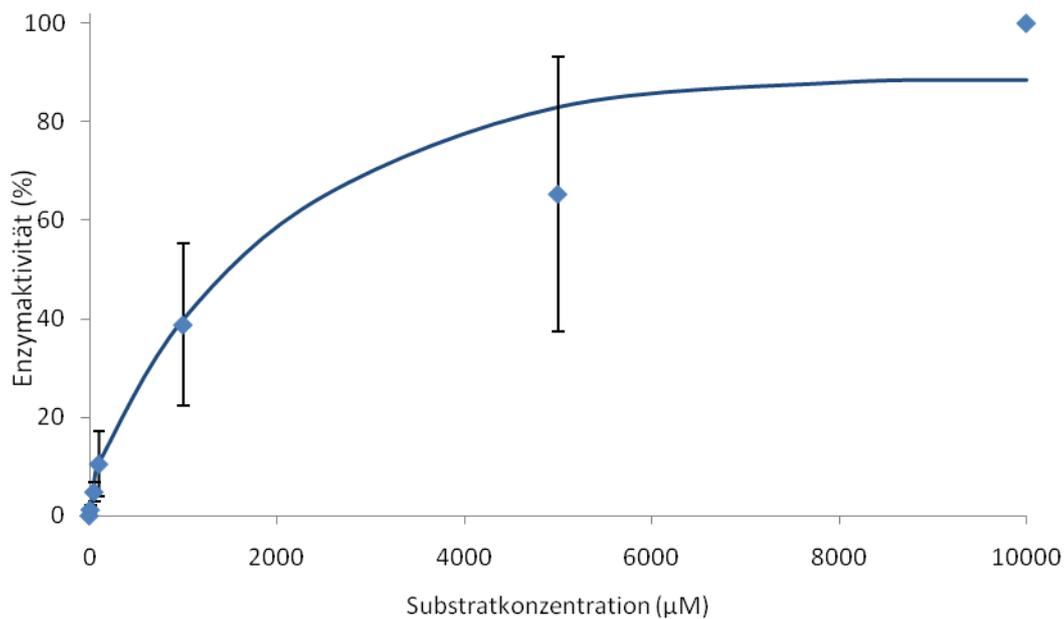
Magnesiumchlorid bewirkte mit steigender Konzentration eine signifikante Zunahme der Phosphatase-Aktivität (Abb. 3.9). Eine Konzentration von 10 mM Magnesiumchlorid bewirkte im Rohextrakt eine Steigerung der Enzymaktivität um ca. 20%.



**Abb. 3.9:** Graphische Darstellung der Phosphatase-Aktivität nach der Zugabe von verschiedenen Magnesiumchlorid Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3)

### 3.1.5 Enzymkinetik

Die typische Sättigungskurve zeigt einen hyperbolischen Kurvenverlauf, wie die Michaelis-Menten Kurve. Die Phosphatase zeigt jedoch keine Substratsättigung. Die Kurve knickt nicht ein, sondern steigt mit der Substratkonzentration stetig weiter an. Die typische Michaelis-Menten Darstellung ist hierbei nicht gegeben (Abb. 3.10). Es wurde ein  $K_M$ -Wert von 2,43 mM ermittelt.



**Abb. 3.10** Bestimmung der Phosphataktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Eine Substratsättigung ist nicht gegeben

### 3.1.6 Thermostabilität

Das Enzym war bei einer Inkubationszeit von 60 min bis zu einer Temperatur von 40°C stabil (Abb. 3.11). Ab 50°C sank die Aktivität nach 60 min auf die Hälfte ab. Bei 55°C verringerte sich die Aktivität bereits nach 12 min um die Hälfte und bei 60°C nach weniger als 5 min. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten war keine Aktivität mehr nachweisbar.

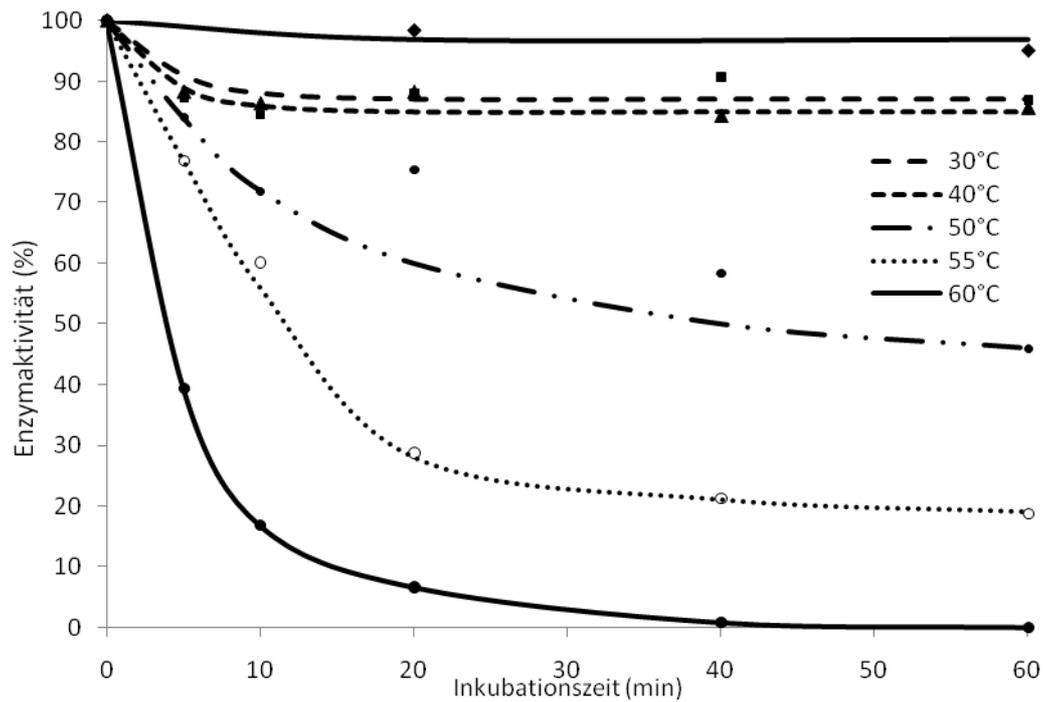
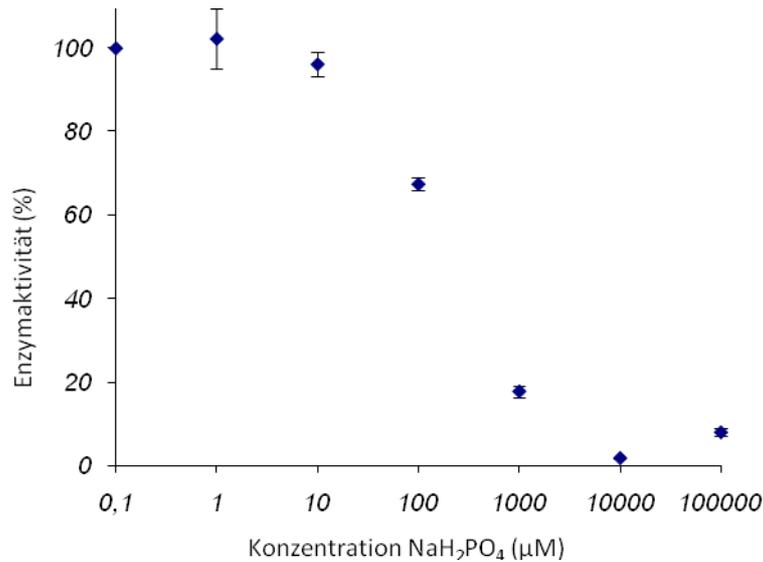


Abb. 3.11: Thermostabilität der Phosphatase in der Magenflüssigkeit.

### 3.1.7 Einfluss von Inhibitoren

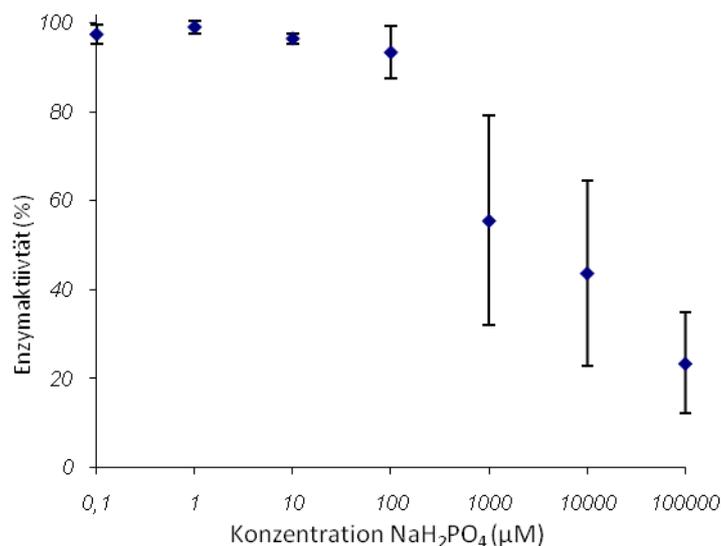
#### 3.1.7.1 Natriumdihydrogen Monophosphat

Um zu untersuchen ab welchen Konzentrationen das Natriumdihydrogen Monophosphat eine inhibierende Wirkung auf die Phosphatase ausübt, wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM getestet. Die Abb. 3.12 zeigt die Inhibition in Tris/HCl-Puffer bei pH 9. Bei einer Phosphatkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  verringerte sich die Aktivität geringfügig. Bei 100  $\mu\text{M}$  war die Phosphatase bereits um ca. 40% inhibiert.



**Abb. 3.12:** Phosphatase Inhibierung durch Zusatz verschiedener Phosphatkonzentrationen. Die Aktivität wurde in einen Tris/HCl-Puffer bei pH 9 gemessen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3).

Neben der Bestimmung des Phosphat-Einflusses bei pH 9 wurde die gleiche Messung mit einem Essigsäure/Acetat-Puffer bei pH 4 durchgeführt worden (Abb. 3.13). Die Aktivität nahm in ähnlicher Weise ab wie zuvor bei pH 9. Unterschiedlich war jedoch, dass bei pH 4 das Enzym sogar noch bei einer Phosphatkonzentration von 100 µM volle Aktivität zeigte. Erst bei einer Phosphat-Konzentration von 1 mM sank die Aktivität um rund 45% ab.

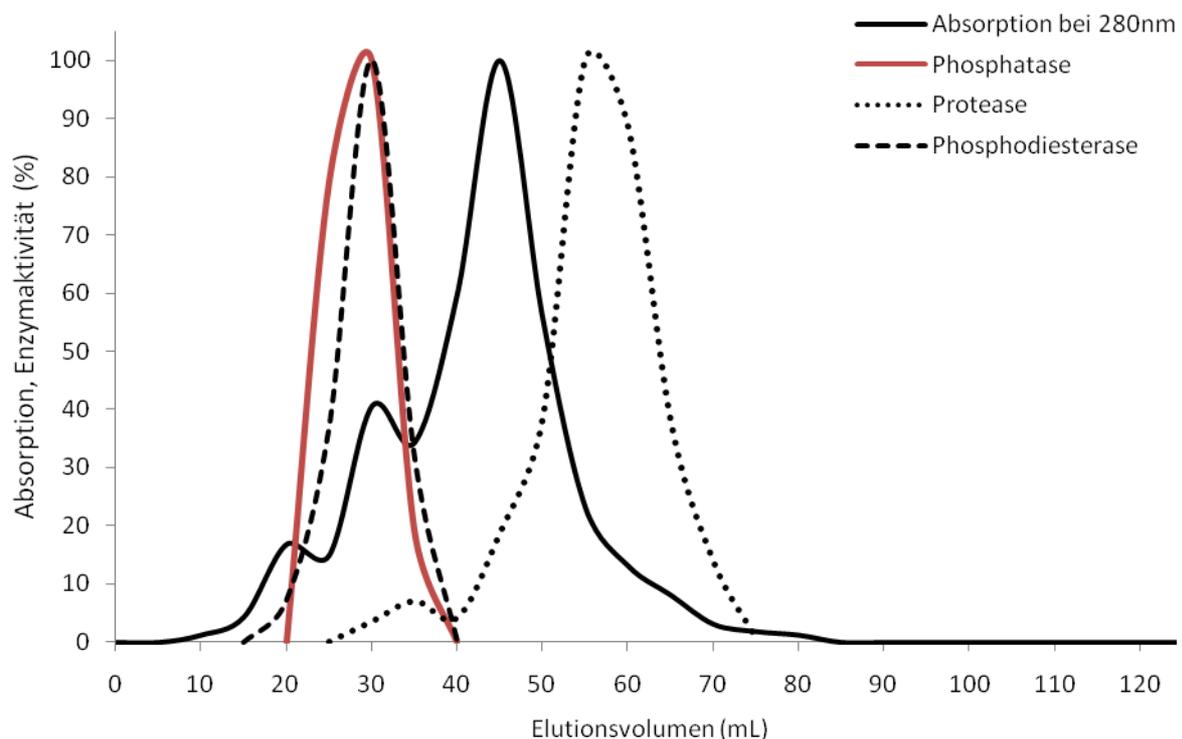


**Abb. 3.13:** Phosphatase Inhibierung durch Zusatz verschiedener Phosphatkonzentrationen. Die Aktivität wurde in einen Essigsäure/Acetat-Puffer bei pH 4 gemessen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3).

## 3.2 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG

### 3.2.1 Gelfiltration

Beide Enzyme, die Monophosphatase und die Diphosphatase, eluierten nach 25 mL (Abb. 3.14) Die höchsten Aktivitäten der Phosphomonoesterase und auch der Phosphodiesterase konzentrierten sich auf zwei Fraktionen von 25 bis 35 ml (Abb. 3.14). Um sicher zu gehen, dass die Enzyme nicht der Hydrolyse durch Proteasen ausgesetzt waren, wurden alle Fraktionen auf proteolytische Aktivität getestet. Die höchsten Protease-Aktivitäten traten in den Fraktionen ab 60 mL Elutionsvolumen auf. In den Fraktionen mit der Phosphatase ließ sich dagegen nur eine geringe Protease-Aktivität nachweisen (Abb. 3.14).

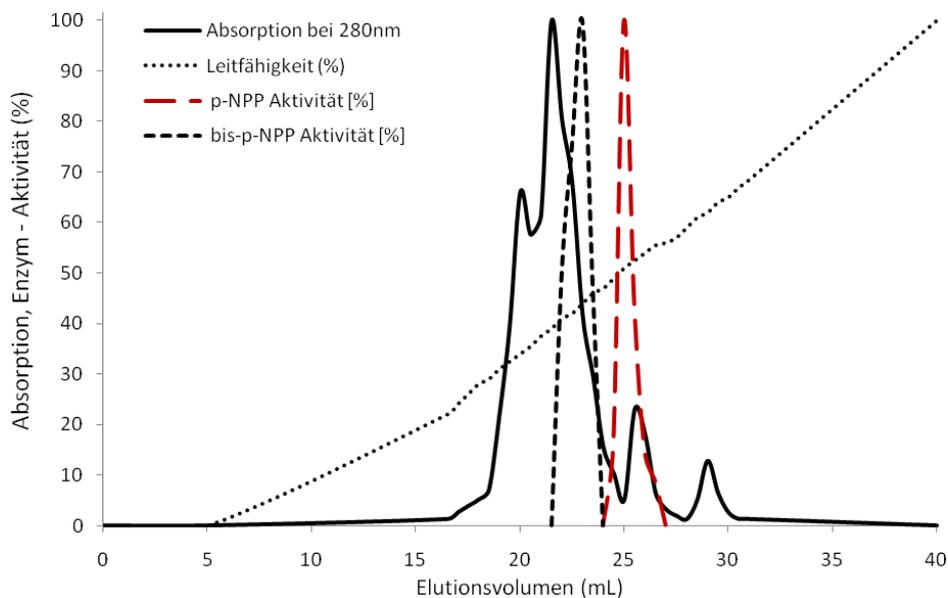


**Abb. 3.141:** Chromatographische Proteinauftrennung durch Gelfiltration. Neben der Absorption bei 280 nm (Protein) wurden die Aktivitäten der Phosphatasen und der Protease bestimmt.

Die beiden Fraktionen mit hoher Phosphatase-Aktivität wurden vereinigt und das Volumen der Probe mittels der Amicon Falconröhrchen auf 2 ml eingengt.

### 3.2.2 Anionenaustauschchromatographie (FPLC)

Die aus der Gelfiltration gewonnene und eingengte Probe wurde zunächst auf eine Uno Q6 Anionenaustausch-Säule aufgetragen. Die Phosphodiesterase eluiert früher als die Phosphomonoesterase. Bei einem Elutionsvolumen von 23 mL wies die Phosphodiesterase die höchste Aktivität auf. Die höchste Aktivität der alkalischen Phosphomonoesterase trat bei einem Elutionsvolumen von 25 mL auf (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** Proteinauftrennung durch die Anionenaustauschchromatographie über die Uno Q6 Säule. Verschiedene enzymatische Aktivitäten sind in den Fraktionen gemessen und ebenfalls dargestellt worden.

Die Fraktionen mit den beiden Enzymen wurden jeweils getrennt gepoolt und auf die Resource Q Säule aufgetragen. Die Phosphomonoesterase eluierte nach einem Volumen von 21,5 mL (Abb. 3.16). Die letzte Aufreinigungsstufe der Phosphodiesterase über die Resource Q Säule ist hier nicht abgebildet. Ein ApiZym Schnelltest ergab, dass in den gepoolten Fraktionen noch weitere Enzyme enthalten waren. Hierbei handelte es sich um eine (C4) Esterase,  $\alpha$ -Glucosidase und eine N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (siehe Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3).

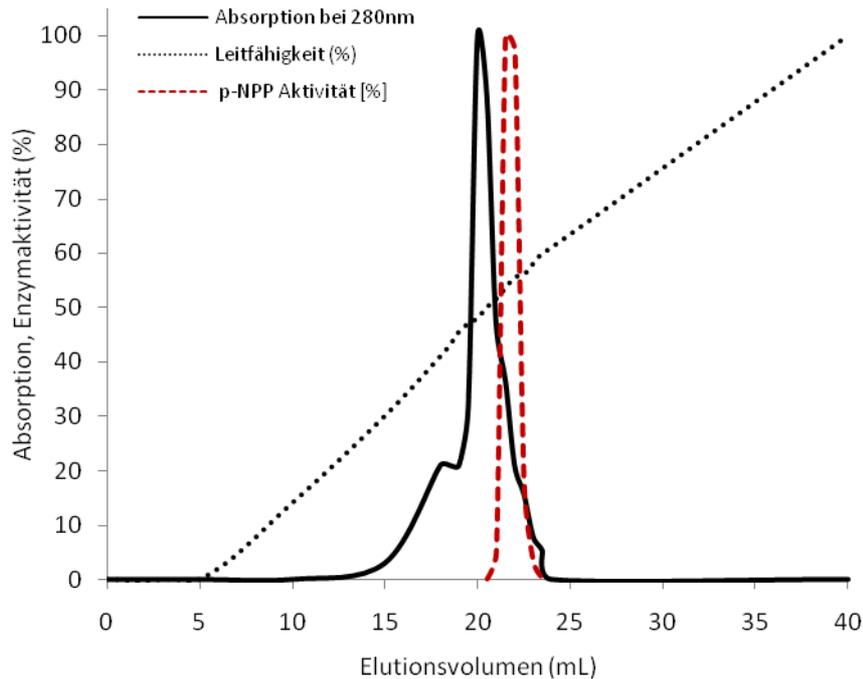


Abb. 3.16: Proteinauftrennung durch Anionenaustauschchromatographie über die Uno Q6 Säule.

### 3.2.3. Reinigungs- und Anreicherungsschema

Von jedem Reinigungsschritt wurde eine Unterprobe entnommen in der anschließend die Enzymaktivität und der Gehalt des löslichen Proteins bestimmt wurden. Für die alkalische Phosphomonoesterase wurde im Vorversuch eine Anreicherung von 2750 und ein Gehalt von 20% ermittelt worden (Tabelle nicht abgebildet). Bei einem zweiten Durchlauf derselben Probe ließ sich eine Anreicherung von 1515 und ein Gehalt von 20% bestätigen (Tab. 3.2).

Im Verlauf mehrerer Aufreinigungen verschiedener Magenflüssigkeiten stellte sich heraus, dass sich die Phosphodiesterase nach dem bisher durchgeführten Muster (Gelfiltration → Uno Q6 → Resource Q) nicht vollständig isolieren und somit aufreinigen ließ. Zudem war ein starker Aktivitätsverlust nach der dritten Säule ein weiterer negativer Aspekt. Es wurde eine Aktivität von 31% und ein Gehalt von 4% ermittelt (Tabelle nicht abgebildet). Deshalb wurden keine weiteren Aufreinigungen und somit auch Charakterisierungen der Phosphodiesterase vorgenommen.

**Tab. 3.2** Bestimmung der Phosphataseaktivität nach den einzelnen Aufreinigungsschritten. Die Darstellung bezieht sich nur auf die Phosphomonoesterase.

|                                    | Gesamt-<br>volumen<br>(mL) | $\Delta E_{405}/\text{mL}$<br>*min | Protein-<br>gehalt<br>(mg/mL) | Spezifische<br>Aktivität<br>( $\Delta E_{405}/\text{mg} \cdot \text{min}$ ) | Anreicherung | Gehalt<br>( $\Delta E_{405}/\text{min}$ ) | Gehalt<br>(%) |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---|--------------|---|---------------|
| Rohextrakt                         | 0,5                        | 4,52                               | 61,81                         | 0,07  | 1,0          | 2,26                                      | 100           |
| G25-Säule                          | 1,0                        | 1,15                               | 15,02                         | 0,08  | 1,1          | 1,15                                      | 51,1          |
| Gelfiltration                      | 10,0                       | 0,072                              | 0,23                          | 0,31  | 4,2          | 0,72                                      | 31,7          |
| Amicon<br>Filtrations-<br>röhrchen | 2,0                        | 0,69                               | 1,05                          | 0,66  | 9            | 1,38                                      | 61,3          |
| Uno Q6 Säule                       | 1,5                        | 0,58                               | 0,048                         | 12,12   | 166          | 0,86                                      | 38,3          |
| Resource Q                         | 1,0                        | 0,44                               | 0,0040                        | 110,71  | <b>1515</b>  | 0,44                                      | <b>19,6</b>   |

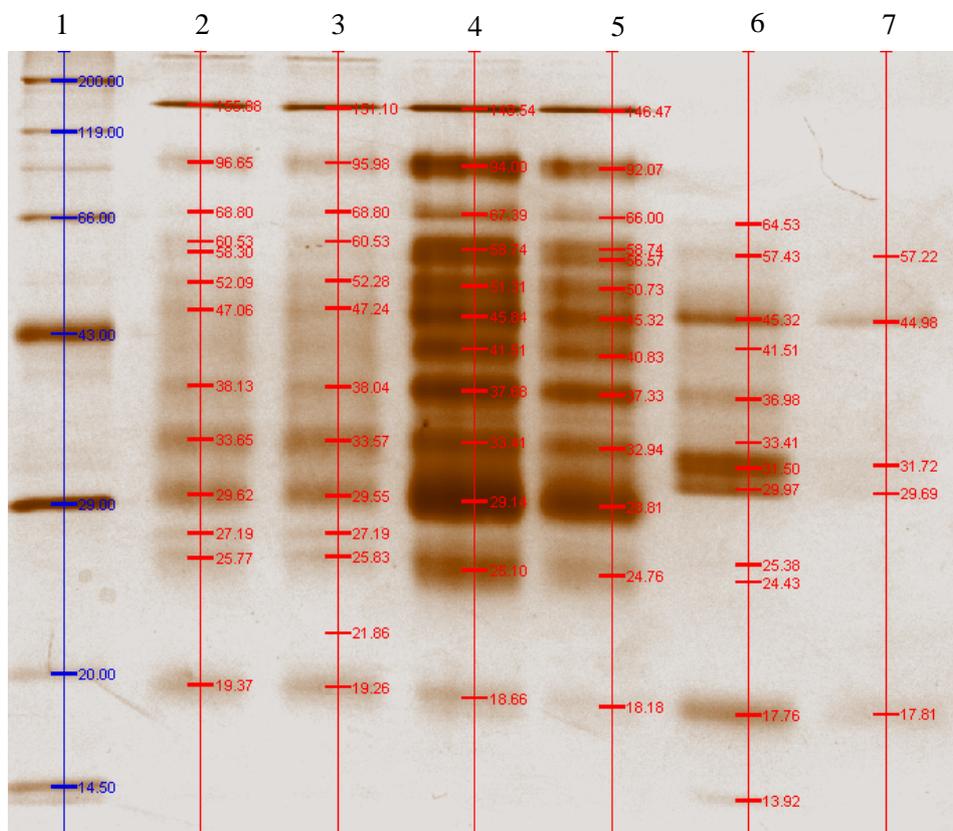
### 3.2.4 Gelelektrophorese

Von jeder Aufreinigungsstufe des Rohextraktes bis hin zum isolierten Enzym wurden Unterproben entnommen. Dies diente dem Zweck den Erfolg der einzelnen Aufreinigungsschritte anhand eines SDS-Gels optisch zu überprüfen und darzustellen. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (siehe Kapitel 2.1.2) bestimmt und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde zunächst ein Aktivitätsgel mit MUF-P erstellt. Das fluoreszierende Produkt der Enzymreaktion erscheint in helle Banden auf dem Gel (Abb. 3.17). Es ist deutlich erkennbar, dass die Aktivität des Enzyms mit jedem Reinigungsschritt steigt. Störende, die Phosphatase-Aktivität negativ beeinflussende Faktoren wurden demnach Schritt für Schritt entfernt.



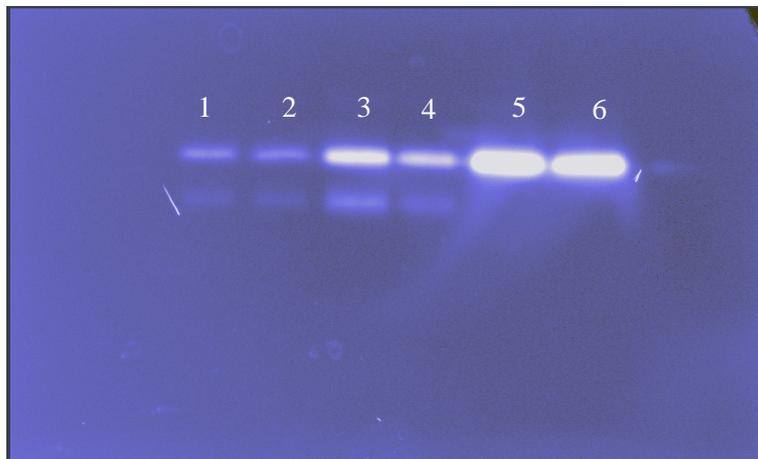
**Abb. 3.17:** Aktivitätsgel mit dem Substrat MUF-Phosphat inkubiert in Tris/HCl-Puffer pH 9.  
1. Rohextrakt, 2. G-25 Säule, 3. Gelfiltration, 4. Aufkonzentriert mit Amicon, 5. Uno Q6 Säule, 6. Resource Q Säule Die Aktivität steigt mit zunehmender Aufreinigung des Enzyms.

Anschließend wurde das Gel mit Hilfe der Silberfärbemethode angefärbt. Es ist genau zu erkennen, wie viel Fremd-Protein nach jedem Aufreinigungsschritt entfernt wurde. Die isolierte Phosphatase besitzt ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 44,98 kDa (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18:** 1. RotiMark Standard, 2. Magenflüssigkeit (1:400) 1,73µg 3. G25 Säule (1:200) 1,619µg  
4. Gelfiltration (1:2) 3,81µg 5. Amicon Aufkonzentrierung (1:20) 1,505µg 6. Uno Q6 Säule (1:2) 1,268µg 7. Resource Q (1:2) 0,435µg

Da die Phosphatase ebenfalls eine Aktivität im sauren Bereich aufweist, wurde auch ein Aktivitätsgel mit einem Essigsäure/Acetat Puffer bei pH 4 hergestellt. In Abb. 3.19 sind neben den üblich fluoreszierenden Phosphat-Banden noch weitere kleinere Banden sichtbar.



**Abb. 3.19** Aktivitätsgel mit dem Substrat MUF-Phosphat inkubiert in Essigsäure/ Acetat-Puffer bei pH 4. Die Aktivität steigt mit zunehmender Aufreinigung des Enzyms. Zudem sind im linken Bereich des Gels Doppelbanden zu erkennen, hervorgerufen von einer weiteren Phosphatase. 1. Rohextrakt, 2. G-25 Säule, 3. Gelfiltration, 4. Aufkonzentriert mit Amicon, 5. Uno Q6 Säule, 6. Resource Q Säule

Diese Banden sind jedoch nicht im alkalischen Bereich sichtbar. Es handelt es sich um ein weiteres Enzym, dass beim sauren pH-Wert seine Aktivität zeigt. Eindeutig erkennbar ist hier, dass die Banden nach der Uno Q6 Säule und Resource Q Säule nicht mehr vorkommen. Das Enzym ist also in den weiteren Aufreinigungsschritten entfernt worden. Dieses Enzym zeigt eine Substratspezifität für das Methylumbelliferyl-Phosphat, jedoch nicht für das p-Nitrophenylphosphat. Sämtliche Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie sind mit dem p-NPP und auch dem bis-p-NPP auf ihre Phosphatase-Aktivität hin durchgemessen worden. Beim p-NPP wurde nur ein einziges intensives Aktivitäts-Maximum ermittelt. Beim bis-p-NPP wurden keinerlei Aktivitäten detektiert.

Um zu untersuchen, bis zu welchen pH-Werten diese „Doppelbanden“ auftreten, ist ebenfalls ein Essigsäure/Acetat pH 5 Puffer getestet worden. Das Resultat ist dasselbe wie in Abb. 3.19. Allerdings ist hier die Aktivität der zweiten unbekanntnen Phosphatase Bande intensiver als in dem pH 4 Zymogramm.



### 3.3 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER AUFGEREINIGTEN PHOSPHATASE

#### 3.3.1 Enzymnachweis mit ApiZym

Der Aufreinigungserfolg der Phosphatase nach der Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie wurde zunächst mit einem ApiZym-Schnelltest kontrolliert. Der Test gab eine Aussage darüber, ob sich nach dem letzten Aufreinigungsschritt noch Fremdenzyme in der Probe befanden (Tab. 3.3). Neben der alkalischen und sauren Phosphatase wurden ebenfalls die  $\alpha$ -Glucosidase und die N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (Abb. 3.20) nachgewiesen. Die Herkunft der beiden letzteren Enzyme wurde anschließend genauer untersucht.



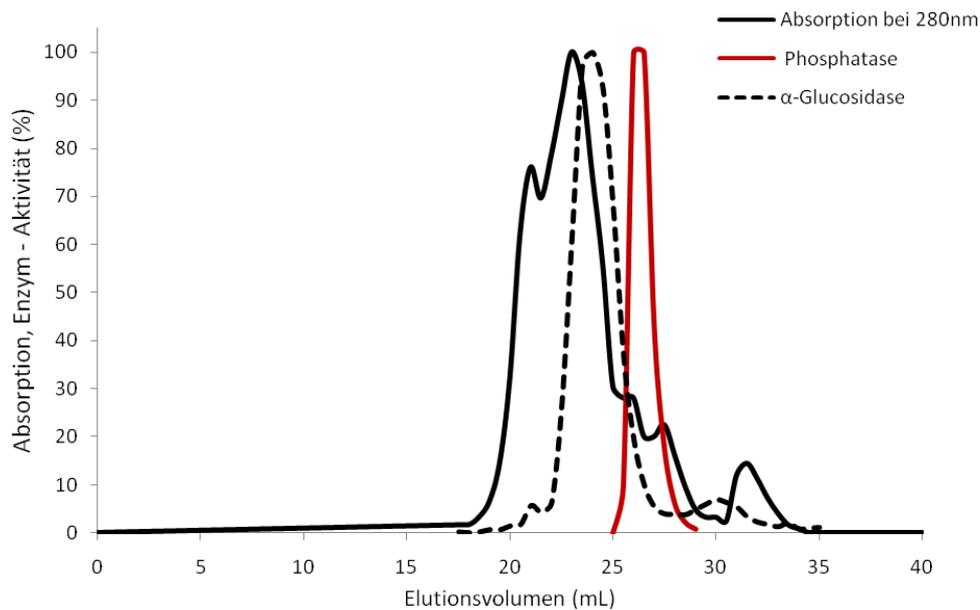
Abb. 3.20: ApiZym Teststreifen mit farblicher, deutlich erkennbarer Substratumsetzung

Tab. 3.3 Auflistung aller Enzyme des ApiZym Teststreifens und Bewertung der farblich entwickelten Enzymaktivität von "0" (nicht aktiv) bis "5" (hoch aktiv)

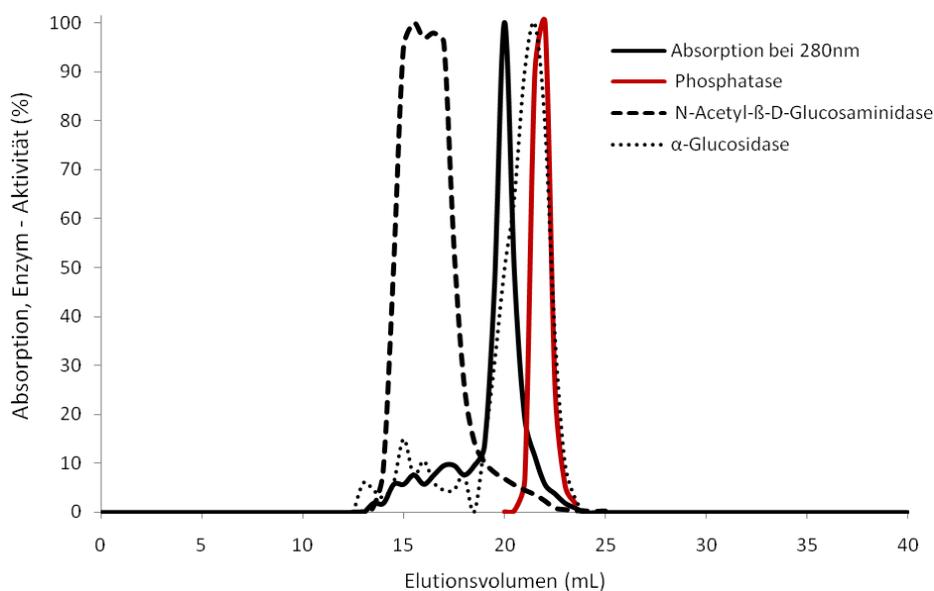
| Nr. | Enzymnachweis                      | Substrat   | pH-Wert | Probe aufgereinigt |
|-----|------------------------------------|--|---------|--------------------|
| 1   | Kontrolle                          | -  | -       | 0                  |
| 2   | Alkalische Phosphatase             | 2 Naphtylphosphat                                    | 8,5     | 5                  |
|     | Esterase (C4)                      | 2 Naphtylbutyrat                                     | 6,5     | 1                  |
|     | Esterase Lipase (C8)               | 2 Naphtylcaprylat                                    | 7,5     | 0                  |
|     | Lipase (C14)                       | 2 Naphtylmyristat                                    | 7,5     | 0                  |
|     | Leucin Arylamidase                 | L - Leucyl - 2 - Naphtylamid                         | 7,5     | 0                  |
|     | Valin Arylamidase                  | L - Valyl - 2 - Naphtylamid                          | 7,5     | 0                  |
|     | Cystin Arylamidase                 | L - Cystyl - 2 - Naphtylamid                         | 7,5     | 0                  |
|     | Trypsin                            | N- Benzoyl - DL - Arginin - 2 - Naphtylamid          | 8,5     | 0                  |
|     | $\alpha$ -Chymotrypsin             | N - Glutaryl - Phenylalanin - 2 Naphtylamid          | 7,5     | 0                  |
| 11  | Saure Phosphatase                  | 2 Naphtyl - Phosphat                                 | 5,4     | 5                  |
| 12  | Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase     | Naphtol - AS - BI - Phosphat                         | 5,4     | 4                  |
|     | $\alpha$ -Galactosidase            | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\alpha$ D - Galactopyranosid | 5,4     | 0                  |
|     | $\beta$ -Galactosidase             | 2 - Naphtyl - $\beta$ D - Galactopyranosid           | 5,4     | 0                  |
|     | $\beta$ -Glucuronidase             | Naphtol - AS - BI - $\beta$ D - Glucuronid           | 5,4     | 0                  |
| 16  | $\alpha$ -Glucosidase              | 2 Naphtyl - $\alpha$ D - Glucopyranosid              | 5,4     | 4                  |
|     | $\beta$ -Glucosidase               | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\beta$ D - Glucopyranosid    | 5,4     | 0                  |
| 18  | N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase | 1 - Naphtyl - N - Acetyl - $\beta$ D - Glucosaminid  | 5,4     | 2                  |
|     | $\alpha$ -Mannosidase              | 6 - Br - 2 - Naphtyl - $\alpha$ D - Mannopyranosid   | 5,4     | 0                  |
|     | $\alpha$ -Fucosidase               | 2 - Naphtyl - $\alpha$ L - Fucopyranosid             | 5,4     | 0                  |

### 3.3.2 $\alpha$ -Glucosidase

Zur Bestimmung der  $\alpha$ -Glucosidase wurden zunächst alle Fraktionen aus den Läufen mit der Uno Q6 Säule verwendet. Die höchste Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase eluierte bei einem Volumen von 23 bis 24,5 mL. Die Phosphatase eluierte deutlich später bei einem Volumen von 26,5 mL (Abb. 3.21). Die Fraktionen mit Phosphataseaktivität wurden vereinigt und auf die Resource Q aufgetragen. Innerhalb dieser Fraktionen ist jedoch noch eine geringe Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase vorhanden (Abb. 3.22).



**Abb. 3.21** Darstellung der Phosphatase und  $\alpha$ -Glucosidase Aktivität nach Anionenaustauschchromatographie mit der Uno Q6 Säule



**Abb. 3.22:** Enzymaktivitäten nach der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule.

Die  $\alpha$ -Glucosidase eluierte bei der Aufreinigung mit der Resource Q Säule innerhalb desselben Elutionsvolumens wie die Phosphatase (Abb. 3.22). Bei der nachgewiesenen  $\alpha$ -Glucosidase Aktivität handelt es sich um eine mitgeschleppte Restaktivität aus den gepoolten Fraktionen der Uno Q6 Säule (Abb. 3.21).

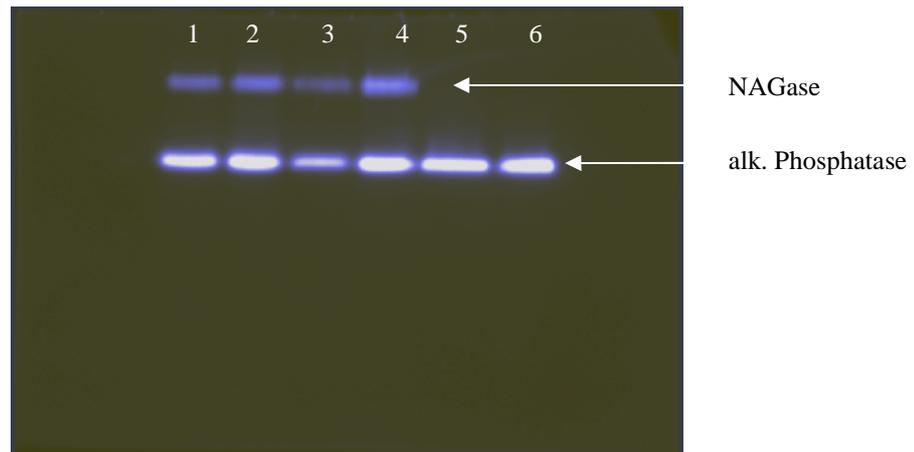
### 3.3.3 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase

Ebenso wie bei der  $\alpha$ -Glucosidase handelt es sich auch bei der N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase um eine abnehmende Enzymaktivität (Abb. 3.22). Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Glucosidase ist die NAGase Aktivität nicht mitgeschleppt. Die höchste Enzymaktivität lässt sich bei den Resource Q Fraktionen im Elutionsvolumen von 14,5 mL bis 18,5 mL nachweisen. Somit eluiert dieses Enzym weit vor der Phosphatase.

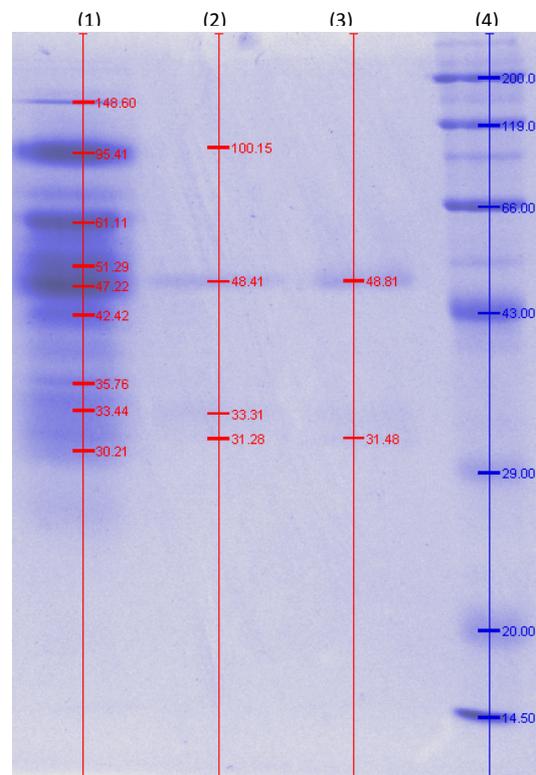
#### 3.3.3.1 Aktivitätsgel

Um festzustellen, welche Masse das Enzym besitzt und wie weit es von der isolierten Phosphatase entfernt liegt, ist genau wie unter Kapitel 2.2.9.1 beschrieben eine Gelelektrophorese mit Unterproben aus jedem Aufreinigungsschritt durchgeführt worden. Das Zymogramm wurde zum einen mit dem Substrat Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosamide und zum anderen mit dem fluoreszierenden Substrat für die Phosphatase (Methylumbelliferyl-Phosphat) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst in der MUF-NAG-Lösung inkubiert und unter UV-Licht betrachtet. Anschließend wurde das Gel in der MUF-P-Lösung inkubiert. Da die Aktivität der NAGase hoch war, wurde die Inkubationszeit auf wenige Sekunden reduziert. Dadurch wurde ein Überstrahlen der fluoreszierenden Banden vermieden.

Daher sind die Aktivitätsbanden bei den letzten beiden Bahnen in der Abb. 3.23 nicht mehr sichtbar, aber dennoch vorhanden. Überstrahlte Gele zeigten noch schwache Banden nach den beiden letzten Aufreinigungsschritten (nicht abgebildet).



**Abb. 3.23** Zymogramm mit den Substraten MUF-NAG und MUF-P. Rohextrakt (Bahn 1), G25-Säule (Bahn 2), Gelfiltration (Bahn 3), Amicon- Aufkonzentrierung (Bahn 4), Uno Q6 Säule (Bahn 5), Resource Q (Bahn 6)



**Abb. 3.24:** Ein mit Coomassie angefärbtes Aktivitätsgel. Dargestellt sind die Proben nach der Gelfiltration. (Bahn 1) nach der Uno Q6-Säule (Bahn 2) und nach der Resource Q (Bahn 3). Bahn 4 stellt den Standard dar.

Das scheinbare Molekulargewicht der NAGase betrug 95 bis 100 kDa und war somit etwa doppelt so hoch wie das der extrazellulären Phosphatase (Abb. 3.24).

### 3.3.4 ATPase Aktivität

Die Sequenzanalyse der aufgereinigten Phosphatase ergab eine Homologie zu einer Myosin-ATPase (siehe Kapitel 3.3.13). Deshalb wurde auch die ATPase-Aktivität der isolierten Phosphatase untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in den einzelnen Fraktionen des letzten Aufreinigungsschrittes nach der Resource Q Säule. Es wurden nur jene Fraktionen verwendet die eine hohe Phosphatase-Aktivität aufwiesen. Die ermittelten Extinktionswerte der ATPase und alkalischer Phosphatase wurden gegeneinander aufgetragen (Abb. 3.25). Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen den beiden Aktivitäten zu erkennen. Die Fraktionen, die die höchste Phosphatase-Aktivität aufwiesen, zeigten ebenfalls die höchste ATPase Aktivität. Die isolierte Phosphatase zeigt somit charakteristische Eigenschaften einer ATP spaltenden Phosphatase.

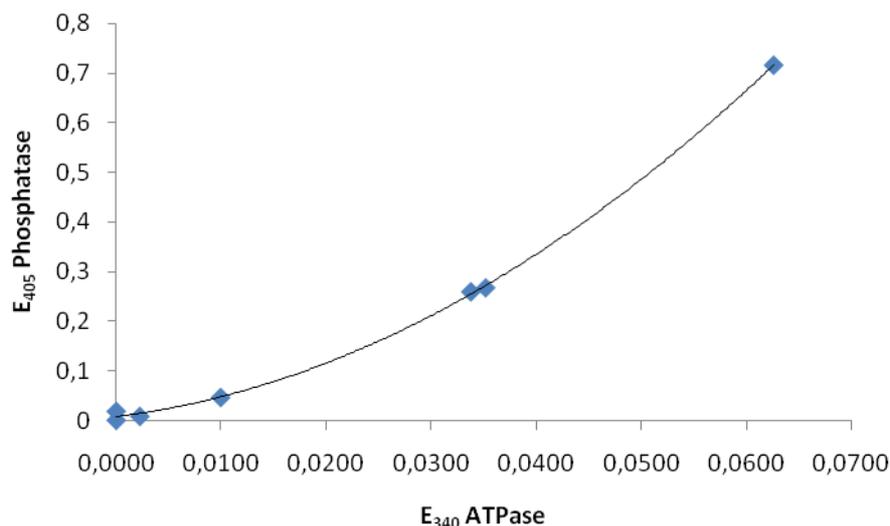
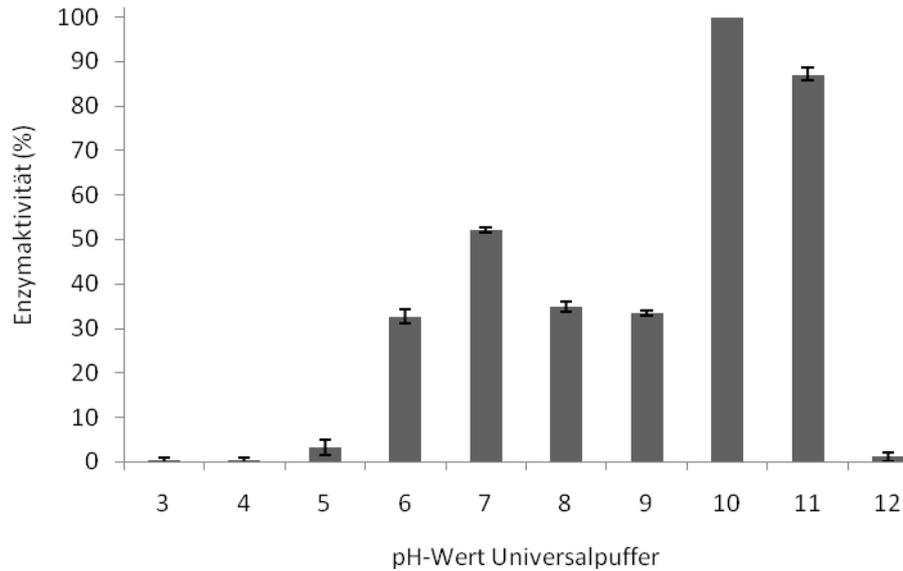


Abb. 3.25: Phosphatase - Aktivität aufgetragen gegen die ATPase Aktivität

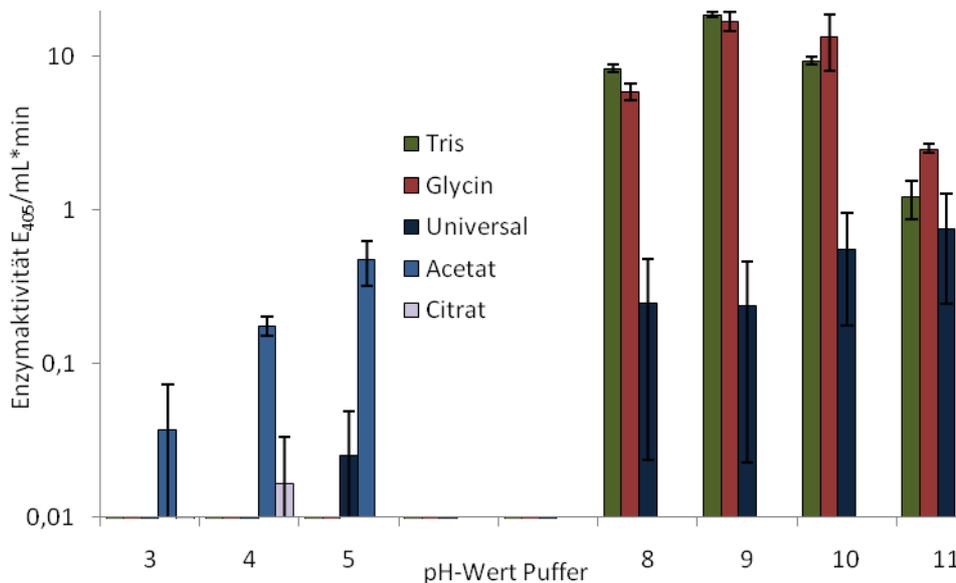
### 3.3.5 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

Die pH-Profile des isolierten Enzyms (Abb. 3.26) und die des Rohextraktes (Abb. 3.2) sind sich sehr ähnlich. Die höchsten Enzymaktivitäten ließen sich bei pH Werten von 10 und 11 feststellen. Im Bereich von pH 3 und pH 4 waren jedoch keine Aktivitäten messbar. Von pH 5 bis pH 7 stieg die Aktivität kontinuierlich an. Sie verringerte sich aber wieder bei pH 8 und 9.



**Abb. 3.26:** Einfluss unterschiedlicher pH-Werte des Universalpuffers auf die enzymatische Phosphatase-Aktivität (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 4$ ).

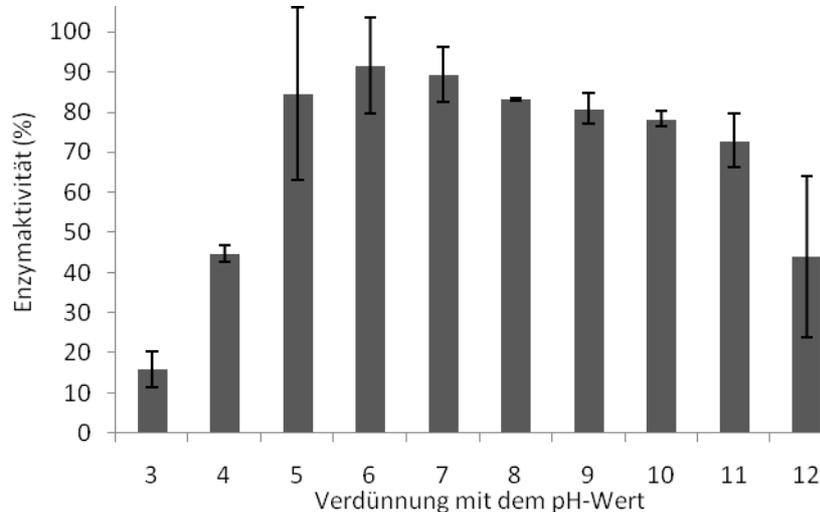
Ebenso wie im Rohextrakt zeigte die aufgereinigte Enzymprobe mit einem Tris/HCl- und dem Glycinpuffer im Reaktionsansatz rund zehn Mal höhere Aktivitäten als mit dem Universalpuffer (Abb. 3.26). Des Weiteren waren die Aktivitäten im sauren Bereich von pH 3 bis pH 4 mit Acetatpuffer deutlich höher als mit Universal- und Citratpuffer.



**Abb. 3.27:** Einfluss unterschiedlicher pH-Werte und unterschiedlicher Puffer auf die Enzymaktivität. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Ordinate. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 3.3.6 Abhängigkeit der Enzymstabilität vom pH-Wert

Im sauren Bereich um pH 3 und pH 4 wies die Phosphatase die geringe Stabilität auf (Abb. 3.28). Die höchste Stabilität zeigte das Enzym in einem pH Bereich von 5 – 7.

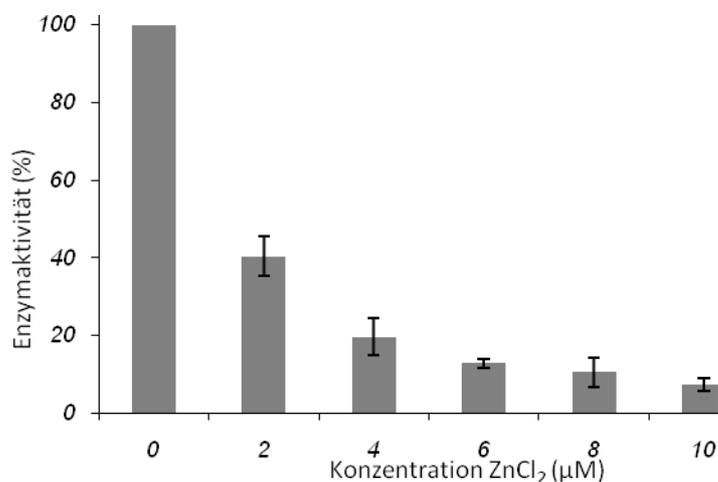


**Abb. 3.28:** Die Enzymaktivität von Proben, die bei unterschiedlichen pH Werten des Universalpuffers vorinkubiert wurden. Die Aktivität wurde bei pH 11 gemessen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 3.3.7 Einfluss unterschiedlicher Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität

#### 3.3.7.1 Zinkchlorid:

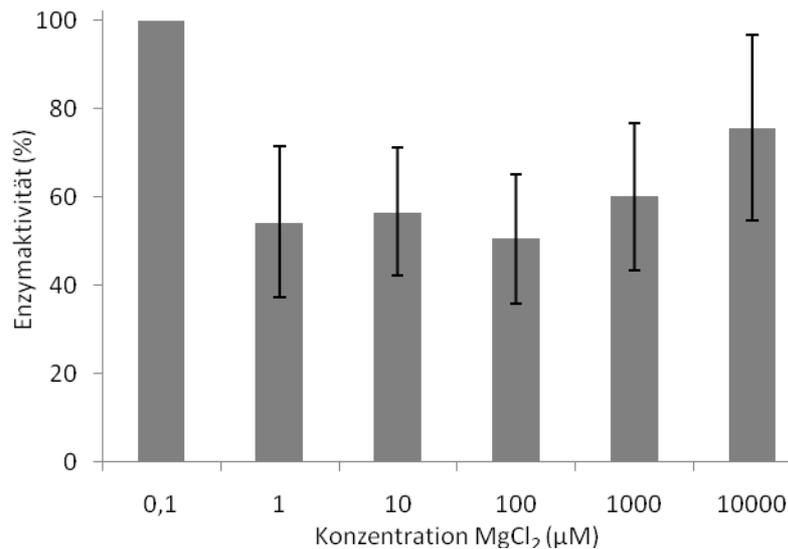
Auch bei der aufgereinigten Probe steigerte  $\text{ZnCl}_2$  die Enzymaktivität nicht, sondern wirkte eher hemmend (Abb. 3.29). Die Aktivität sank bereits bei einer Konzentration von 2 mM um 60% ab.



**Abb. 3.29:** Einfluß von Zinkchlorid auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 3.3.7.2. Magnesiumchlorid:

Magnesiumchlorid übte ebenfalls eine inhibierende, statt eine steigende Wirkung auf die Phosphatase aus. Die Enzymaktivität sank bereits bei einer Mg-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  um deutliche 40% (Abb. 3.30). Die Phosphatase scheint weder von Zink- noch von Magnesiumchlorid-Ionen abhängig zu sein. Im Vergleich dazu, steigert jedoch Magnesiumchlorid die Enzymaktivität beim Rohextrakt (Kapitel 3.1.4.2, Abb. 3.9).

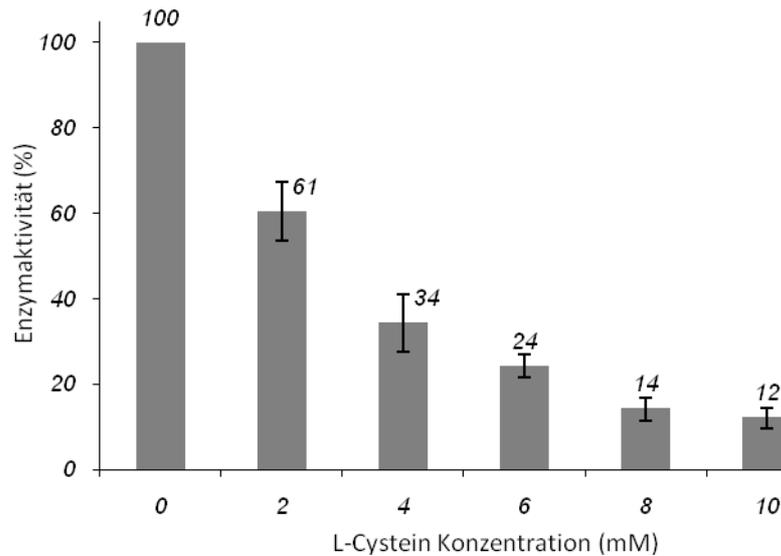


**Abb. 3.30:** Inhibierende Wirkung unterschiedlicher Magnesiumchlorid Konzentrationen auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

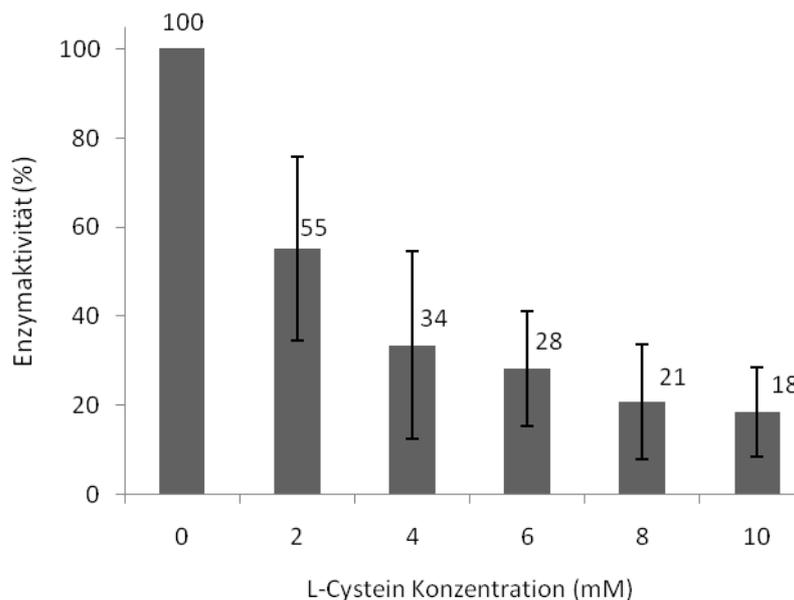
## 3.3.8 Einfluss von Inhibitoren auf die Enzymaktivität

### 3.3.8.1 L-Cystein

Der Einfluss von unterschiedlichen L-Cystein-Konzentrationen auf die Phosphatase-Aktivität, gemessen mit dem Tris Puffer bei pH 9, ist in Abb. 3.31 dargestellt. Mit zunehmender L-Cystein Konzentration nahm die Enzymaktivität ab. Bereits eine L-Cystein Konzentration von 2 mM führte zu einer Verringerung der Aktivität um 40%. Ein fast identischer Verlauf trat bei der Inkubation mit dem Universalpuffer bei pH 10 auf (Abb. 3.32). In diesem Fall wirkten zwei Inhibitoren, das L-Cystein und das Phosphat des Puffers, gleichzeitig auf die Phosphatase. Zwar waren die Aktivitäten bei geringen L-Cystein Konzentration mit dem Phosphatpuffer niedriger als mit Tris/HCl-Puffer, jedoch waren die Unterschiede aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant.



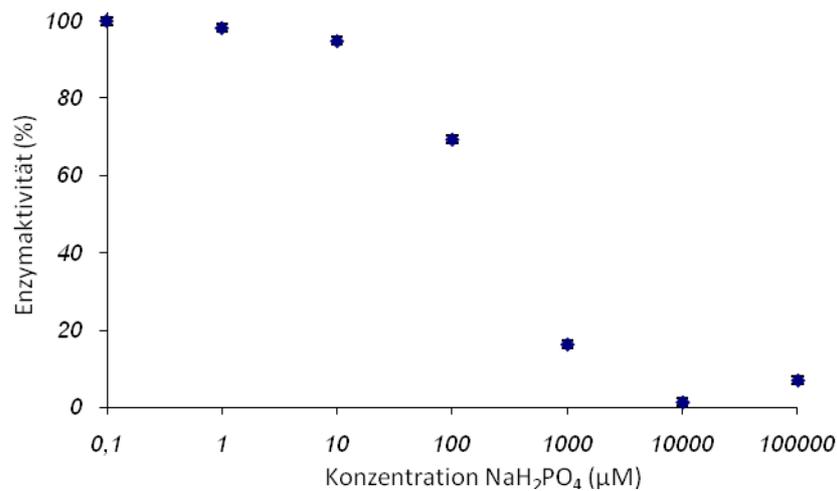
**Abb. 3.31:** Einfluss von L-Cystein auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase in Tris/HCl-Puffer, pH 9 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3).



**Abb. 3.32:** Einfluss von L-Cystein auf die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase in Universalpuffer, pH 10 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3).

### 3.3.8.2 Natriumdihydrogen Monophosphat

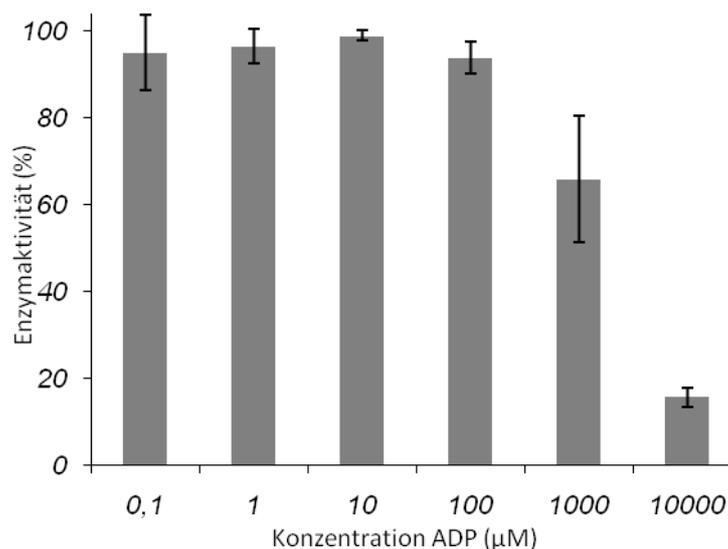
Die aufgereinigte Phosphatase zeigte bereits bei einer geringen Phosphatkonzentration von 100  $\mu$ M einen deutlichen Verlust der Enzymaktivität um ca. 35% (Abb. 3.33). Bei einer Phosphatkonzentration von 1 mM betrug die Aktivität weniger als 20% des ungehemmten Ansatzes.



**Abb. 3.33:** Inhibierung der Phosphatase Aktivität bei unterschiedlichen Phosphat Konzentrationen in Tris/HCl-Puffer, pH 9 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3).

### 3.3.8.3 Adenosin 5' Diphosphat

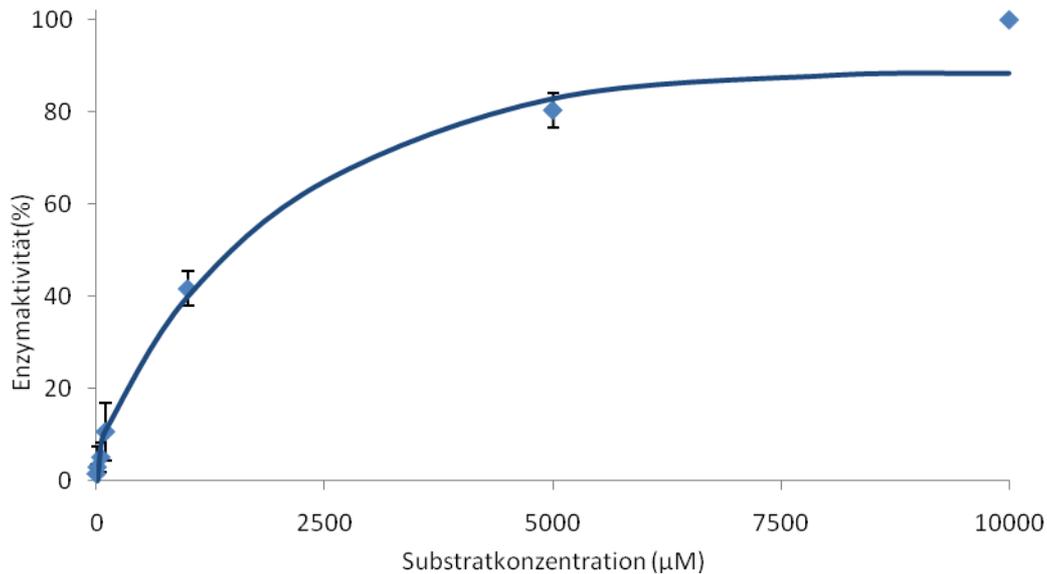
ADP ist ein spezifischer Inhibitor für ATPasen. Da die alkalische Phosphatase Eigenschaften einer ATPase aufweist, wurde dieser spezifische Inhibitor ebenfalls getestet. Geringe Konzentrationen an ADP zeigten keine hemmende Wirkung (Abb. 3.34). Eine signifikante inhibierende Wirkung auf das Enzym trat bei ADP-Konzentrationen ab 1 mM auf.



**Abb. 3.34:** Inhibierung durch unterschiedliche ADP Konzentrationen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3).

### 3.3.9 Enzymkinetik

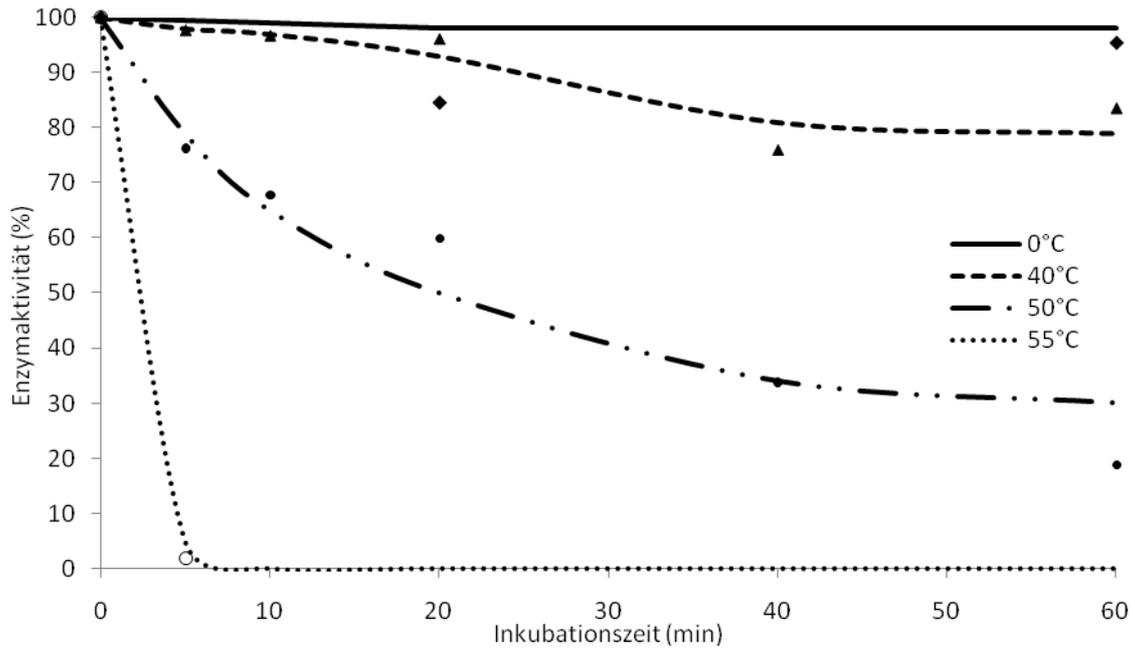
Die Aktivität der aufgereinigten Phosphatase stieg mit höherer Substratkonzentration kontinuierlich an (Abb. 3.35). Die typische Michaelis-Menten Darstellung ist hierbei ebenfalls nicht gegeben. Der  $K_M$ -Wert beträgt 1,74 mM.



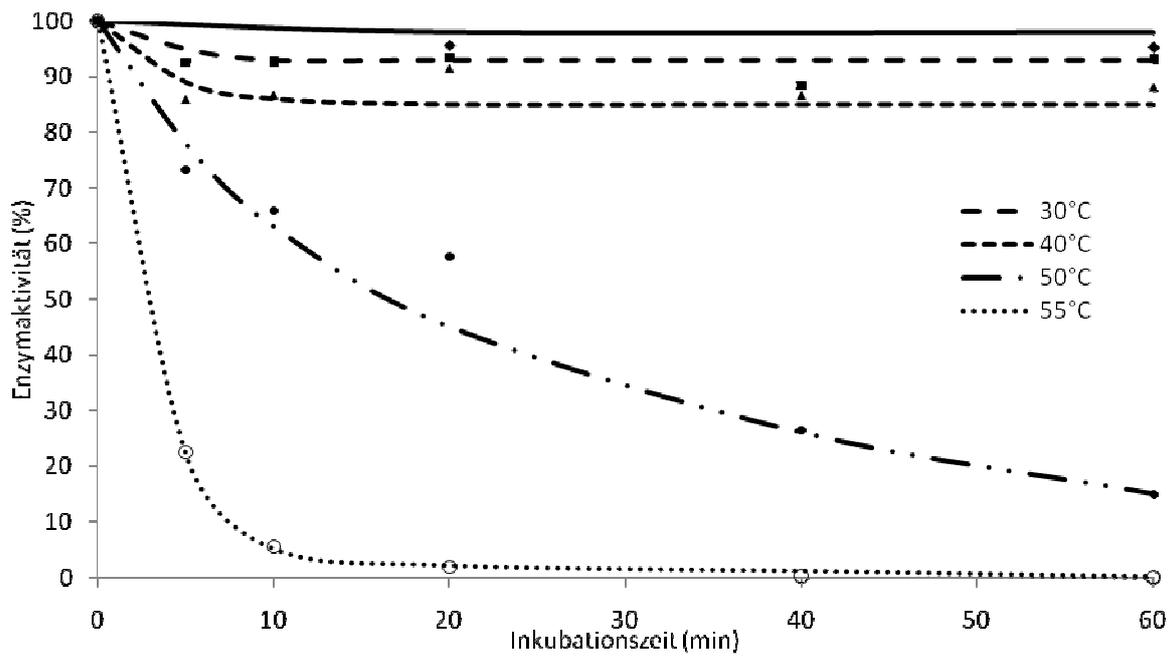
**Abb. 3.35:** Substrat-Sättigungskurve der aufgereinigten Phosphatase. Eine Substratsättigung ist nicht gegeben. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 3.3.10 Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität mit dem 25 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 9 ist in Abb. 3.36 abgebildet. Die Abb. 3.36 stellt dagegen die Temperaturstabilität mit dem Universalpuffer dar. Beide Profile sind sich ähnlich. Bei einer Inkubationstemperatur von 40°C behält die Phosphatase mehr als 80 % ihrer Aktivität bei. Bei 50°C sank die Aktivität nach 20 min auf die Hälfte und bei 55°C bereits nach weniger als 5 min. Die vollständige Inaktivierung trat im Tris/HCl-Puffer nach ca. 6 min ein und im Universalpuffer nach 20 min.



**Abb. 3.36:** Temperaturstabilität der aufgereinigten Phosphatase. Die Aktivität wurde in einem 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 9 gemessen.



**Abb. 3.37:** Temperaturstabilität der aufgereinigten Phosphatase. Die Aktivität wurde im Universalpuffer, pH 10 gemessen.

### 3.3.11 Gelelektrophorese

Im nativen Zustand hatte die isolierte und aufkonzentrierte Phosphatase ein scheinbares Molekulargewicht von 48,36 kDa (Abb. 3.38). Die Gelelektrophorese mit einer vorher denaturierten Phosphatase ergab ein scheinbares Molekulargewicht von 59,58 kDa (Abb. 3.38)

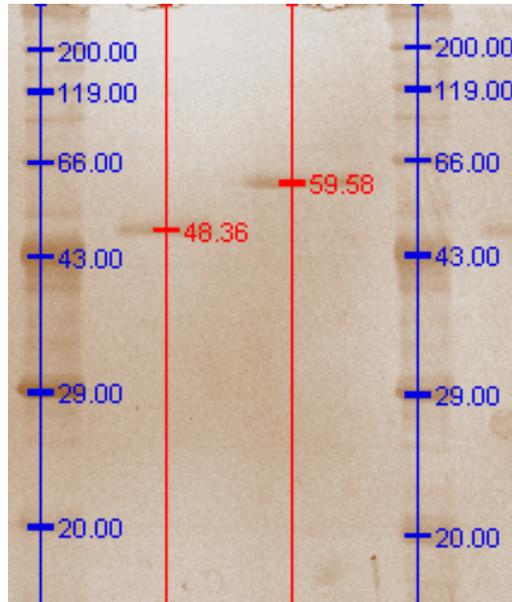
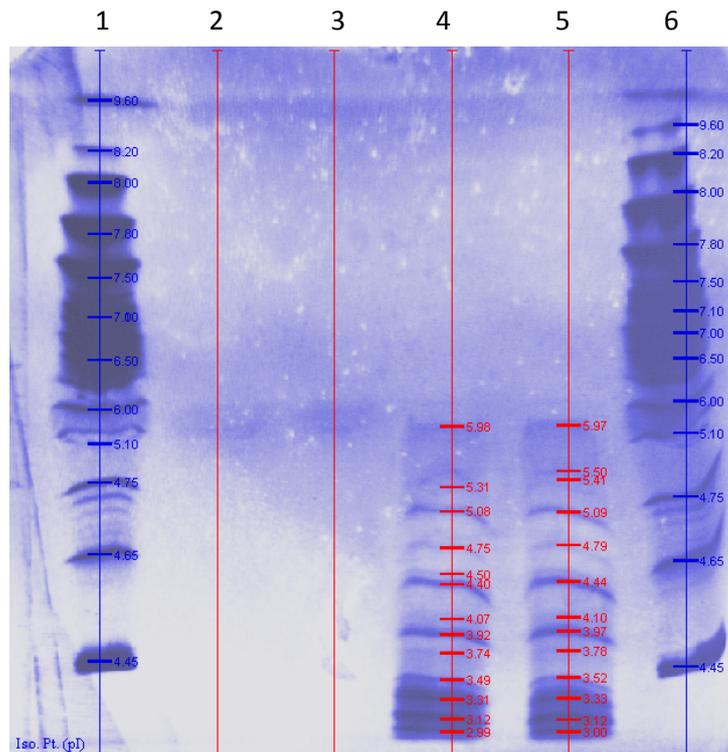


Abb. 3.38: Gegenüberstellung einer nativen und denaturierten Phosphatase Probe.

### 3.3.12 Isoelektrische Fokussierung

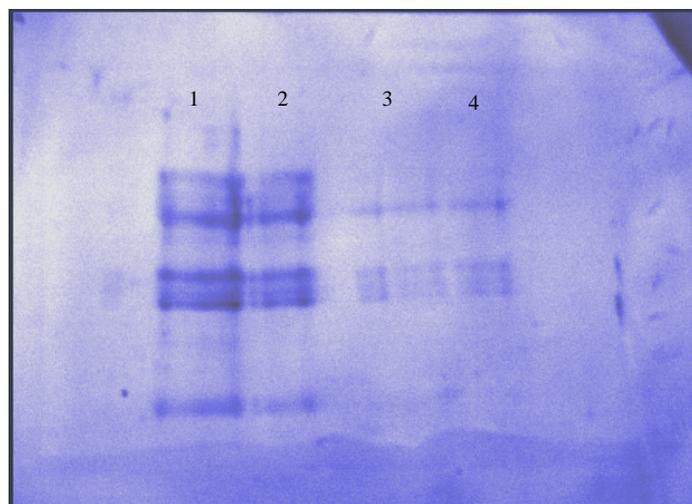
Nach der isoelektrischen Fokussierung mit den PhastGel IEF 3-9 Gelen waren von der aufgereinigten Phosphatase keine klaren Banden erkennbar. Der PhastGel Sample Applicator wurde an unterschiedlichen Bereichen der Gele, nahe der Anode oder auch Kathode, platziert. Bei allen Gelen ist nur ein Abdruck des Proben-Applikators sichtbar. Als Kontrolle wurden ein IEF Standard und der Rohextrakt (1:10 verdünnt) aufgetragen (Abb. 3.39). Alle Proteine der Magenflüssigkeit sind in den sauren Bereich zur Anode gewandert. Ihre isoelektrischen Punkte variierten von 3,0 bis 5,97.



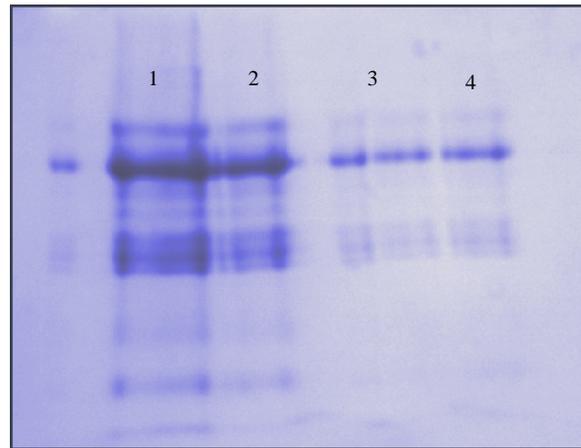
**Abb. 3.39:** 1. IEF Standard, 2.-3. aufgereinigte Probe 3.-5. Magenflüssigkeit (1:10), 6. IEF Standard

### 3.3.13. Diskontinuierlicher Western Blot

In Abb. 3.40 ist die Membran eines diskontinuierlichen Western Blot mit dem aufgereinigten Enzym dargestellt. Hierfür wurde zuerst ein SDS-PAGE mit einer aufkonzentrierten und isolierten Phosphatase Probe erstellt. In der Regel sind auf dem Gel nur 2 Banden sichtbar (siehe oben). Da jedoch die Probe nach der Zugabe des Probenpuffers ausfiel ist es möglich, dass das Protein in verschiedene Untereinheiten zerfallen ist und somit mehrere Banden entstanden sind (Abb. 3.40, Abb. 3.41).



**Abb. 3.40** geblottete Membran mit der zuvor aufkonzentrierten extrazellulären Phosphatase (1-4).



**Abb. 3.41:** Das zur Kontrolle mit Coomassie angefärbte Blotting Gel

Als Kontrolle wurde das verwendete Blot-Gel ebenfalls mit Coomassie angefärbt. Hierbei sind noch deutlich Proteinbanden sichtbar. Ein vollständiger Proteintransfer ist nicht erfolgt.

### 3.3.14 Teilsequenzierung isolierter Enzymbanden

Bei der massenspektrometrischen Teilsequenzierung der aufgereinigten Phosphatase wurden folgende Peptide identifiziert:

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Peptid 1: R.QSAKSLPKPPNSSGR.N | 17 AS  |
| Peptid 2: K.SSDKLTIDIEFSALK.E | 17 AS  |
| Peptid 3: R.IPFMRANAPDNTK.R   | 15 AS  |
| Peptid 4: R.GDVEKALEEMK.S     | 13 AS  |
| Peptid 5: R.ILMVLDTL.R        | 10 AS  |
| Peptid 6: R.IELSERVK.E        | 10 AS  |
| Peptid 7: R.LKLSEAALK.E       | 11 AS  |
| Peptid 8: K.LLAALLHTGNITYR.A  | 16 AS  |
| Peptid 9: R.EFDVAIGAR.V       | 11 AS  |
| Gesamt                        | 120 AS |

Mithilfe des Protein Suchprogramms Blast (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) können identifizierte Ausgangssequenzen mit bereits bekannten Sequenzen innerhalb der NCBI Datenbank verglichen werden. In dieser Datenbank befinden sich unzählige bekannte Sequenzen aus allen Tier-, Pflanzen- und Bakterienbereichen. Es werden alle Sequenzen angezeigt, die eine Ähnlichkeit mit der Ausgangssequenz aufweisen.

Die oben dargestellten Peptide wurden in Proteinen der nachfolgenden Organismen gefunden. Auffällig ist, dass verstärkt abgeleitete Peptidsequenzen aus dem Genom von Insekten vorgefunden worden.

*Drosophila ananassae* (GI|194768949)

423 ...QGHFQMP AQMPAQMTAH MPHHAQPAIM HAVHHARQIP PAISGPIYAS PPRPEPQVPQ  
 481 VAPSPSPPPP PVVEVKVAPG VSVTKSSDKL TIDIEFSALK EEAPPPPPLP PPPARNVVEE  
 541 SYSNMFKIIG RHVIVRRKSV LSRNRLVRGS LKDRHDKLEA FQKMVTPPSP EEECKDM...  
 783 ...TAILKPE TKAPTNMKPE PKPEVKPVAP PKYKEAKPTH LEQKKDVSTG TPPSKASSNP  
 841 PKSSKTPESP VVNISYWPLL GTRQSAKSLP KPPNSSGRNG PRQYYGDRSP MKSRRRSTDS  
 901 YFLETIINEN LVTSKRVLRL EANSNLVQST RIFRNQGPPE RELKVTTPAG RINGRESP...

*Drosophila melanogaster* (GI|8214) *Drosophila* 95F MHC (Myosin heavy chain)

1083 ...ELLEACR QEFHRRLKVY HAWKAKNRKR TTMDENERAP PSVMEAAFQK PPLVQPIQEI  
 1141 VTAQHRYFRI PFMRANAPDN TKRGLWYAHF DGQWIARQME LHADKPPILL VAGTDDMQMC  
 1201 ELSLEETGLT RKRGAIEILEH EFNREWERNG GKAYKNLGAA KPNGPAAAMQ KQQ

*Tribolium castaneum* (GI|189236235) Predicted: similar to CG13759 CG 13759-PA

1 MEYGPPISSK FTDVIHHLRH NFPDEPLNAS VGLCVHGKPC ELLEHHDLQT LEDGLSIMAV  
 61 ESTTGEIAGV ALNGIARRGD VEKALEEMKS IDNIKYQRIF GLLNNVNKSI DLFTKYNVVK  
 121 IFELRILSVD SRFRGRGIAK ELFLRSELIA EEHGFKLKLV DATSLFTQRA AECLGFI...

*Apis mellifera* (GI|110763299) Predicted: similar to CG2663-PB, isoform B

63 ...RCKLILE RYFSVRTAIP EFFAVRDPLA REIQECCEAI QYFILPSLTD EGYRVITILRL  
 121 KDSTIDKFSI QTISRILMV LDTRLIEEQC LSNIMVIDLE GFGVVHFTKC SPTQSIVRKA  
 181 MLAMQDSMPL RLHRVHFLHA PAFIENILNI FYPLLKVRVLV QKFRIHTGGG EELHSYM...

*Anopheles gambiae* (GI|118782571) AGAP002575-PA.

121 ...VKFSLIT DLNLSHNQMA RLPDELADLH SLEMLDISHN SFITLPAVVF KMPKLRLEKA  
 181 NNNAIIDIDR DEIIASDSLE LVDLRHNPLT PMCHDLLKHA VLSFRIELSE RVKEDWEDLT  
 241 ECE

*Anopheles gambiae* (GI|158289967) AGAP010377-PA

361 ...ALKRKLE LCEEMLQILR VLDPGVSRLT GIALYEHAA LVDLSRRNHD IGEIKTPELL  
 421 ERLKLSEAA KEAIGMLVFE HRTTPEGQLT KKAMCELKEL REYIQKVQAM EEDERTDRQN  
 481 KNNKNSNNN NNNKNLELT FKI

*Aedes aegypti* (GI|157115857) Myosin VII

1 MGDYIWIIEPV SGREFDVAIG ARVISAEGRR IQVRDDGNE LWLTPERRIK AMHASSVQGV  
 61 EDMISLGLDH EAGILRNLLI RYNDNLIYTY TGSILVAVNP YQILPIYTAD QIKLYKE...  
 241 ...NYHIFYC LLAGLSSDEK RKLNLGYASD YRYLTGGGCI KCDGRNDAE FADIRSAMKV  
 301 LCFSDHEIWE ILKLLAALLH TGNITYRATV IDNLDATEIP EHINVERVAN LLEVFPQFPI  
 361 DALTRKTLFA HGETVVSTLS RDQSM DV RDA FVKGIYGRLF VLIVKKINSA IYKPKSS...

Eine erneute Teilsequenzierung eingeschickter Proben ergab weitere, neue Peptidsequenzen. Einige dieser Sequenzen überschneiden sich innerhalb einiger Aminosäure-Abfolgen. Diese Peptide wurden angeglichen und vervollständigt. Insgesamt sind 104 Aminosäuren in 10 teil-überlappenden Peptiden bestimmt worden. Diese Peptide wurden in einer Aminosäure-N-Acetyltransferase des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* identifiziert.

*Dictyostelium discoideum* (GI|66802266) amino-acid N-acetyltransferase

MFSNIVNKKLQNSTTTTSFLRHYSTIKNTTTSPKGFKTGTYACGLKKSGALDICIHSEKECNVAAVFTE  
 NKVKAAPVLLSKSLIEKHKNTGFQSLI INSGGANACTGPEGEKNAQTMSFLSSKLVNAKQQSLVMSTGII  
 GQQLDMKKVELGITKASENLKDDWLSAAKAIMTTDKVPKLVQKQIEIQGKQVNITGICKGAGMIHPNMAT  
 MLCTLCTDADISEEALKSALKHSIDYSFN SINVDGDMSTNDTVAVFSNGLAGNKRIDSTNSKEYLLEKA  
 MRECATELAQMIVRDAEGATKFI SVVVRGAKTEKDGKIIANSIATSSLVKTAMYGEDANWGRVLAAVGYS  
 GADGVVPSNISMW FASGYGDNIGIGQKNDPLIAMQFLKDGQPTPKDDEKAAKLLSNKDISIIVDLNNGNQ  
 NYTMWTCDLTVDYVKANSHYRT

### 3.3.15 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung ergab die folgende Aminosäuresequenz:

EVEEDAAYWNKYMT(E/G)

Die letzten beiden Signale waren sehr schwach und es lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich tatsächlich um die Aminosäuren T, E/G handelt. Jeder einzelne der Buchstaben innerhalb der Sequenz bildet ein Kürzel für die entsprechende Aminosäure. Ausgeschrieben lautet die Sequenz wie folgt:

Glu-Val-Glu-Glu-Asp-Ala-Ala-Tyr-Trp-Asn-Lys-Tyr-Met-Thr-(Glu/Gly)

Ein Vergleich dieser Sequenz in der Datenbank des NCBI durch das Blastp Programm ergab eine Homologie zum N-Terminus der alkalischen Phosphatase der Eismeergarnele *Pandalus borealis*. Acht von neun Aminosäuren stimmen in dieser Anfangssequenz überein. Jedoch trägt der N-Terminus der Hummer-Phosphatase zusätzlich die beiden Aminosäuren Glu (E) und Val (V), die bei der Shrimp-Phosphatase fehlen.

Score = 29.1 bits (61), Expect = 47 Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Gaps = 0/9 (0%)

|            |       |   |                 |    |
|------------|-------|---|-----------------|----|
| Hummer ALP | Query | 1 | EVEEDAAYWNKYMT  | 15 |
|            |       |   | EED AYWNK       |    |
| Shrimp ALP | Sbjct | 1 | EEDKAYWNKDAQDAL | 15 |

Der Score-Wert bildet eine quantitative Bewertung der Ähnlichkeit zwischen der Suchsequenz und einer bekannten Sequenz. Je höher sein Wert ist, desto höher ist auch die Über-

einstimmung der Sequenzen. Der E-Wert steht für die Wahrscheinlichkeit, dass ein gegebenes Sequenzalignment signifikant ist. Query beschreibt die Sequenz, mit der in der Datenbank gesucht wurde. „Subject“ gibt die Sequenz an, die in der Datenbank gefunden wurde. In der Mitte dazwischen befinden sich die homologen Aminosäuren, die in den beiden Alignments übereinstimmen.

Die Struktur und die enzymatische Funktion der thermolabilen Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) ist hinreichend charakterisiert. Die Phosphatase wird aus der Mitteldarmdrüse isoliert und hat ein Molekulargewicht von 59 kDa (Nilsen et al. 2001). In einem kommerziellen Produkt wird die SAP für die Dephosphorylierung des 5`Phosphats von DNA und RNA eingesetzt und wird für Laborzwecke aus der Eismeergarnele isoliert.

### **3.3.16 SAP-Sequenz und Peptide der Hummer-Phosphatase**

Da die N-Termini der SAP und der Hummer-Phosphatase eine sehr gute Übereinstimmung zeigten, wurden auch die Peptide aus der massenspektrometrischen Teilsequenzierung mit der Aminosäuresequenz der SAP verglichen (Abb. 3.42). Keines der identifizierten Peptide konnte mit der SAP-Sequenz in Einklang gebracht werden. Die größte Sequenzidentität betrug lediglich 4 Aminosäuren (Position 188-191)

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```

SHRIMPALP  EEDKAYWNKDAQDALDKQLGKLRKQAKNVIFFLGDGMSLSTVTAARIYKGLTIGKFER 60
HGALP      EVEEDAAYWNKYMTE-----RRELSEK-VKE -----KLLAALLHTENIT--YRA
          ***  *****   :      *:*  *:*  .:*          .:  **  :*:*.:*  :.

SHRIMPALP  EKISWEEFDFAALSPTYNTDKQVTDSAASATAVLTGVKTNQSVIGLDANTVVRTNCSYQLD 120
HGALP      -----KGTGYACGLKK-SGALDI-----C-----
          .:  :*  *:*  .*.:.:  *

SHRIMPALP  ESLFTYSIAHWFQEAGRSTGVVTSRVTHTATPAGTYAHVADRDWENDSDVVDREDPEIC 180
HGALP      -----RIDSTN-----SKEY-----LIHSEKEMREC
          *:  .:  .:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

SHRIMPALP  DDIAEQLVFRPFGKNFKVMGGRRGFFPEALDIEDGIPGEREDGKHLITDWLDDKASQ 240
HGALP      N-VAAQMVFRSAKSFDAIC-ARRG-LPKP--DVEKALPNMKSSGRN----- 17
          :  :*  *:*  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

SHRIMPALP  GATASYVWNRDLLAVDIANTDYLMGLFSYTHLDTVLTRDAEMDPTLPENTKVAIEMLTK 300
HGALP      -----

SHRIMPALP  DENGFFLLVEGGRIDHMHANQIRQSLAETLDMEEAVSMALSMTDPEETIILVITADHGHT 360
HGALP      -----RILMV--KSSDK
          *:*  *  .  .  .

SHRIMPALP  LTIITGYADRNTDILDIFAGISDLDLDRRYTILDYGSPPGYHITEDGKRYEPTEDLKDINFR 420
HGALP      LTIID-----IEFSALKELDTRRIPFMR-ANAP-----DNTKRLKLSAALKK-----
          ***          :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

SHRIMPALP  YASAAPKHSATHDGTDVGIWVNGPFAHLFTGVYEENYIPHALAYAACVGTGRFTCD 476
HGALP      -----MFSNIVNKK-----
          *:  .:  :  :

```

**Abb. 3.42:** Vergleich der Aminosäuresequenz der SAP mit dem N-Terminus und weiteren Peptiden aus der Hummer-Phosphatase. Identische Aminosäuren sind grün markiert. Cystein ist gelb markiert.

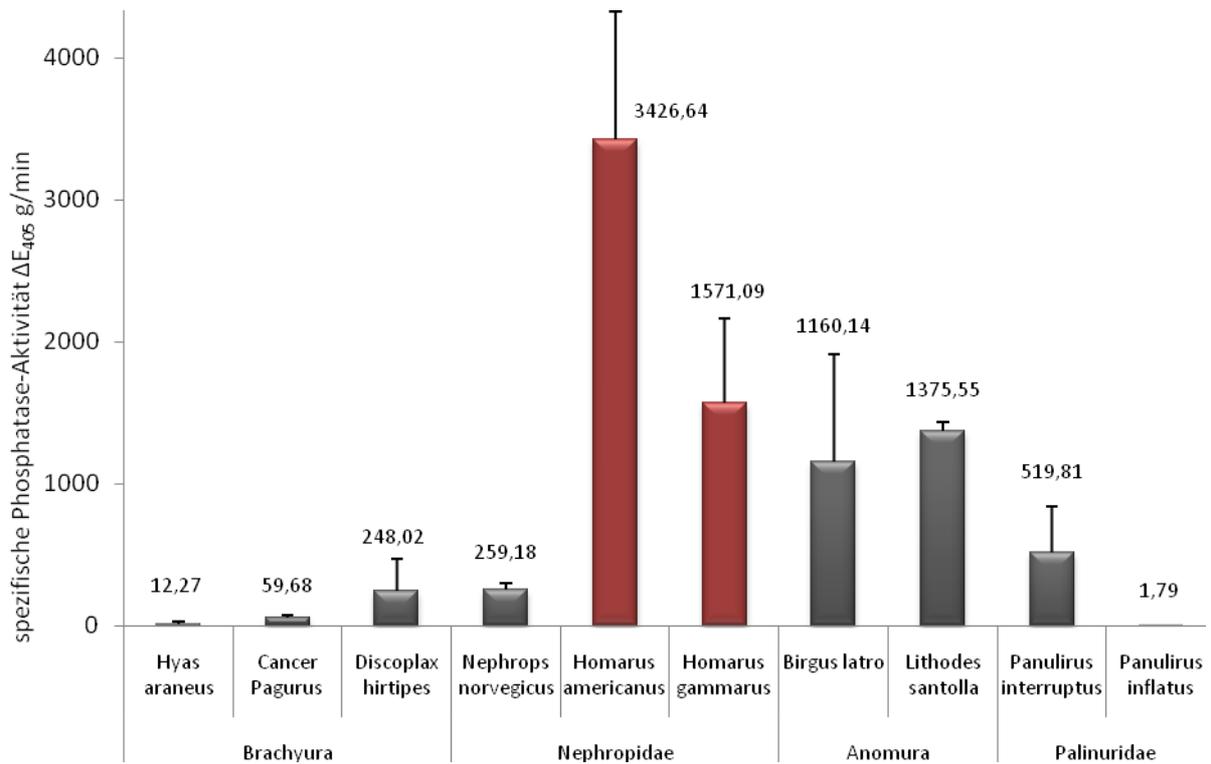


## 4. DISKUSSION

Phosphatasen sind in allen Zellen und Geweben unterschiedlichster Organismen nachgewiesen worden (Olsen et al. 1991). Obwohl diese Phosphatasen die gleiche katalytische Grundfunktion haben, sind ihre jeweiligen spezifischen Eigenschaften weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften einer extrazellulären Phosphomonoesterase aus der Verdauungsflüssigkeit des Europäischen Hummers (*Homarus gammarus*) untersucht. Neben der Bestimmung der allgemeinen funktionellen Parameter wurden auch die molekularen Eigenschaften des Enzyms näher betrachtet. Die ebenfalls in der Verdauungsflüssigkeit identifizierte Phosphodiesterase konnte nicht hinreichend isoliert werden. Deshalb behandelt die nachfolgende Diskussion ausschließlich die Phosphomonoesterase des Hummers.

### Phosphatase-Aktivitäten in decapoden Krebsen

Trotz der weiten Verbreitung von Phosphatasen in unterschiedlichen Organismen, wurden extrazelluläre Phosphatasen bisher nur in wenigen Metazoa nachgewiesen (Olsen et al. 1991). In dekapoden Krebsen sind sie in der Magenflüssigkeit vorhanden. Ihre Aktivität unterscheidet sich jedoch erheblich zwischen den Arten (Abb. 4.1). Die höchsten Aktivitäten traten in den hummerartigen Krebsen auf. Aber auch die Königskrabbe *Lithodes santolla* und der Palmendieb *Birgus latro* zeigen sehr hohe Phosphatase Aktivitäten. Im Gegensatz dazu waren die Phosphatase-Aktivitäten der restlichen untersuchten Arten (Brachyura und Palinura) eher gering bzw. sehr gering. Unter den drei hummerartigen (Nephropidae) weisen zwar der Amerikanische- und der Europäische Hummer die höchsten Aktivitäten auf, jedoch hat der nahe verwandte Kaisergranat (*Nephrops norvegicus*) niedrige Aktivitäten. Ebenso finden sich unter den Langusten (Palinura) eine Art mit mittlerer und eine Art mit sehr niedriger Aktivität (Abb. 4.1). Beide Anomuren mit einheitlich hoher Phosphatase-Aktivität unterscheiden sich erheblich in ihrer Lebensweise. *L. santolla* lebt in den sub-poalaren Gebieten Südamerikas und hat sich an die dort herrschenden niedrigen Wassertemperaturen angepasst (Anger et al. 2004). In diesen Regionen ist auch die Nahrungsverfügbarkeit limitiert. *L. santolla* ernährt sich von benthischen Organismen und verzehrt auch Aas (Balzi 1997 zitiert aus Saborowski et al. 2006). Die andere Anomurenart, der Palmendieb *Birgus latro*, ist ein Landeinsiedlerkrebs aus tropischen Breiten und ernährt sich omnivor (Wilde et al. 2004). Aus der Zusammenstellung der Arten lässt sich nicht eindeutig ableiten, ob die Aktivität der Phosphatase mit der systematischen Zuordnung, oder der Lebensweise der Arten in Verbindung steht.



**Abb. 4.1:** Aktivität der Phosphatase aus der Magenflüssigkeit verschiedener Decapoder Krebse. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Achse. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ )

Sowohl in marinen und als auch in terrestrischen Krustentieren werden die extrazellulären Phosphatasen zwar in der Magenflüssigkeit akkumuliert, aber in der Mitteldarmdrüse gebildet (Barker und Gibson 1977). Um die Abläufe der Enzymsekretionen dekapoder Krebse, und besonders beim Europäischen Hummer, näher zu erläutern, möchte ich zunächst auf die Anatomie und Physiologie des Verdauungssystems eingehen.

### **Anatomie und Physiologie des Verdauungssystems von Crustaceen**

Der Darm der Crustaceen durchzieht die gesamte Länge des Körpers von der vorderen Mundöffnung bis zum Anus am Ende des letzten Körpersegmentes (Dall und Moriarty 1983). Der Verdauungstrakt unterteilt sich in Vorder-, Mittel- und Enddarm. Von der Mundöffnung her führt der kurze Oesophagus (Schlund) in den zweiteiligen Magen. Der Kaumagen gehört zum ektodermalen Vorderdarm. Dieser ist mit einer komplizierten Muskulatur ausgekleidet und mit Magenzähnen ausgestattet. Seine Aufgabe besteht darin, die aufgenommene Nahrung durchzukneten und zu zerkleinern. Die in der Mitteldarmdrüse synthetisierten Verdauungsenzyme werden ebenfalls in den Kaumagen

geleitet und dort mit der Nahrung vermischt. Im zweiten Teil des Magens (Filtermagen) werden grobe und feine Partikel voneinander getrennt. Die feineren Partikel gelangen zur Endverdauung in die Mitteldarmdrüse. Die Größeren Partikel werden direkt in den Enddarm befördert (Storch und Welsch 2005). Der Mitteldarm steht direkt mit der Mitteldarmdrüse in Verbindung. Die Mitteldarmdrüse, auch Hepatopankreas genannt, erfüllt in etwa die Funktionen von Leber und Bauchspeicheldrüse (Menzorova et al. 2006). Sie ist nicht nur für die Resorption der Nahrung und für die Bildung von Verdauungsenzymen verantwortlich (Navarrete del Toro et al. 2006), sondern auch für die Speicherung von Nährstoffen (Dall und Moriarty 1983, Verri et al. 2001). Die Mitteldarmdrüse bildet das bei weitem größte und voluminöseste Verdauungsorgan der Krebse. Dieses Organ besteht aus vielen hundert blind endender Tubuli. Diese sind mit einschichtigen Epithelien ausgekleidet (Vogt 1996). In diesem Drüsenschlauchepithel lassen sich wiederum 4 Zelltypen voneinander unterscheiden (Loizzi 1971). *Embryonalzellen* (E-Zellen) befinden sich an der Spitze der blinden Röhren. Die *Fibrillenzellen* (F-Zellen), *Blasenzellen* (B-Zellen) und *Restzellen* (R-Zellen) befinden sich entlang der Röhren. Diese Zelltypen werden klar voneinander differenziert. Alle diese ausgereiften Zellen haben direkten Kontakt zum Lumen der Tubuli und zur Hämolymphe (Vogt 1996). Die apikalen E-Zellen differenzieren sich zu den R-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, Nährstoffe zu speichern. Desweiteren können sich die E-Zellen zu den F-Zellen differenzieren, die sekretorische Eigenschaften besitzen. Die Fibrillenzellen bilden die Vorläuferzellen der Blasenzellen, die sich durch eine große Vakuole mit Verdauungsenzymen auszeichnen (Dall und Moriarty 1983). Die Vakuole nimmt rund 80-90% der Zelle ein. B-Zellen sind für die Abgabe der Verdauungsenzyme in den Kaumagen verantwortlich. Die Synthese der Enzyme erfolgt vermutlich bereits in den großen Vakuolen der F-Zellen. (Loizzi 1971). Alle Zellen haben eine hohe Ribosomendichte und einen ausgeprägten Golgi-Apparat (Loizzi 1971). Verschiedene Phosphatasen sind in den vier hepatopankreatischen Zellenarten nachgewiesen worden (Barker und Gibson 1977).

Ein kompletter Verdauungszyklus dauert beim Europäischen Hummer rund 12 Stunden (Barker und Gibson 1977). Während der ersten 4 Stunden nach der Nahrungsaufnahme werden die Nahrungspartikel graduell kleiner und ihre Konsistenz wechselt von fest über weich bis zu schleimig. Die Magenflüssigkeit, die vor der Nahrungsaufnahme zunächst ölig und bräunlich ist, wird milchig. Nach 5 Stunden sind die größten Nahrungspartikel

verschwunden und der Kaumagen füllt sich erneut mit Magenflüssigkeit an (Barker und Gibson 1977). Das Gemisch aus kleinsten Nahrungspartikeln und Magenflüssigkeit gelangt nun in den Filtermagen. Hier werden die verbleibenden Partikel herausgefiltert und die Nährstoffe aus der Magenflüssigkeit werden anschließend von der Mitteldarmdrüse aufgenommen, resorbiert und dort gespeichert.

Nach der Nahrungsaufnahme erfolgt die Abgabe der extrazellulären Enzyme in 3 Schritten jeweils nach 0 bis 15 Minuten, 1 bis 2 Stunden und 3,5 bis 5 Stunden. Die sekretorische Abgabe der Enzyme erfolgt beim Europäischen Hummer holokrin (Barker und Gibson 1977). Dieser Begriff beschreibt die Eigenschaft exokriner Drüsen, ihr Sekret unter dem kompletten Zerfall der sekretorischen Zellen an äußere oder innere Oberflächen abzugeben. Die Zellen werden ins Innere des Tubulilumens abgegeben und aufgelöst. Die abgegebenen Zellen werden von den nachrückenden Zellen ersetzt. Die frei werdenden extrazellulären Enzyme zu denen die Endopeptidasen, Lipasen, Esterasen und auch die Phosphatasen zählen, werden in den Kaumagen geleitet (Loizzi 1971).

Saure und alkalische Phosphatasen lassen sich in 3 der 4 Zelltypen des Mitteldarmdrüsenepitheliums nachweisen. In den F- und B-Zellen sind die Enzyme in den Vakuolen nachweisbar. Der Bürstensaum der R-Zellen zeigt nahezu immer eine starke saure und alkalische Phosphatase Aktivität, die allerdings nur in den ersten zwei bis vier Stunden nach der Nahrungsaufnahme auftritt. Die genaue Funktion der Phosphatase am Verdauungsprozess der Crustaceen ist nicht eindeutig belegt. Barker und Gibson (1997) vermuten, dass saure und alkalische Phosphatasen an allen Verdauungsprozessen beteiligt sind. Darunter fallen sowohl die Synthese und Sekretion der extrazellulären Enzyme, als auch die Aufnahme von Nährstoffen. Nachweislich sind Phosphatasen beim aktiven Transport von Stoffwechselprodukten durch die Zellmembran bei Crustaceen beteiligt (Travis 1957). In Copepoden absorbiert die alkalische Phosphatase kleinere Moleküle während des Verdauungsprozesses (Goyffon und Martoja 1983).

Im Gegensatz zu den Hummern weisen die Langusten (Palinuridae) eher ein apokrines, statt ein holokrines Sekretionssystem auf (Travis 1954). Bei der apokrinen Sekretion bleibt die Zelle weitgehend intakt und wird nicht abgestoßen. Das Sekret wird von der Zelle abgeschnürt und ist von einem Teil des Cytoplasmas umgeben. Die Neubildung sekretorischer Zellen ist somit nicht so komplex gestaltet wie bei dem holokrinen System. In den Langusten gibt es keine so differenzierte Unterteilung der Epitheliumzellen in der Mitteldarmdrüse wie bei den Hummern (Travis 1954). Sekretorische und absorbierende Zellen treten häufig

nebeneinander auf. Während der Häutung des Tieres dienen die Zellen der Mitteldarmdrüse als Hauptspeicherstätte für organische- und mineralische Reservestoffe (Verri et al. 2001). Die absorbierenden Zellen weisen Bereiche auf, in denen während der einzelnen Häutungsstadien Kalk abgelagert wird. Innerhalb dieser Zellen ist eine sehr aktive alkalische Phosphatase nachgewiesen worden (Travis 1954). Phosphatasen sind möglicherweise nicht nur im aktiven Transfer von Molekülen beteiligt, sondern auch bei der Hydrolyse und Dephosphorylierung von Glucosephosphat. Letzteres bildet eventuell einen Ausgangspunkt für die Chitinbildung (Renauld 1949 zitiert aus Travis 1954). Die Beteiligung der alkalischen Phosphatase an Kalkeinlagerungsprozessen während der Häutung bei Crustaceen wird schon seit längerem vermutet (Zhu et al. 1999, Wheathly 1999). Ali und Evans (1973) fanden, dass die Kalkeinlagerungen durch dieselben Komponenten inhibiert werden können, die auch die alkalische Phosphatase inhibieren.

Warum die alkalische Phosphatase-Aktivität in der Magenflüssigkeit der beiden Hummer-Arten besonders hoch ist, könnte durch die verschiedenen Mechanismen (holokrin vs. apokrin) der Enzymsekretion erklärt werden.

Nach der Stimulation durch die Nahrungsaufnahme wird vermehrt die holokrine, statt die apokrine Sekretion der Verdauungsenzyme gefördert (Gibson und Barker 1979). Dieser Mechanismus variiert zwischen den unterschiedlichen Arten der Dekapoda. Die Bildung der sekretorischen B- und F-Zellen ist stark von der Verfügbarkeit an Nahrung abhängig. Möglicherweise hat dies ebenfalls einen Einfluss auf die Produktion der extrazellulären Enzyme. Die B-Zellen, die nicht durch die holokrine Exkretion in die Verdauungsflüssigkeit abgegeben werden, unterliegen im Falle von Nahrungsmangel einer Rückentwicklung in F-Zellen (Verri et al. 2001). Unterschiedliche Phosphatase-Aktivitäten verschiedener decapoder Organismen lassen sich möglicherweise auf diesen Mechanismus der Rückentwicklung zurückführen, da extrazelluläre Enzyme in den B-Zellen und nicht in den F-Zellen produziert werden

Neben den marinen und terrestrischen Decapoden, besitzen auch andere marine Spezies holokrine Sekretionsmechanismen im Verdauungstrakt. Auch hier treten unterschiedliche Zellstrukturen der Epithelien im Mitteldarm auf. Ein Beispiel dazu bietet das Epithel des Kalmars *Sepioteuthis lessoniana*. Es zeigt eine sehr hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Verdauungszellen. Die saure Phosphatase dagegen zeigt nur eine geringere Aktivität. Auch hier ist die alkalische Phosphatase vermutlich wie bei den

Crustaceen, an der Absorption von Molekülen und Nährstoffen im Verdauungstrakt (Semmens 2002) und beim aktiven Transport dieser durch Membranen beteiligt (Boucaud-Camou und Roper 1995).

Der Skorpion *Androctonus australis* soll als ein weiteres Beispiel dienen. Sein Verdauungssystem besteht aus Divertikeln die durch ein einfaches Epithelium ausgekleidet sind. Das Epithelium zeigt Ähnlichkeiten zu denen der Cephalopoden (Kopffüßler) und unterteilt sich in basophile Zellen und in Verdauungszellen (Goyffon und Martoja 1983). Die basophilen Zellen geben für die partielle Verdauung der Nahrung Exoenzyme ins Lumen der Divertikel ab. Die Verdauungszellen sind frei von alkalischer Phosphataseaktivität, aber reich an saurer Phosphatase (Goyffon und Martoja 1983). Sogenannte R-Zellen die eine alkalische Phosphataseaktivität aufweisen, existieren im Epithelium des Skorpions nicht. Die spezifische Aufgabe dieser sauren Phosphatase ist nicht näher bekannt.

### **Einfluss verschiedener Faktoren auf die Phosphatase – Aktivität**

Das Auftreten extrazellulärer Phosphatasen ist anscheinend stark an die Verfügbarkeit von Nahrung, deren Aufnahme und Verdauung gekoppelt. Jedoch drängt sich auch die Frage auf, ob die Veränderung des pH-Wertes durch die Nahrung ebenfalls einen Effekt auf die enzymatische Aktivität der Phosphatase besitzt. Der Mechanismus zur Aufrechterhaltung eines schwach sauren pH-Wertes im Magen der Dekapoden ist bisher unbekannt. Bei vielen Wirbellosen treten im Verdauungstrakt Carbonhydrate auf, die oft mit der Bildung eines sauren pH in Verbindung gebracht werden. Solche Anhydrate sind beim Europäischen Hummer jedoch nicht nachgewiesen worden (Barker und Gibson 1977). Dennoch ist eine Anpassung des pH-Wertes im Verdauungstrakt wichtig, den Veränderungen des pH-Wertes würden den enzymatischen Abbau der Nahrung verändern und ggf. beeinträchtigen. Die Magenflüssigkeit des Europäischen Hummers hat vor der Aufnahme von Nahrung einen pH-Wert im sauren Bereich zwischen 4,7 und 4,9. Nach der Aufnahme von Nahrung steigt der pH-Wert um fast eine Einheit an. Die isolierte extrazelluläre Phosphatase hat ein pH-Optimum *in vitro* um pH 9 bis pH 10. Ein derartig hoher Anstieg des pH-Wertes im Magen ist auszuschließen. Dennoch könnte der leichte Anstieg des pH-Wertes um fast eine Einheit einen positiven Effekt auf die Umsatzraten zur Folge haben. Die nicht aufgereinigte extrazelluläre Phosphatase in der Magenflüssigkeit verzeichnete im sauren pH-Bereich zwar eine geringe Aktivität (Kapitel

3.1.2) aber eine relativ hohe Stabilität (Kapitel 3.1.3) Lediglich im aufgereinigten Zustand war die Stabilität der Phosphatase bei niedrigen pH-Werten stark verringert (Kapitel 3.3.5). Offenbar wirken Bestandteile der Magenflüssigkeit wie z.B. Proteine, Emulgatoren oder Salze stabilisierend auf die Phosphatase.

Die chromatographische Aufreinigung der Magenflüssigkeit diente der schrittweisen Entfernung von unerwünschten Fremdproteinen. Durch die angewendeten chromatographischen Methoden wurden nahezu alle der in der Magenflüssigkeit befindlichen Fremdproteine entfernt. Diese Fremdproteine übten möglicherweise einen positiven, stabilisierenden Effekt auf die extrazelluläre Phosphatase aus. Des Weiteren können die extrazellulären Enzyme im Magen, darunter auch die Phosphatasen, in einer inaktiven Form vorliegen und wechseln erst in die aktive Form sobald die Enzyme für die Verdauung der Nahrungsfragmente benötigt werden (Vogt 1996). Ob sich die Enzyme dabei in einem glykosylierten Zustand befinden ist unklar, dennoch würde dies einen Schutz vor dem proteolytischen Abbau durch Endopeptidasen bieten. Proteinglykosylierungen, besonders die O-Glykosylierungen tritt häufig bei Membranproteinen sowie sekretorischen Proteinen auf (Müller-Esterl 2004). Diese Proteinglykosylierungen finden im Golgi-Apparat der Zellen statt. In den Epitheliumzellen der Mitteldarmdrüse sind eine höhere Anzahl von Lysosomen und ein ausgeprägtes Golgi-Netzwerk nachgewiesen worden. Eventuell ist die Erhöhung des pH-Wertes durch die Nahrungsaufnahme ein induzierendes Signal für die Aktivierung der katalytischen Eigenschaften der Enzyme, die evtl. durch die Entfernung der glykosidischen Komponenten bewirkt wird.

Weitere stabilisierende Eigenschaften werden den Metallionen nachgesagt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, benötigen die Hydrolasen zu denen auch die alkalischen Phosphatasen zählen, Metallionen als Cofaktoren (Olsen et al. 1991, De Prada 1997). Diese Ionen werden im aktiven Zentrum gelagert und dienen dazu, die Bindung des Substrates zu verbessern. Die durchgeführten Messungen in dieser Arbeit ergaben jedoch, dass die isolierte und aufgereinigte extrazelluläre Phosphatase weder Zink- noch Magnesiumionen benötigt. Offensichtlich handelt es sich bei der isolierten Phosphatase nicht um ein Metalloenzym wie bei vielen intrazellulären Phosphatasen. Statt die Enzymaktivität zu steigern, inhibieren die Metallionen bei der Hummer-Phosphatase die Aktivität bereits bei geringen Konzentrationen. Nur beim Rohextrakt bewirken die Magnesiumionen eine Steigerung der enzymatischen Aktivität um rund 20%. Die

Ursachen hierfür sind leider unklar. Magnesiumionen gelten als Phosphat transportierende, bzw. den Phosphathaushalt regulierende Ionen.

Bei der Umsetzung des Substrates p-Nitrophenylphosphat wird Phosphat freigesetzt. Phosphat ist jedoch ein Inhibitor (de Backer 2002) und konkurriert mit dem Substrat um die freien Bindestellen im aktiven Zentrum des Enzyms (Karlson 1984). Die Produktinhibierung ist eine Form der kompetitiven Hemmung. Diese tritt immer stärker in Erscheinung je höher die Produktkonzentration ist (Müller-Esterl 2004). Tatsächlich zeigten bereits geringe Konzentrationen von 0,1 mM Phosphat inhibierende Wirkungen auf die alkalische Phosphatase. Bei pH 9 wurde die Phosphatase bereits um rund 80% gehemmt. Anders dagegen verhielt sich die Enzymaktivität im sauren pH-Bereich. Die Messungen mit einem Essigsäure/Acetat pH 4 Puffer zeigten, dass die Phosphatase hier noch Phosphatkonzentrationen von 0,1 mM fast vollständig standhielt. Erst bei einer Konzentration von 1 mM verlor das Enzym rund 40% seiner Aktivität. Dieser Puffer spiegelt in etwa das saure Milieu wieder, welches in der Magenflüssigkeit beim Europäischen Hummer herrscht. Offenbar besteht zwischen dem pH-Wert und der Konzentration an Phosphationen ein Zusammenhang im Bezug auf die katalytische Aktivität und somit auch auf die Stabilität der Phosphatase. In der Magenflüssigkeit des Europäischen Hummers beträgt die Phosphat-Konzentration ca. 2 mM (vorläufige Messung, Daten nicht dargestellt). Das Phosphat wirkt vermutlich als Puffer um den pH-Wert stabil zu halten.

Des Weiteren sind viele alkalische Phosphatasen thermolabil (Menzorowa et al. 2006). Die alkalische Phosphatase des Europäischen Hummers verliert 50% seiner enzymatischen Aktivität bei einer Temperatur von 50°C und nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten. Nach 60 Minuten verliert das Enzym bei gleicher Temperatur bis zu 70% seiner Aktivität. Bei Temperaturen ab 55°C ist das Enzym innerhalb weniger Minuten vollständig inaktiv. Temperaturveränderungen können zu Änderungen der Proteinstruktur führen und somit die Funktionsfähigkeit eines Proteins beeinträchtigen (Hochachka und Somero 1980). Diese Denaturierungen sind teilweise reversibel und auch irreversibel. Denaturierungen, die durch die Zugabe von Reduktionsmitteln hervorgerufen werden, lassen sich durch die Entfernung dieser Stoffe teilweise rückgängig machen (Müller-Esterl 2004). Die Phosphatase zeigte im Anschluss jedoch keinerlei katalytischen Aktivitäten mehr, womit die Denaturierung der alkalischen Phosphatase offenbar irreversibel ist.

### Vergleich der Eigenschaften von anderen Phosphatasen

Die alkalischen Phosphatasen von verschiedenen Mikroorganismen wie z.B. *Micrococcus sodonensis*, *E.coli*, und der Hefe sind bereits teilweise bekannt und ausführlich untersucht worden (Glew et al., 1970). Das Enzym von *Micrococcus sodonensis* besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa und ein pH Optimum bei pH 9 bis 9,5. Als kompetitive Inhibitoren zählen Orthophosphat, Arsenit und Arsenat. Cystein, welches als ein potenter Inhibitor der Phosphatasen von *E.coli* und auch beim Europäischen Hummer ist, hat auf die Phosphatase von *M. sodonensis* keine Wirkung. Sie benötigt zudem  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  Ionen als Cofaktoren für ihre katalytische Funktion (Glew et al. 1970).

Ähnliche Eigenschaften weist die Phosphatase von *E.coli* auf. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 86 kDa und ist somit größer als das von *M. sononensis*. Als Erinnerung, die Molmasse der alkalischen Phosphatase des Europäischen Hummers liegt bei 60 kDa. Die extrazelluläre Phosphatase von *E.coli* besitzt 2 Untereinheiten und 4  $Zn^{2+}$  Ionen pro Molekül. Das Enzym befindet sich im periplasmatischen Raum der Zelle und kann mit Hilfe eines osmotischen Schocks von den Zellen abgegeben werden (Glew et al. 1970). Mikroorganismen benötigen die Phosphatasen auch um Phosphat von organischen Komponenten ab zu spalten, sofern freies anorganisches Phosphat limitiert ist (De Prada et al. 1997). Die alkalischen Phosphatasen von Bakterien und Hefen weisen ähnliche thermische Eigenschaften auf wie das Enzym des Europäischen Hummers. Das Enzym verliert ab 45°C bis 50°C massiv an Aktivität (de Prada 1997, Fernandez et al. 1981). Ein direkter Vergleich der extrazellulären Phosphatase des Hummers mit denen der Langusten, Anomuren und Brachyuren wäre sehr interessant, überstieg aber den Rahmen dieser Arbeit.

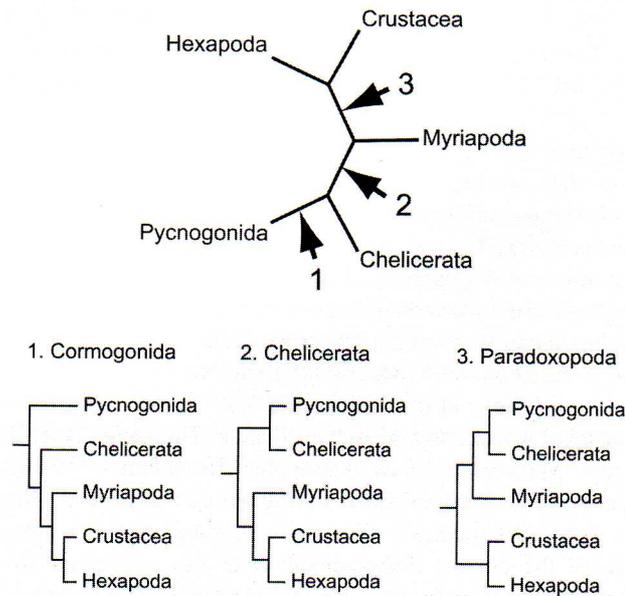
Zellulär auftretende Phosphatasen, wie zum Beispiel die SAP von *Pandalus borealis* besitzen zum Teil die gleichen Eigenschaften wie die extrazellulären Phosphatasen anderer Arten (Olsen et al. 1991). Dieses Enzym aus der Mitteldarmdrüse der Eismeergarnele besitzt ebenfalls ein pH Optimum im alkalischen Bereich bei pH 10 bis 10,5. Die Phosphatase ist ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 155 kDa. Nilsen (2001) korrigierte das Molekulargewicht der SAP später jedoch auf 54 kDa. Inhibiert werden kann das Enzym mit EDTA, L-Phenylalanin und L-Homoarginin. Im Vergleich zu anderen dimeren Phosphatasen behält die alkalische Phosphatase der Eismeergarnele ihre katalytischen Eigenschaften beim Zerfall in seine Untereinheiten bei (Olsen et al. 1991). Prinzipiell unterscheiden sind die intrazellulären Phosphatasen von den extrazellulären Phosphatasen, dennoch ergab die Sequenzierung des N-Terminus der

extrazellulären Phosphatase vom Europäischen Hummer Sequenzanalogien zu der zellulär auftretenden Phosphatase der Eismeergarnele (Kapitel 3.3.15). Der Vergleich beider N-terminalen Stücke ergab eine Übereinstimmung von 88%.

### **Phylogenetisches System und Verwandtschaft zwischen den Arthropoden**

Im Gegensatz zur N-terminalen Sequenzierung ergab die Sequenzanalyse kurzer Peptidfragmente innerhalb des Enzyms Homologien mit verschiedenen Insektenarten der Gattung *Drosophila*. Myosinähnliche Phosphatasen und sogar eine „Myosin-Heavy-Chain“ Phosphatase, also die schwere Kette des Myosins, sind darunter identifiziert worden. Zwischen den Insekten und den Crustaceen scheint eine engere Verwandtschaft zu bestehen als bisher vermutet.

In jüngster Zeit werden die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Großgruppen der Arthropoden erneut diskutiert (De Panafieu und Gries 2007). Molekulargenetische, entwicklungsbiologische und morphologische Untersuchungen legen eine engere Verwandtschaft zwischen Insekten und Krebsen nahe (Abb. 4.2). Neuere Hypothesen stellen die Insekten in ein Schwestergruppenverhältnis zu der Crustaceengruppe. Und tatsächlich haben die Krustentiere zahlreiche Gemeinsamkeiten mit den Insekten. Sie besitzen den gleichen grundsätzlichen Körperbau, unterscheiden sich allerdings in der Anzahl und Form ihrer Fortsätze (Wehner und Gehring 2007). Die Gliederfüßler (Arthropoden) besitzen ein Außenskelett aus Chitin und Fortsätze in Form von gegliederten Röhren. Crustaceen zeichnen sich durch ihren harten Panzer, den fünf Paar Gliedmaßen und den unterklappbaren Hinterleib aus (Storch und Welsch 2005). Der Körper eines Krebses besteht aus zwei spiegelbildlichen Hälften und weist somit eine Bilateralsymmetrie auf. Die Krebse bilden, wie die Arachniden und Insekten an Land, in Meer und Süßwasser die dominierende Arthropodengruppe (Wehner und Gehring 2007).



**Abb. 4.2:** Alternative Hypothesen der Arthropoden Verwandtschaft (aus Giribet et al. 2005)

In Insekten wie auch in höheren Krebsarten sind Phosphatasen überwiegend als zellulär vorkommende Enzyme bekannt. Das Auftreten extrazellulärer Phosphatasen bei Crustaceen ist bereits erwiesen (siehe oben). Aufgrund der evolutionären Verwandtschaft zwischen der Gruppe der Insekten und den Crustaceen sind extrazelluläre Enzyme ebenfalls bei einigen wenigen Insektenarten nachweisbar (Sridhara und Bhat 1963, Eguchi 1995).

Erstmals wurde die Phosphatase Aktivität in Insekten bei der Seidenraupe *Bombyx mori* durch Nakamura (1940) untersucht. Hohe Konzentrationen einer alkalischen Phosphatase wurden im Mitteldarm-Epithelium und im Verdauungssaft der Larven nachgewiesen (Eguchi 1995). Ihr pH Optimum liegt bei 9,6. Die Aktivität ließ sich durch Phosphat, Arsenit, L-Cystein und EDTA inhibieren. Nach elektrophoretischer Trennung sind zwei unterschiedliche Phosphatasen nachgewiesen worden. Eine langsam wandernde Bande wurde als membrangebundene Phosphatase (m-ALP) und eine schneller wandernde als lösliche Phosphatase (l-ALP) identifiziert. Die (m-ALP) wird vermutlich in den Mitteldarmzellen synthetisiert und anschließend ins Lumen transferiert. Hier erfährt das Enzym eine Umwandlung in ein Isoenzym, welches als *digestive fluid* Phosphatase (d-ALP) bezeichnet wird (Eguchi 1995). Isoenzyme katalysieren zwar die gleichen Reaktionen, können aber Unterschiede in der Proteinstruktur und/ oder den kinetischen Eigenschaften aufweisen (Müller-Esterl 2004). Die l-ALP dagegen ist gegen diese Umwandlung weitestgehend resistent. Dafür wird die m-ALP schneller durch starke Proteasen hydrolysiert, während die d-

ALP, umgewandelt aus der m-ALP, gegen diesen Vorgang resistent ist (Eguchi 1995). Dafür verliert die d-ALP einen Teil ihrer katalytischen Aktivität.

Das pH Optimum der gelösten alkalischen Phosphatase liegt bei 10,1. Das Molekulargewicht beträgt 58 kDa für die m-ALP und 61 kDa für die l-ALP. Metallionen haben auf die Enzymaktivität nur einen geringen Effekt (Eguchi 1995). Die alkalische Phosphatase von *B. mori* ist vermutlich beim Transport von Glucose und Fettsäuren durch die Membranen beteiligt (Sridhara und Bhat 1963). Ebenfalls sind die Isoformen der alkalische Phosphatase (d-ALP) bei der Aufnahme von Nährstoffen und deren Transport durch die Membranen beteiligt (Eguchi 1995).

Erstaunlicherweise zeigen sich bei den oben aufgelisteten Ergebnissen der Seidenraupe viele übereinstimmende Charakteristika zu den Ergebnissen der alkalischen Phosphatase beim Europäischen Hummer. Besonders interessant ist das Auftreten beider Phosphatasen in den Epithelienzellen des Mitteldarms. Im Gegensatz zu den Crustaceen besitzen Insekten keine Mitteldarmdrüse (Storch und Welsch 2005) Der Darmkanal von Insekten ist in Schlingen gelegt. Der Mitteldarm ist relativ kurz und sackartig zu einem Magen erweitert. Der Magen ist von innen mit einem Drüsenepithel ausgekleidet das frei von Schleimzellen ist. Der Enddarm ist durch die Einmündung zahlreicher Schläuche gekennzeichnet. Diese Schläuche werden auch Malpighische Gefäße genannt. An der Außenseite dieser Gefäße sind sogenannte Ecto-Phosphatasen bei der Raubwanze *Rhodnius prolixus* (Ferraro et al. 2004) und dem Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* (Yi und Adams 2001) nachgewiesen worden. Charakterisierende Untersuchungen zu der Phosphatase des Kartoffelkäfers liegen jedoch nicht vor.

Die alkalische Phosphatase von *Rhodnius prolixus* hat dagegen ein pH Optimum bei 6,4. Zinkionen zeigten eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität von rund 80 %. Weitere Inhibitoren der Phosphatase sind Ammoniummolibdat, Fluorid und Vanadate. Im Gegensatz zur extrazellulären Phosphatase anderer Organismen ist Cystein hier ein wichtiger Bestandteil um die enzymatische Aktivität zu erhöhen und Inhibierungen umzukehren (Ferraro et al. 2004).

### **Biotechnologisches Potential**

Phosphatasen sind wichtige Enzyme in der Molekularbiologie. So wird bereits die extrazelluläre Phosphatase der Eismeergarnele aus der Mitteldarmdrüse des Organismus gewonnen und unter dem Handelsnamen „Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)“ z.B. von den Firmen Fermentas, Sigma-Aldrich und Roche vertrieben. Im Gegensatz zur SAP wäre die Gewinnung und Aufreinigung der Hummer-Phosphatase sehr viel einfacher und daher kostengünstiger. Eine biotechnologische Nutzung der extrazellulären Phosphatase des Europäischen Hummers, *Homarus gammarus*, wäre durchaus denkbar. Die Isolierung der extrazellulären Phosphatase aus dem Hummer wäre in Kombination mit der Aquakultur der Tiere vorteilhaft. Der Europäische Hummer ist um die Insel Helgoland heimisch. Die Aufzucht der Tiere in größeren Aquarien bietet nicht nur wirtschaftliche, sondern auch ökologische Vorteile und ließe sich in der BAH auf Helgoland umsetzen. Derzeit existiert bereits eine Hummerzucht aus der viele der in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen. Die Hälterung der Tiere ermöglicht die einfache, mit geringem Aufwand verbundene und wiederholte Entnahme der Magenflüssigkeit direkt vor Ort. Durch die Entnahme der Magenflüssigkeit werden die Tiere nicht geschädigt. Für die weitere Isolierung, Konzentrierung und Reingewinnung der alkalischen Phosphatase stehen entsprechend ausgestattete Laboratorien zur Verfügung. Ein geeignetes Aufreinigungsprotokoll wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Wichtige erste Erkenntnisse liegen ebenfalls vor. Im Gegensatz zur SAP ist die Zugabe von Metallionen in den Puffer überflüssig. Dieser Umstand erspart die zeitaufwendige und komplizierte Herstellung geeigneter Reaktionsmedien. Außerdem denaturiert die Hummer-Phosphatase bereits bei 55°C innerhalb weniger Minuten. Die SAP dagegen erst bei 65°C nach 15 Minuten.

Bevor jedoch die Hummer-Phosphatase in der Molekularbiologie genutzt werden kann, müssen ihre katalytischen Eigenschaften erst vollständig analysiert und charakterisiert werden. Die vorliegende Arbeit präsentiert eine in sich abgeschlossene grundlegende Charakterisierung der Hummer-Phosphatase. Diese gewonnenen Daten bilden jedoch die Basis für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Struktur und der Funktionsweise der extrazellulären Phosphatase. Gewebeproben aus der Mitteldarmdrüse des Europäischen Hummers wurden entnommen und molekularbiologische Untersuchungen sind bereits geplant. Die hier ermittelte N-terminale Sequenz bildet die Grundlage für die Herstellung von spezifischen Primern. Die Isolierung der mRNA, die Transkription und die Sequenzierung der cDNA bilden die nächsten aufbauenden Schritte in der molekularen Identifizierung und Charakterisierung der Phosphatase.

## Schlussfolgerungen

Die ungewöhnlich hohe Phosphatase-Aktivität in der Magenflüssigkeit des Hummers ist auf einen besonderen Sekretionsmechanismus zurück zu führen. In der Mitteldarmdrüse des Hummers werden in speziellen Zellen, den sog. B-Zellen, verschiedene Verdauungsenzyme inklusive der Phosphatase synthetisiert und auf holokrine Weise in die Magenflüssigkeit abgegeben. Die Phosphatase ist zwar in einem weiten pH-Bereich aktiv, aber ihr Optimum liegt im Alkalischen und somit jenseits des sauren pH-Bereichs des Magens. Eine physiologische Funktion der Phosphatase im Magen der Hummer scheint unklar. Jedoch kann die Phosphatase eine wesentliche Bedeutung bei der späteren Resorption der Nährstoffe haben. Sowohl die funktionellen Charakteristika als auch die partiellen Aminosäuresequenzen der Hummer-Phosphatase weisen Ähnlichkeiten mit den zellulären Phosphatasen von Mikroorganismen und Insekten auf. Der N-Terminus ist jedoch homolog zur zellulären alkalischen Phosphatase der Eismeergarnele *Pandalus borealis*. Entsprechend scheint es sich bei der Hummer-Phosphatase um ein neues ungewöhnliches Enzym zu handeln, das eine Vielzahl von Eigenschaften unterschiedlichster Phosphatasen in sich vereint. Aufgrund der einfachen und nachhaltigen Gewinnung der Hummer-Phosphatase wäre eine biotechnologische Nutzung des Enzyms von Interesse.

## 5. AUSBLICK

Die Zahl aller derzeit beschriebenen Organismenarten (Tiere, Pflanzen, Mikroorganismen) hat 2006 die 2 Millionen Grenze erreicht (Wehner und Gehring 2007). Aktuelle Schätzungen der wahren Biodiversität gehen allerdings weit über diese Anzahl hinaus. Crustaceen bilden die artenreichste Gruppe der Arthropoden. Im marinen Bereich sind sie häufig und weltweit verbreitet. Diese zum Teil extremophilen Krebse weisen eine Vielzahl von spezifischen Enzymen in ihren Verdauungsorganen auf. Deshalb ist es wichtig, weitere Arten aus verschiedenen Habitaten auf besondere Enzyme hin zu untersuchen. Die extrazelluläre Phosphatase des Europäischen Hummers ist ein gutes Beispiel für eine solche grundlagenorientierte Arbeit mit anwendungsbezogenem Hintergrund.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nur die wesentlichen Aspekte untersucht und beantwortet werden. Entsprechend sind noch viele Fragen offen für interessante zukünftige Forschungsansätze. So ist zu Beginn dieser Arbeit in der Magenflüssigkeit des Europäischen Hummers eine weitere Phosphatase nachgewiesen worden. Die Aufreinigung und Charakterisierung dieser Phosphodiesterase war nach dem etablierten Aufreinigungsschema für die Phosphomonoesterase nicht möglich. Dies sollte jedoch im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit nachgeholt werden, denn dieses Enzym scheint aufgrund seines pH-Profiles im Verdauungstrakt der Hummer eine wichtige physiologische Rolle zu spielen

Des Weiteren zeigte das Aktivitätsgel mit einem Acetatpuffer bei pH 5 zusätzliche, sehr reaktive Phosphatase-Banden. Diese identifizierten Banden gehören offensichtlich zu einer sauren Phosphatase und nicht zur alkalischen Phosphatase. Die Banden waren räumlich klar voneinander getrennt. Vorläufige Untersuchungen zeigten, dass es sich um ein Enzym handelt das Methylumbelliferyl-Phosphat nicht aber p-NPP oder bis-p-NPP hydrolysiert. Die chromatographische und elektrophoretische Aufreinigung, sowie die Charakterisierung dieser weiteren, offensichtlich sauren Phosphatase würden erheblich zum Verständnis der Verdauungsphysiologie des Hummers beitragen.

Im Hinblick auf die biotechnologische Nutzung der extrazellulären Hummer-Phosphatase müsste eine vergleichende Untersuchung der kommerziellen *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) und der Hummer-Phosphatase durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollen darlegen, ob die Eigenschaften der Hummer-Phosphatase günstig für molekularbiologische Anwendungen sind und die Hummer-Phosphatase somit ein geeigneter Ersatz für die SAP wäre.



## Literaturverzeichnis

- Ali SY, Evans L (1973) The uptake of [ $^{45}\text{Ca}$ ] Calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem J* 134: 647-650.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10.
- Anger K, Lovrich GA, Thatje S, Calcagno JA (2004) Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *J Exp Mar Biol Ecol* 306: 217-230.
- Barker PL, Gibson R (1977) Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 26: 297-324.
- Blasco J, Puppo J, Sarasquete MC (1993) Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar Biol* 115: 113-118.
- Boucaud-Camou E, Roper CFE (1995) Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bull Mar Sci* 57: 313-327.
- Cháverri F, Santisteban A, Virto M, de Renobales M (1998) Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase and lipoprotein lipase activities in industrial Ewe's milk and cheese. *J Agric Food Chem* 46: 2926-2932.
- Crawford K, Weissig H, Binette F, Milian JL, Goetnick PF (1995) Tissue-non-specific alkaline phosphatase participates in the establishment and growth of feather germs in embryonic chick skin cultures. *Dev Dyn* 204: 48-56.
- Dall W, Moriarty DJW (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. In: Mantel LH, editor. *The biology of Crustaceans, Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation*. New York: Academic Press. p 215-261.
- De Backer M, McSweeney S, Rasmussen HB, Riise BW, Lindley P, Hough E (2002) The 1,9A° crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *J Mol. Biol* 318: 1265-1274.
- De Panafieu JB, Gries P (2007) *Evolution*. Frederking & Thaler, München.
- De Prada P, Brenchley JE (1997) Purification and characterization of two extracellular alkaline phosphatases from a psychophilic *Arthrobacter* isolate. *Appl Environ Microbiol* 63: 2928-2931.
- Eguchi M (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp Biochem Physiol* 111B: 151-162.
- Fernandez MP, Gascon S, Schwenke J (1981) Some enzymatic properties of vacuolar alkaline phosphatase from yeast. *Curr Microbiol* 6: 121-126.
- Ferraro RB, Sousa JL, Cunha RDC, Meyer-Fernandes JR (2004) Characterization of an ecto-phosphatase activity in malpighian tubules of hematophagous bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Physiol* 57: 40-49.
- Franke HD, Gutov L (2004) Long-term changes in the macrozoobenthos around the rocky island of Helgoland (German Bight, North Sea). *Helgol Mar Res* 58: 303-310.

- Gerhartz W (1990) Enzymes in industry - production and Application. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Giribet G, Richter S, Edgecombe GD, Wheeler WC (2005) The position of crustaceans within arthropoda-evidence from nine molecular loci and morphology. In: Könemann S, editor, Jenner RA, editor. Crustacea and Arthropod Relationships. Boca Raton: Taylor and Francis Group. P307-352
- Glew RH, Heath EC (1970) Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. J Biol Chem 246: 1556-1565.
- Glew RH, Heath EC (1970) Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis* II. Factors affecting secretion. J Biol Chem 246: 1556-1565.
- Goyffon M, Martoja R (1983) Cytophysiological aspects of digestion and storage in the liver of a scorpion, *Androctonus australis* (Arachnida). Cell Tissue Res 228: 661-675.
- Hentschel EJ, Wagner GH (1996) Zoologisches Wörterbuch. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Hochachka PW, Somero GN (1980) Strategien biochemischer Anpassung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Jakubke, HD, Jeschkeit H (1980) Lexikon Biochemie. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Jungermann K, Möller H (1980) Biochemie. Springer Verlag, Heidelberg.
- Karlson P (1984) Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol 13:345-351.
- Kuczarski ER (1986) Myosin specific phosphatases isolated from *Dictyostelium discoideum*. J Musc Res Cell Motility 7: 510-516.
- Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzalez CF, Brown G, Omelchenko MV, Borozan I, Carmel L, Wolf YI, Mori H, Savchenko AV, Arrowsmith CH, Koonin EV, Edwards AM, Yakunin AF(2006) Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. J Biol Chem 47: 36149–36161.
- Loizzi RF (1971) Interpretation of crayfish hepatopancreatic funktion based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. Z Zellforsch 113: 420-440.
- Mehrtens F, Stolpmann M, Buchholz F, Hagen W, Saborowski R (2005) Locomotory activity and exploration behaviour of juvenile European lobsters (*Homarus gammarus*) in the laboratory. Mar Freshw Behav Physiol 38: 105-116.
- Menzorova NI, Ivleva AD, Sibirtsev YT, Rasskazov VA (2006) Phosphatases and phosphodiesterases isolated from the red King crab (*Paralithodes camtschatica*) hepatopancreas. Appl Biochem Microbiol 44: 93-97.
- Meyran JC, Graf F (1986) Ultrahistochemical localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and alkaline phosphatase activity in a calcium-transporting epithelium of a crustacean during moulting. Histochemistry 85:313-320.
- Müller-Esterl W (2004) Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Murphy MB, Egelhoff TT (1999) Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy chain phosphatase that promotes filament assembly. Eur J Biochem 264: 582-590.

- Navarrete del Toro MA, García-Carreño F, López MD, Celis-Guerrero L, Saborowski R (2006) Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *J Exp Zool* 305A: 645-654.
- Nilsen IW, Øverbø K, Olsen RL (2001) Thermolabile alkaline phosphatase from Northern shrimp (*Pandalus borealis*): protein and cDNA sequence analysis. *Comp Biochem Physiol* 129B: 853-861.
- Olsen RL, Øverbø K, Myrnes B (1991) Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus Borealis*): a dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comp Biochem Physiol* 99B: 755-761.
- Palmgren MG (1990) An H – ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol* 94: 882-886.
- Paul R (2001) *Physiologie der Tiere, Systeme und Stoffwechsel*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Pingoud A, Urbanke C (1997) *Arbeitsmethoden in der Biochemie*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin.
- Rehm H (2006) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Römpp H (1998) *Chemielexikon*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ruttloff H (1994) *Industrielle Enzyme*. Behr's Verlag, Hamburg.
- Saborowski R, Sahling G, Navarrete del Torro MA, Walter I, Garcia-Carreño FL (2004) Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *J Mol Catal B Enzym* 30: 109-118.
- Saborowski R, Thatje S, Calcagno JA, Lovrich GA, Anger K (2006) Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santolla*. *Mar Biol* 149: 865–873.
- Sharipova MP, Balaban NP, Leshchinskaya IB (1999) Localization of alkaline phosphatase in *Bacillus intermedius*. *Cells Microbiol* 69: 157-161.
- Sridhara S, Bhat JV (1963) Alkaline and acid phosphatases of the silkworm *Bombyx Mori* L. *J Ins Physiol* 9: 693-701.
- Stephanopoulos G (2007) Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science* 315: 801-803.
- Storch V, Welsch U (2005) *Kükenthal. Zoologisches Praktikum*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Štrojsová A, Vrba J, Nedoma J, Šimek K (2005) Extrazellulär phosphatase activity of freshwater phytoplankton exposed to different in situ phosphorus concentrations. *Mar Freshw Res* 56: 417-424.
- Stryer L (1996) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Terao M, Mintz B (1987) Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental alkaline Phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7051-7055.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–80.

- Travis DF (1957) The moulting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. II. Pre ecdysal histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol Bull* 108: 88-112.
- Ulrich I, Müller J, Schütt C, Buchholz F (2001) A study of population genetics in the European Lobster *Homarus gammarus* (Decapoda, Nephropidae). *Crustaceana* 74: 825-837.
- Verri T, Mandal A, Zilli L, Bossa D, Mandal PK, Ingrosso L, Zonno V, Vilella S, Ahearn GA, Storelli C (2001) D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol A* 130: 585-606.
- Vogt G (1996) Morphology and physiology of digestive epithelia in decapod crustaceans. *Eur J Physiol* 431: 239-240.
- Weathly MG (1999) Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of brachial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *J Exp Zool* 283: 620-640.
- Wehner R, Gehring W (2007) *Zoologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H (1986) Isolation and characterization of cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline Phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7182-7186.
- Westheide W, Rieger R (2007) *Systematik Poster: Zoologie Metazoa – Vielzellige Tiere*. Elsevier Verlag, München.
- Wilde JE, Stuart ML, Greenaway P (2004) Dietary assimilation and the digestive strategy of the omnivorous anomuran land crab *Birgus latro* (Coenobitidae). *J Comp Physiol B* 174: 299–308.
- Wöltgens JHM (1977) Influence of various inhibitors on alkaline phosphatase in calcifying hamster molars employing paranitrophenyl phosphate as substrate. *J Dent Res* 56: 1255-1259.
- Yi SX, Adams TS (2001) Age- and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the intestine and malpighian tubules of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem Physiol* 46: 152-163.
- Zhu CM, Chen QX, Lin HN, Yang Y, Park YD, Zhang RQ, Zhou HM(1999) Kinetics of inhibition of Green Crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by L-Cysteine. *J Prot Chem* 18: 603-607.
- Zhu X, Liu Q, Jiang C (2006) 2-Carboxy-1-naphtyl phosphate as a substrate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase. *Anal Chim Acta* 570: 29-33.

## ANHANG

### MESSDATEN ROHEXTRAKT

Tab. 1 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität (%); Messung mit dem Universalpuffer; Substrat: p-NPP für die Phosphomonoesterase

| pH | HG.1 | HG.2 | HG.3 | HG.4 | HG.5 | HG.6 | HG.7 | HG.8 | HG.9 | HG.10 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 3  | 24   | 1    | 28   | 2    | 23   | 47   | 0    | 6    | 6    | 19    |
| 4  | 59   | 5    | 94   | 6    | 23   | 46   | 0    | 9    | 8    | 42    |
| 5  | 42   | 7    | 63   | 7    | 18   | 27   | 6    | 8    | 8    | 25    |
| 6  | 45   | 42   | 41   | 33   | 28   | 49   | 46   | 29   | 30   | 21    |
| 7  | 60   | 54   | 53   | 44   | 51   | 99   | 53   | 51   | 50   | 53    |
| 8  | 41   | 40   | 59   | 36   | 36   | 74   | 42   | 40   | 37   | 36    |
| 9  | 41   | 39   | 69   | 36   | 35   | 49   | 39   | 35   | 36   | 37    |
| 10 | 100  | 100  | 100  | 100  | 89   | 100  | 100  | 100  | 100  | 100   |
| 11 | 69   | 63   | 61   | 89   | 100  | 84   | 95   | 51   | 56   | 88    |
| 12 | 2    | 0    | 4    | 3    | 7    | 20   | 6    | 5    | 0    | 1     |

Tab. 2 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität gebildete Mittelwerte aus Tab. 1

| pH | Mittelwert<br>Aktivität [%] | Standardabweichung |
|----|-----------------------------|--------------------|
| 3  | 16                          | 15,22              |
| 4  | 29                          | 30,59              |
| 5  | 21                          | 18,96              |
| 6  | 36                          | 9,51               |
| 7  | 57                          | 15,27              |
| 8  | 44                          | 12,48              |
| 9  | 42                          | 10,34              |
| 10 | 99                          | 3,43               |
| 11 | 76                          | 17,53              |
| 12 | 5                           | 5,87               |

Tab. 3 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität, Messung mit unterschiedlichen Puffern und unterschiedlichen pH-Werten, Substrat: p-NPP für die Phosphomonoesterase

| Puffer           | pH | Mittelwert<br>$\Delta E_{405}/\text{mL} \cdot \text{min}$ | Standardabweichung |
|------------------|----|---|--------------------|
| <b>Citrat</b>    | 3  | 0,567   | 0,404              |
|                  | 4  | 0,525   | 0,255              |
| <b>Glycin</b>    | 3  | 0,872   | 0,652              |
|                  | 8  | 37,91   | 13                 |
|                  | 9  | 95,59   | 41                 |
|                  | 10 | 112,35  | 73                 |
|                  | 11 | 16,29   | 9                  |
| <b>Universal</b> | 3  | 0,220   | 0,092              |
|                  | 4  | 0,331   | 0,051              |
|                  | 5  | 0,393   | 0,064              |
|                  | 8  | 2,066   | 1,03               |
|                  | 9  | 1,901   | 0,81               |
|                  | 10 | 4,659   | 2,12               |
|                  | 11 | 4,290   | 2,34               |
| <b>Acetat</b>    | 3  | 1,203   | 0,729              |
|                  | 4  | 2,113   | 0,411              |
|                  | 5  | 4,938   | 0,668              |
| <b>Tris</b>      | 8  | 49,76   | 19                 |
|                  | 9  | 96,83   | 54                 |
|                  | 10 | 69,54   | 42                 |
|                  | 11 | 8,74  | 7                  |

Tab. 4 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität (%); Messung mit dem Universalpuffer; Substrat: bis-p-NPP für die Phosphodiesterase

| pH        | HG. 1 | HG. 2 | HG. 3 | HG. 4 | HG. 5 | HG. 6 | HG. 7 | HG. 8 | HG. 9 | HG. 10 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| <b>3</b>  | 4     | 11    | 4     | 15    | 3     | 0     | 1     | 2     | 0     | 0      |
| <b>4</b>  | 41    | 47    | 55    | 25    | 30    | 29    | 36    | 14    | 30    | 19     |
| <b>5</b>  | 81    | 95    | 100   | 84    | 70    | 80    | 80    | 49    | 72    | 30     |
| <b>6</b>  | 100   | 100   | 99    | 99    | 94    | 100   | 100   | 85    | 94    | 89     |
| <b>7</b>  | 63    | 79    | 67    | 100   | 100   | 100   | 95    | 100   | 100   | 100    |
| <b>8</b>  | 54    | 68    | 68    | 70    | 54    | 72    | 71    | 65    | 53    | 58     |
| <b>9</b>  | 23    | 31    | 40    | 38    | 23    | 19    | 20    | 15    | 10    | 13     |
| <b>10</b> | 14    | 15    | 19    | 23    | 2     | 0     | 3     | 4     | 0     | 0      |
| <b>11</b> | 13    | 13    | 16    | 21    | 1     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0      |
| <b>12</b> | 12    | 20    | 21    | 15    | 0     | 0     | 1     | 1     | 0     | 0      |

Tab. 5 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität; gebildete Mittelwerte aus Tab. 4

| pH | Mittelwert Aktivität [%] | Standardabweichung |
|----|--------------------------|--------------------|
| 3  | 3                        | 4,76               |
| 4  | 32                       | 11,28              |
| 5  | 73                       | 18,23              |
| 6  | 97                       | 5,06               |
| 7  | 90                       | 13,32              |
| 8  | 62                       | 7,46               |
| 9  | 22                       | 9,17               |
| 10 | 6                        | 8,29               |
| 11 | 5                        | 7,72               |
| 12 | 5                        | 8,23               |

Tab. 6 pH-Abhängigkeit auf die Enzymaktivität; Messung mit unterschiedlichen Puffern und unterschiedlichen pH-Werten; Substrat: bis-p-NPP für die Phosphodiesterase

| Puffer    | pH | Mittelwert $\Delta E_{405}/\text{mL} \cdot \text{min}$ | Standardabweichung |
|-----------|----|--|--------------------|
| Citrat    | 3  | 0,713  | 0,060              |
|           | 4  | 2,118  | 0,488              |
| Glycin    | 3  | 1,484  | 0,204              |
|           | 8  | 2,9444   | 0,589              |
|           | 9  | 3,8200   | 1,245              |
|           | 10 | 1,7378   | 0,084              |
|           | 11 | 1,5044   | 0,141              |
| Universal | 3  | 0,055  | 0,039              |
|           | 4  | 0,432  | 0,302              |
|           | 5  | 1,034  | 0,574              |
|           | 8  | 0,8768   | 0,542              |
|           | 9  | 0,3176   | 0,088              |
|           | 10 | 0,0850   | 0,062              |
| Acetat    | 11 | 0,049  | 0,048              |
|           | 3  | 1,7711   | 0,095              |
|           | 4  | 3,1467   | 0,814              |
| Tris      | 5  | 7,6000   | 2,478              |
|           | 8  | 5,3978   | 1,568              |
|           | 9  | 2,6000   | 0,266              |
|           | 10 | 2,9667   | 1,253              |
|           | 11 | 1,4978   | 0,269              |

Tab. 7 pH-Wert Einfluss auf die Enzymstabilität (%); Universalpuffer, Substrat p-NPP für Phosphomonoesterase

| pH | HG.1 | HG.2 | HG.3 | HG.4 | Mittelwert Aktivität [%] | Standardabweichung |
|----|------|------|------|------|--------------------------|--------------------|
| 3  | 48   | 9    | 30   | 6    | 23                       | 19,4               |
| 4  | 89   | 65   | 83   | 73   | 78                       | 10,7               |
| 5  | 100  | 83   | 93   | 86   | 91                       | 7,5                |
| 6  | 90   | 88   | 91   | 93   | 90                       | 1,8                |
| 7  | 92   | 100  | 98   | 98   | 97                       | 3,7                |
| 8  | 93   | 100  | 96   | 90   | 94                       | 4,3                |
| 9  | 96   | 96   | 100  | 100  | 98                       | 2,4                |
| 10 | 85   | 90   | 93   | 92   | 90                       | 3,4                |
| 11 | 84   | 85   | 84   | 88   | 85                       | 1,9                |
| 12 | -    | 68   | 75   | 13   | 52                       | 34,1               |

Tab. 8 pH-Wert Einfluss auf die Enzymstabilität (%); Universalpuffer, Substrat bis-p-NPP für Phosphodiesterase

| pH | HG.1 | HG.2 | HG.3 | H.G.4 | Mittelwert Aktivität [%] | Standardabweichung |
|----|------|------|------|-------|--------------------------|--------------------|
| 3  | 34   | 12   | 64   | 6     | 29                       | 26,3               |
| 4  | 88   | 69   | 97   | 73    | 82                       | 13,2               |
| 5  | 100  | 97   | 99   | 86    | 96                       | 6,3                |
| 6  | 83   | 100  | 99   | 93    | 94                       | 7,8                |
| 7  | 89   | 87   | 98   | 98    | 93                       | 5,8                |
| 8  | 99   | 98   | 100  | 90    | 97                       | 4,9                |
| 9  | 97   | 90   | 100  | 100   | 97                       | 4,6                |
| 10 | 92   | 90   | 90   | 92    | 91                       | 0,9                |
| 11 | 89   | 76   | 90   | 88    | 86                       | 6,8                |
| 12 | 57   | 14   | 63   | 13    | 37                       | 27,1               |

Tab. 9 Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität; Zinkchlorid

| Konzentration ZnCl (mM) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Mittelwert Aktivität (%) | Standardabweichung |
|-------------------------|------------------|----------------------|---|--------------------------|--------------------|
| <b>0</b>                | 0,7313           | 0,1000               | 126,26  | 100                      | 0,00               |
|                         | 1,1356           | 0,0966               | 259,75  |                          |                    |
|                         | 0,1335           | 0,0881               | 30,27   |                          |                    |
|                         | 0,2636           | 0,0858               | 118,53  |                          |                    |
| <b>2</b>                | 0,6990           | 0,0860               | 122,60  | 48                       | 53,32              |
|                         | 1,0422           | 0,0962               | 236,50  |                          |                    |
|                         | 0,0774           | 0,0772               | 0,13  |                          |                    |
|                         | 0,0875           | 0,0817               | 3,87  |                          |                    |
| <b>4</b>                | 0,4224           | 0,0836               | 67,76   | 24                       | 26,12              |
|                         | 0,4987           | 0,0960               | 100,68  |                          |                    |
|                         | 0,0830           | 0,0810               | 1,33  |                          |                    |
|                         | 0,0794           | 0,0790               | 0,27  |                          |                    |
| <b>6</b>                | 0,2190           | 0,0930               | 25,20   | 10                       | 9,12               |
|                         | 0,2653           | 0,1004               | 41,23   |                          |                    |
|                         | 0,0893           | 0,0866               | 1,80  |                          |                    |
|                         | 0,0765           | 0,0814               | -3,27   |                          |                    |
| <b>8</b>                | 0,1889           | 0,0940               | 18,98   | 7                        | 7,79               |
|                         | 0,2154           | 0,0961               | 29,83   |                          |                    |
|                         | 0,0809           | 0,0867               | -3,87   |                          |                    |
|                         | 0,0918           | 0,0918               | 0,00  |                          |                    |
| <b>10</b>               | 0,1721           | 0,0887               | 16,68   | 6                        | 6,74               |
|                         | 0,1955           | 0,0962               | 24,83   |                          |                    |
|                         | 0,0882           | 0,0940               | -3,87   |                          |                    |
|                         | 0,0898           | 0,0964               | -4,40   |                          |                    |

Tab. 10 Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität; Magnesiumchlorid

| Konzentration MgCl <sub>2</sub> (mM) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Mittelwert Aktivität (%) | Standardabweichung |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|---|--------------------------|--------------------|
| <b>0,001</b>                         | 0,1481           | 0,0859               | 31,1  | 76                       | 3,387              |
|                                      | 0,3426           | 0,0833               | 129,65  |                          |                    |
|                                      | 0,3579           | 0,0904               | 133,75  |                          |                    |
| <b>1</b>                             | 0,151            | 0,0837               | 33,65   | 78                       | 4,663              |
|                                      | 0,3146           | 0,0825               | 116,05  |                          |                    |
|                                      | 0,3762           | 0,0903               | 142,95  |                          |                    |
| <b>10</b>                            | 0,1517           | 0,0831               | 34,3  | 80                       | 1,013              |
|                                      | 0,3346           | 0,0828               | 125,9   |                          |                    |
|                                      | 0,3653           | 0,0902               | 137,55  |                          |                    |
| <b>100</b>                           | 0,1516           | 0,0846               | 33,5  | 82                       | 4,297              |
|                                      | 0,3217           | 0,0835               | 119,1   |                          |                    |
|                                      | 0,3814           | 0,0911               | 145,15  |                          |                    |
| <b>1000</b>                          | 0,1588           | 0,0892               | 34,8  | 89                       | 6,040              |
|                                      | 0,3545           | 0,0873               | 133,6   |                          |                    |
|                                      | 0,4214           | 0,0951               | 163,15  |                          |                    |
| <b>10000</b>                         | 0,2184           | 0,123                | 47,7  | 100                      | 0,000              |
|                                      | 0,4831           | 0,1228               | 180,15  |                          |                    |
|                                      | 0,5163           | 0,1277               | 194,3   |                          |                    |

Tab. 11 Substratkinetik der Phosphomonoesterase

| Substrat-<br>konzentration ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | $\Delta E_{405}/\text{min} \cdot \text{mL}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|--|---------------------|-------------------------|---|---------------|--------------------|
| <b>0</b>                                     | 0,0690              | 0,0684                  | 0,12  | 0             | 0,07               |
|  | 0,087               | 0,0828                  | 0,84  |               |                    |
|  | 0,0672              | 0,0686                  | 0   |               |                    |
| <b>10</b>                                    | 0,0908              | 0,0702                  | 4,12  | 1             | 0,75               |
|  | 0,1025              | 0,0838                  | 3,74  |               |                    |
|  | 0,0932              | 0,0679                  | 5,06  |               |                    |
| <b>50</b>                                    | 0,1635              | 0,0701                  | 18,68                                       | 5             | 2,05               |
|  | 0,1636              | 0,0802                  | 16,68                                       |               |                    |
|  | 0,1636              | 0,0802                  | 16,68                                       |               |                    |
| <b>100</b>                                   | 0,2431              | 0,0710                  | 34,42                                       | 11            | 6,52               |
|  | 0,2258              | 0,0801                  | 29,14                                       |               |                    |
|  | 0,2827              | 0,0684                  | 42,86                                       |               |                    |
| <b>1000</b>                                  | 0,8275              | 0,0845                  | 148,60                                      | 39            | 16,41              |
|  | 0,7624              | 0,0932                  | 133,84                                      |               |                    |
|  | 0,7527              | 0,0852                  | 133,50                                      |               |                    |
| <b>5000</b>                                  | 0,4644              | 0,1636                  | 300,80                                      | 65            | 27,93              |
|  | 0,3507              | 0,2504                  | 200,60                                      |               |                    |
|  | 0,6868              | 0,1805                  | 202,52                                      |               |                    |
| <b>10000</b>                                 | 0,6225              | 0,2442                  | 378,30                                      | 100           | 0,00               |
|  | 0,4717              | 0,1691                  | 605,20                                      |               |                    |
|  | 0,8502              | 0,2425                  | 243,08                                      |               |                    |

Tab. 12 Thermostabilität der Phosphomonoesterase

| Temperatur | Inkubationszeit (min) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}/5\text{min}$ *10 $\mu\text{L}$ | $\Delta E_{405}/\text{min}$ *mL | Aktivität (%) | Werte angepasst |
|------------|-----------------------|------------------|----------------------|--|---------------------------------|---------------|-----------------|
| 0°C        | 0                     | 0,2479           | 0,0976               | 7,5150   | 150,300                         | 100           | 100             |
|            | 20                    | 0,2467           | 0,0988               | 7,3950   | 147,900                         | 98            | 97              |
|            | 60                    | 0,2402           | 0,0972               | 7,1500   | 143,000                         | 95            | 97              |
| 30°C       | 0                     | 0,2479           | 0,0976               | 7,5150   | 150,300                         | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2273           | 0,0963               | 6,5500   | 131,000                         | 87            | 91              |
|            | 10                    | 0,2229           | 0,0959               | 6,3500   | 127,000                         | 84            | 88              |
|            | 20                    | 0,2294           | 0,0971               | 6,6150   | 132,300                         | 88            | 87              |
|            | 40                    | 0,2375           | 0,1012               | 6,8150   | 136,300                         | 91            | 87              |
|            | 60                    | 0,2270           | 0,0964               | 6,5300   | 130,600                         | 87            | 87              |
| 40°C       | 0                     | 0,2479           | 0,0976               | 7,5150   | 150,300                         | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2317           | 0,0990               | 6,6350   | 132,700                         | 88            | 89              |
|            | 10                    | 0,2286           | 0,0988               | 6,4900   | 129,800                         | 86            | 86              |
|            | 20                    | 0,2348           | 0,1021               | 6,6350   | 132,700                         | 88            | 85              |
|            | 40                    | 0,2262           | 0,0995               | 6,3350   | 126,700                         | 84            | 85              |
|            | 60                    | 0,2294           | 0,1007               | 6,4350   | 128,700                         | 86            | 85              |
| 50°C       | 0                     | 0,2479           | 0,0976               | 7,5150   | 150,300                         | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2259           | 0,0997               | 6,3100   | 126,200                         | 84            | 84              |
|            | 10                    | 0,2094           | 0,1014               | 5,4000   | 108,000                         | 72            | 72              |
|            | 20                    | 0,2068           | 0,0934               | 5,6700   | 113,400                         | 75            | 60              |
|            | 40                    | 0,1829           | 0,0952               | 4,3850   | 87,700                          | 58            | 50              |
|            | 60                    | 0,1681           | 0,0991               | 3,4500   | 69,000                          | 46            | 46              |
| 55°C       | 0                     | 0,2479           | 0,0976               | 7,5150   | 150,300                         | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2136           | 0,0980               | 5,7800   | 115,600                         | 77            | 77              |
|            | 10                    | 0,1883           | 0,0979               | 4,5200   | 90,400                          | 60            | 56              |
|            | 20                    | 0,1413           | 0,0981               | 2,1600   | 43,200                          | 29            | 28              |
|            | 40                    | 0,1296           | 0,0976               | 1,6000   | 32,000                          | 21            | 21              |
|            | 60                    | 0,1186           | 0,0969               | 1,0850   | 21,700                          | 19            | 19              |
| 60°C       | 0                     | 0,2769           | 0,0879               | 9,4500   | 189,000                         | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,1623           | 0,0878               | 3,7250   | 74,500                          | 39            | 39              |
|            | 10                    | 0,1171           | 0,0854               | 1,5850   | 31,700                          | 17            | 17              |
|            | 20                    | 0,0978           | 0,0853               | 0,6250   | 12,500                          | 7             | 7               |
|            | 40                    | 0,0873           | 0,0858               | 0,0750   | 1,500                           | 1             | 1               |
|            | 60                    | 0                | 0                    | 0  | 0                               | 0             | 0               |

Tab. 13 Einfluss von Inhibitoren auf die Phosphataseaktivität; Natriumdihydrogen Monophosphat mit Tris/HCl Puffer pH 9

| Konzentration<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (µM) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | ΔE <sub>405</sub> /mL*min | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|--|---------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|--------------------|
| <b>0,1</b>   | 1,1878              | 0,0934                  | 109,44                    | 100           | 0,00               |
|  | 0,7951              | 0,1179                  | 135,44                    |               |                    |
|  | 0,7102              | 0,1066                  | 120,72                    |               |                    |
| <b>1</b>   | 1,2908              | 0,097                   | 119,38                    | 102           | 7,28               |
|  | 0,8035              | 0,105                   | 139,70                    |               |                    |
|  | 0,6674              | 0,0964                  | 114,20                    |               |                    |
| <b>10</b>  | 1,1476              | 0,0964                  | 105,12                    | 96            | 2,87               |
|  | 0,7752              | 0,1041                  | 134,22                    |               |                    |
|  | 0,6605              | 0,097                   | 112,70                    |               |                    |
| <b>100</b>   | 0,8563              | 0,0977                  | 75,86                     | 67            | 1,62               |
|  | 0,554               | 0,1051                  | 89,78                     |               |                    |
|  | 0,4974              | 0,0943                  | 80,62                     |               |                    |
| <b>1000</b>  | 0,2962              | 0,0955                  | 20,07                     | 18            | 1,34               |
|  | 0,2305              | 0,1026                  | 25,58                     |               |                    |
|  | 0,1942              | 0,0956                  | 19,72                     |               |                    |
| <b>10000</b>   | 0,1144              | 0,0943                  | 2,01                      | 2             | 0,05               |
|  | 0,1157              | 0,1026                  | 2,62                      |               |                    |
|  | 0,1098              | 0,0986                  | 2,24                      |               |                    |
| <b>100000</b>  | 0,1882              | 0,094                   | 9,42                      | 8             | 0,86               |
|  | 0,1593              | 0,1019                  | 11,48                     |               |                    |
|  | 0,1419              | 0,0993                  | 8,52                      |               |                    |

Tab. 14 Einfluss von Inhibitoren auf die Phosphataseaktivität; Natriumdihydrogen Monophosphat mit Essigsäure/Acetat Puffer pH 4

| Konzentration<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (µM) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | ΔE <sub>405</sub> /mL*min | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|--|---------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|--------------------|
| <b>0,1</b>   | 0,1619              | 0,0932                  | 4,58                      | 97            | 2,21               |
|  | 0,1458              | 0,0904                  | 3,69                      |               |                    |
|  | 0,1189              | 0,0905                  | 1,89                      |               |                    |
| <b>1</b>   | 0,1605              | 0,0936                  | 4,46                      | 99            | 1,51               |
|  | 0,1461              | 0,0883                  | 3,85                      |               |                    |
|  | 0,1196              | 0,0902                  | 1,96                      |               |                    |
| <b>10</b>  | 0,1598              | 0,0932                  | 4,44                      | 97            | 1,14               |
|  | 0,1433              | 0,087                   | 3,75                      |               |                    |
|  | 0,1195              | 0,0915                  | 1,87                      |               |                    |
| <b>100</b>   | 0,1544              | 0,0934                  | 4,07                      | 93            | 5,85               |
|  | 0,1442              | 0,0864                  | 3,85                      |               |                    |
|  | 0,1175              | 0,0906                  | 1,79                      |               |                    |
| <b>1000</b>  | 0,1365              | 0,0929                  | 2,91                      | 56            | 23,53              |
|  | 0,1197              | 0,0859                  | 1,12                      |               |                    |
|  | 0,1123              | 0,0905                  | 1,45                      |               |                    |
| <b>10000</b>   | 0,1185              | 0,091                   | 1,83                      | 44            | 20,93              |
|  | 0,1029              | 0,0872                  | 0,96                      |               |                    |
|  | 0,1086              | 0,0891                  | 1,30                      |               |                    |
| <b>100000</b>  | 0,1107              | 0,0907                  | 1,33                      | 23            | 11,38              |
|  | 0,0939              | 0,0879                  | 0,40                      |               |                    |
|  | 0,1001              | 0,091                   | 0,61                      |               |                    |

Tab. 15 Gelfiltration; Angepasste Daten des Schreibers

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) |
|----------------------|--------------------------|
| 0                    | 0                        |
| 5                    | 0                        |
| 10                   | 1                        |
| 15                   | 4                        |
| 20                   | 17                       |
| 25                   | 15                       |
| 30                   | 41                       |
| 35                   | 34                       |
| 40                   | 60                       |
| 45                   | 100                      |
| 50                   | 56                       |
| 55                   | 23                       |
| 60                   | 13                       |
| 65                   | 8                        |
| 70                   | 3                        |
| 75                   | 2                        |
| 80                   | 1                        |
| 85                   | 0                        |
| 90                   | 0                        |
| 95                   | 0                        |
| 100                  | 0                        |
| 105                  | 0,0                      |
| 110                  | 0,0                      |
| 115                  | 0,0                      |
| 120                  | 0,0                      |
| 125                  | 0,0                      |

Tab. 16 Proteaseaktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{366}/\text{min} \cdot \text{mL}$ | Protease Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|---|------------------------|
| 25                   | 0,2551           | 0,2656               | 0   | 0                      |
| 30                   | 0,2812           |                      | 0,05  | 3                      |
| 35                   | 0,2968           |                      | 0,10  | 7                      |
| 40                   | 0,284            |                      | 0,06  | 4                      |
| 45                   | 0,3493           |                      | 0,28  | 19                     |
| 50                   | 0,4367           |                      | 0,57  | 38                     |
| 55                   | 0,7129           |                      | 1,49  | 100                    |
| 60                   | 0,6623           |                      | 1,32  | 89                     |
| 65                   | 0,4363           |                      | 0,57  | 38                     |
| 70                   | 0,3278           |                      | 0,21  | 14                     |
| 75                   | 0,2685           |                      | 0,01  | 1                      |

Tab. 17 Phosphataseaktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}/\text{min} \cdot \text{mL}$ | Phosphatase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|---|---------------------------|
| 20                   | 0,0854           | 0,0870               | 0   | 0                         |
| 25                   | 0,1078           | 0,0876               | 0,0673                                      | 79                        |
| 30                   | 0,1117           | 0,0862               | 0,0850                                      | 100                       |
| 35                   | 0,0907           | 0,0858               | 0,0163                                      | 19                        |
| 40                   | -                | -                    | -   | 0                         |

Tab. 18 Phosphodiesterase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}/\text{min} \cdot \text{mL}$ | Phosphodiesterase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|---|---------------------------------|
| 15                   | 0                | 0                    | 0   | 0                               |
| 20                   | 0,1188           | 0,1173               | 0,0050                                      | 7                               |
| 25                   | 0,1241           | 0,1164               | 0,0257                                      | 37                              |
| 30                   | 0,138            | 0,1172               | 0,0693                                      | 100                             |
| 35                   | 0,1242           | 0,1176               | 0,0220                                      | 32                              |
| 40                   | 0                | 0                    | 0   | 0                               |

Tab. 19 Angepasste Daten des Schreibers von der Anionenaustauschchromatographie mit der Uno Q6 Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) | Leitfähigkeit (%) |
|----------------------|--------------------------|-------------------|
| 0                    | 0                        | 0                 |
| 5,0                  | 0                        | 0                 |
| 16,5                 | 1                        | 22                |
| 17,0                 | 3                        | 24                |
| 17,5                 | 4                        | 26                |
| 18,0                 | 5                        | 28                |
| 18,5                 | 7                        | 29                |
| 19,0                 | 22                       | 31                |
| 19,5                 | 40                       | 32,5              |
| 20,0                 | 66                       | 34                |
| 20,5                 | 58                       | 35,5              |
| 21,0                 | 62                       | 37,5              |
| 21,5                 | 100                      | 39                |
| 22,0                 | 81                       | 41                |
| 22,5                 | 68                       | 42                |
| 23,0                 | 42                       | 44                |
| 23,5                 | 29                       | 46                |
| 24,0                 | 15                       | 47                |
| 24,5                 | 10                       | 49                |
| 25,0                 | 5                        | 51                |
| 25,5                 | 23                       | 52,5              |
| 26,0                 | 18                       | 54                |
| 26,5                 | 6                        | 55,5              |

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) | Leitfähigkeit (%) |
|----------------------|--------------------------|-------------------|
| 27,0                 | 3                        | 56                |
| 27,5                 | 2                        | 57                |
| 28,0                 | 1                        | 59                |
| 28,5                 | 5                        | 61                |
| 29,0                 | 13                       | 62                |
| 29,5                 | 6                        | 64                |
| 30,0                 | 3                        | 65                |
| 30,5                 | 1                        | 67                |
| 31,0                 | 1                        | 68,5              |
| 40,0                 | 0                        | 100               |

Tab. 20 Phosphatase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit Uno Q6 Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | Phosphatase Aktivität [%] |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| 24,0                 |                  |                      | 0                | 0                         |
| 24,5                 | 0,119            |                      | 2,975            | 16                        |
| 25,0                 | 0,722            |                      | 18,05            | 100                       |
| 25,5                 | 0,317            | 0,04                 | 7,925            | 44                        |
| 26,0                 | 0,105            |                      | 2,625            | 15                        |
| 26,5                 | 0,063            |                      | 1,575            | 9                         |
| 27,0                 |                  |                      | 0                | 0                         |

Tab. 21 Phosphodiesterase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit Uno Q6 Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | Phosphodiesterase Aktivität [%] |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|---------------------------------|
| 21,5                 |                  |                      | 0                | 0                               |
| 22,0                 | 0,056            |                      | 1,400            | 50                              |
| 22,5                 | 0,084            |                      | 2,100            | 76                              |
| 23,0                 | 0,111            | 0,040                | 2,775            | 100                             |
| 23,5                 | 0,053            |                      | 1,325            | 48                              |
| 24,0                 | 0,053            |                      | 1,325            | 0                               |
| 23,5                 |                  |                      | 0                |                                 |

Tab. 22 Angepasste Daten des Schreibers von der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) | Leitfähigkeit (%) |
|----------------------|--------------------------|-------------------|
| 0                    | 0                        | 0                 |
| 5,0                  | 0                        | 0                 |
| 10,0                 | 0                        | 14,0              |
| 15,0                 | 3                        | 30,0              |
| 18,0                 | 21                       | 41,0              |
| 18,5                 | 21                       | 43,0              |
| 19,0                 | 21                       | 45,5              |
| 19,5                 | 32                       | 47,0              |
| 20,0                 | 100                      | 48,0              |
| 20,5                 | 89                       | 50,0              |
| 21,0                 | 47                       | 51,5              |
| 21,5                 | 37                       | 53,5              |
| 22,0                 | 21                       | 55,5              |
| 22,5                 | 16                       | 56,0              |
| 23,0                 | 8                        | 58,0              |
| 23,5                 | 5                        | 60,0              |
| 24,0                 | 0                        | 61,0              |
| 40,0                 | 0                        | 100               |

Tab. 23 Phosphatase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule

| Elutionsvolumen | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | Phosphatase Aktivität [%] |
|-----------------|------------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| 20,5            | 0                |                      |                  | 0                         |
| 21,0            | 0,075            |                      | 0,035            | 5                         |
| 21,5            | 0,740            |                      | 0,700            | 100                       |
| 22,0            | 0,722            | 0,04                 | 0,682            | 97                        |
| 22,5            | 0,164            |                      | 0,124            | 18                        |
| 23,0            | 0,063            |                      | 0,023            | 3                         |
| 23,5            |                  |                      |                  | 0                         |

## MESSDATEN AUFGEREINIGTES ENZYM

Tab. 24 Darstellung der angepassten Werte aus der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) |
|----------------------|--------------------------|
| 0                    | 0                        |
| 5,0                  | 0                        |
| 12,5                 | 0                        |
| 13,0                 | 0                        |
| 13,5                 | 2                        |
| 14,0                 | 2                        |
| 14,5                 | 6                        |
| 15,0                 | 6                        |
| 15,5                 | 8                        |
| 16,0                 | 6                        |
| 16,5                 | 8                        |
| 17,0                 | 10                       |
| 17,5                 | 10                       |
| 18,0                 | 8                        |
| 18,5                 | 10                       |
| 19,0                 | 13                       |
| 19,5                 | 46                       |
| 20,0                 | 100                      |
| 20,5                 | 48                       |
| 21,0                 | 19                       |
| 21,5                 | 12                       |
| 22,0                 | 6                        |
| 22,5                 | 4                        |
| 23,0                 | 2                        |
| 23,5                 | 1                        |
| 24,0                 | 0                        |
| 24,5                 | 0                        |
| 25,0                 | 0                        |
| 40,0                 | 0                        |

Tab. 25 Phosphatase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule für  $\alpha$ -Glucosidase Bestimmung

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | Phosphatase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| 20,0                 | 0,057            | 0,057                | 0                | 0                         |
| 20,5                 | 0,059            |                      | 0,002            | 0                         |
| 21,0                 | 0,095            |                      | 0,038            | 7                         |
| 21,5                 | 0,578            |                      | 0,521            | 90                        |
| 22,0                 | 0,635            |                      | 0,578            | 100                       |
| 22,5                 | 0,200            |                      | 0,143            | 25                        |
| 23,0                 | 0,087            |                      | 0,030            | 5                         |
| 23,5                 | 0,067            |                      | 0,010            | 2                         |

Tab. 26 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|--|
| 12,5                 | 0,042            | 0,042                | 0                | 0  |
| 13,0                 | 0,044            |                      | 0,002            | 0  |
| 13,5                 | 0,061            |                      | 0,019            | 1  |
| 14,0                 | 0,217            |                      | 0,175            | 8  |
| 14,5                 | 1,052            |                      | 1,010            | 48   |
| 15,0                 | 2,019            |                      | 1,977            | 95   |
| 15,5                 | 2,131            |                      | 2,089            | 100  |
| 16,0                 | 2,067            |                      | 2,025            | 97   |
| 16,5                 | 2,087            |                      | 2,045            | 98   |
| 17,0                 | 2,048            |                      | 2,006            | 96   |
| 17,5                 | 1,181            |                      | 1,139            | 55   |
| 18,0                 | 0,593            |                      | 0,551            | 26   |
| 18,5                 | 0,345            |                      | 0,303            | 15   |
| 19,0                 | 0,257            |                      | 0,215            | 10   |
| 19,5                 | 0,212            |                      | 0,17             | 8  |
| 20,0                 | 0,185            |                      | 0,143            | 7  |
| 20,5                 | 0,158            |                      | 0,116            | 6  |
| 21,0                 | 0,136            |                      | 0,094            | 4  |
| 21,5                 | 0,117            |                      | 0,075            | 4  |
| 22,0                 | 0,090            |                      | 0,048            | 2  |
| 22,5                 | 0,059            |                      | 0,017            | 1  |
| 23,0                 | 0,053            |                      | 0,011            | 1  |
| 23,5                 | 0,047            |                      | 0,005            | 0  |
| 24,0                 | 0,047            |                      | 0,005            | 0  |
| 24,5                 | 0,045            |                      | 0,003            | 0  |
| 25,0                 | 0,047            |                      | 0,005            | 0  |

Tab. 27  $\alpha$ -Glucosidase -Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Resource Q Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | $\alpha$ -Glucosidase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|-------------------------------------|
| 12,5                 | 0,132            | 0,120                | 0,012            | 0                                   |
| 13,0                 | 0,124            |                      | 0,004            | 6                                   |
| 13,5                 | 0,123            |                      | 0,003            | 4                                   |
| 14,0                 | 0,122            |                      | 0,002            | 3                                   |
| 14,5                 | 0,124            |                      | 0,004            | 6                                   |
| 15,0                 | 0,130            |                      | 0,010            | 15                                  |
| 15,5                 | 0,125            |                      | 0,005            | 7                                   |
| 16,0                 | 0,127            |                      | 0,007            | 10                                  |
| 16,5                 | 0,124            |                      | 0,004            | 6                                   |
| 17,0                 | 0,123            |                      | 0,003            | 4                                   |
| 17,5                 | 0,123            |                      | 0,003            | 4                                   |
| 18,0                 | 0,125            |                      | 0,005            | 7                                   |
| 18,5                 | 0,120            |                      | 0                | 0                                   |
| 19,0                 | 0,129            |                      | 0,009            | 13                                  |
| 19,5                 | 0,140            |                      | 0,020            | 30                                  |

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | $\alpha$ -Glucosidase Aktivität (%) |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|-------------------------------------|
| 20,0                 | 0,153            |                      | 0,033            | 49                                  |
| 20,5                 | 0,163            |                      | 0,043            | 64                                  |
| 21,0                 | 0,180            |                      | 0,060            | 90                                  |
| 21,5                 | 0,187            |                      | 0,067            | 100                                 |
| 22,0                 | 0,174            |                      | 0,054            | 81                                  |
| 22,5                 | 0,145            |                      | 0,025            | 37                                  |
| 23,0                 | 0,127            |                      | 0,007            | 10                                  |
| 23,5                 | 0,122            |                      | 0,002            | 3                                   |
| 24,0                 | 0,120            |                      | 0                | 0                                   |
| 24,5                 | 0,120            |                      | 0                | 0                                   |
| 25,0                 | 0,120            |                      | 0                | 0                                   |

Tab. 28 Darstellung der angepassten Werte aus der Anionenaustauschchromatographie mit der Uno Q6 Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) |
|----------------------|--------------------------|
| 0                    | 0                        |
| 17,5                 | 2                        |
| 18,0                 | 2                        |
| 18,5                 | 3                        |
| 19,0                 | 6                        |
| 19,5                 | 14                       |
| 20,0                 | 32                       |
| 20,5                 | 62                       |
| 21,0                 | 76                       |
| 21,5                 | 70                       |
| 22,0                 | 78                       |
| 22,5                 | 90                       |
| 23,0                 | 100                      |
| 23,5                 | 94                       |
| 24,0                 | 74                       |
| 24,5                 | 56                       |
| 25,0                 | 30                       |
| 25,5                 | 28                       |
| 26,0                 | 28                       |
| 26,5                 | 20                       |
| 27,0                 | 20                       |
| 27,5                 | 22                       |
| 28,0                 | 16                       |
| 28,5                 | 10                       |
| 29,0                 | 5                        |
| 29,5                 | 3                        |
| 30,0                 | 3                        |
| 30,5                 | 2                        |
| 31,0                 | 12                       |
| 31,5                 | 14                       |
| 32,0                 | 11                       |
| 32,5                 | 7                        |
| 33,0                 | 4                        |
| 33,5                 | 2                        |
| 34,0                 | 1                        |
| 34,5                 | 0                        |

| Elutionsvolumen (mL) | Absorption bei 280nm (%) |
|----------------------|--------------------------|
| 35,0                 | 0                        |
| 40,0                 | 0                        |

Tab. 29 Phosphatase -Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Uno Q6 Säule für  $\alpha$ -Glucosidase Bestimmung

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | Phosphatase |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|-------------|
| 25,0                 | 0,073            | 0,073                | 0                | 0           |
| 25,5                 | 0,273            |                      | 0,200            | 10          |
| 26,0                 | 2,119            |                      | 2,046            | 100         |
| 26,5                 | 2,119            |                      | 2,046            | 100         |
| 27,0                 | 0,936            |                      | 0,863            | 42          |
| 27,5                 | 0,422            |                      | 0,349            | 17          |
| 28,0                 | 0,192            |                      | 0,119            | 6           |
| 28,5                 | 0,116            |                      | 0,043            | 2           |
| 29,0                 | 0,088            |                      | 0,015            | 1           |

Tab. 30  $\alpha$ -Glucosidase -Aktivität gemessen an den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der Uno Q6 Säule

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | $\alpha$ -Glucosidase |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| 17,5                 | 0,121            | 0,120                | 0,001            | 0                     |
| 18,0                 | 0,120            |                      | 0                | 0                     |
| 18,5                 | 0,121            |                      | 0,001            | 0                     |
| 19,0                 | 0,124            |                      | 0,004            | 1                     |
| 19,5                 | 0,124            |                      | 0,004            | 1                     |
| 20,0                 | 0,129            |                      | 0,009            | 1                     |
| 20,5                 | 0,131            |                      | 0,011            | 2                     |
| 21,0                 | 0,156            |                      | 0,036            | 6                     |
| 21,5                 | 0,147            |                      | 0,027            | 4                     |
| 22,0                 | 0,16             |                      | 0,04             | 6                     |
| 22,5                 | 0,292            |                      | 0,172            | 27                    |
| 23,0                 | 0,518            |                      | 0,398            | 62                    |
| 23,5                 | 0,743            |                      | 0,623            | 97                    |
| 24,0                 | 0,759            |                      | 0,639            | 100                   |
| 24,5                 | 0,710            |                      | 0,590            | 92                    |
| 25,0                 | 0,551            |                      | 0,431            | 67                    |
| 25,5                 | 0,354            |                      | 0,234            | 37                    |
| 26,0                 | 0,243            |                      | 0,123            | 19                    |
| 26,5                 | 0,183            |                      | 0,063            | 10                    |
| 27,0                 | 0,154            |                      | 0,034            | 5                     |
| 27,5                 | 0,145            |                      | 0,025            | 4                     |
| 28,0                 | 0,145            |                      | 0,025            | 4                     |
| 28,5                 | 0,144            |                      | 0,024            | 4                     |
| 29,0                 | 0,151            |                      | 0,031            | 5                     |
| 29,5                 | 0,158            |                      | 0,038            | 6                     |
| 30,0                 | 0,164            |                      | 0,044            | 7                     |
| 30,5                 | 0,16             |                      | 0,04             | 6                     |

| Elutionsvolumen (mL) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}$ | $\alpha$ -Glucosidase |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| 31,0                 | 0,154            |                      | 0,034            | 5                     |
| 31,5                 | 0,141            |                      | 0,021            | 3                     |
| 32,0                 | 0,134            |                      | 0,014            | 2                     |
| 32,5                 | 0,131            |                      | 0,011            | 2                     |
| 33,0                 | 0,128            |                      | 0,008            | 1                     |
| 33,5                 | 0,133            |                      | 0,013            | 2                     |
| 34,0                 | 0,125            |                      | 0,005            | 1                     |
| 34,5                 | 0,126            |                      | 0,006            | 1                     |
| 35,0                 | 0,127            |                      | 0,007            | 1                     |

Tab. 31 Darstellung der Werte zur Bestimmung der ATPase Aktivität

| Fraktion | ATPase - Aktivität | Mittelwert ATPase Aktivität | Blindwert | $\Delta E_{405}$ |
|----------|--------------------|-----------------------------|-----------|------------------|
| 41       | 0,0122<br>0,0088   | 0,0105                      |           | 0,0000           |
| 42       | 0,0098<br>0,0082   | 0,0090                      |           | 0,0000           |
| 43       | 0,0464<br>0,0423   | 0,0444                      |           | 0,0338           |
| 44       | 0,0751<br>0,0713   | 0,0732                      | 0,1055    | 0,0627           |
| 45       | 0,0494<br>0,0421   | 0,0458                      |           | 0,0352           |
| 46       | 0,0204<br>0,0206   | 0,0205                      |           | 0,0100           |
| 47       | 0,013<br>0,0126    | 0,0128                      |           | 0,0023           |

Tab. 32 Darstellung der Phosphatase -Aktivitätswerte zur Bestimmung der ATPase Aktivität

| Fraktion | Phosphatase - Aktivität | Blindwert | $\Delta E_{405}$ |
|----------|-------------------------|-----------|------------------|
| 41       | 0,048                   |           | 0                |
| 42       | 0,066                   |           | 0,018            |
| 43       | 0,307                   |           | 0,259            |
| 44       | 0,764                   | 0,048     | 0,716            |
| 45       | 0,315                   |           | 0,267            |
| 46       | 0,094                   |           | 0,046            |
| 47       | 0,056                   |           | 0,008            |

Tab. 33 Gegenüberstellung ATPase- und Phosphatase-Aktivität

| Fraktion | ATPase Aktivität | Phosphatase Aktivität |
|----------|------------------|-----------------------|
|          | $\Delta E_{405}$ | $\Delta E_{405}$      |
| 41       | 0,0000           | 0                     |
| 42       | 0,0000           | 0,018                 |
| 43       | 0,0338           | 0,259                 |
| 44       | 0,0627           | 0,716                 |
| 45       | 0,0352           | 0,267                 |
| 46       | 0,0100           | 0,046                 |
| 47       | 0,0023           | 0,008                 |

Tab. 34 Substratkinetik aufgereinigter Phosphatase, Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen

| Substratkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405}/\text{min} \cdot \text{mL}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|---|------------------|----------------------|---|---------------|--------------------|
| 0                                       | 0,0662           | 0,101                | 0,00  | 1             | 2,15               |
|   | 0,0672           | 0,0658               | 0,14  |               |                    |
|   | 0,0801           | 0,0776               | 1,67  |               |                    |
| 10                                      | 0,069            | 0,761                | 0,00  | 3             | 4,57               |
|   | 0,0666           | 0,0649               | 0,17  |               |                    |
|   | 0,0807           | 0,0755               | 3,47  |               |                    |
| 50                                      | 0,0785           | 0,0761               | 0,80  | 5             | 3,26               |
|   | 0,0859           | 0,0652               | 2,07  |               |                    |
|   | 0,0815           | 0,077                | 3   |               |                    |
| 100                                     | 0,0853           | 0,0791               | 2,07  | 11            | 6,31               |
|   | 0,1093           | 0,067                | 4,23  |               |                    |
|   | 0,0873           | 0,078                | 6,2   |               |                    |
| 1000                                    | 0,1613           | 0,0902               | 23,70                                       | 42            | 3,76               |
|   | 0,2203           | 0,0811               | 13,92                                       |               |                    |
|   | 0,1212           | 0,0951               | 17,4  |               |                    |
| 5000                                    | 0,3097           | 0,1619               | 49,27                                       | 80            | 3,78               |
|   | 0,4152           | 0,1573               | 25,79                                       |               |                    |
|   | 0,2102           | 0,1611               | 32,73                                       |               |                    |
| 10000                                   | 0,4364           | 0,2502               | 62,07                                       | 100           | 0,00               |
|   | 0,5506           | 0,2456               | 30,50                                       |               |                    |
|   | 0,3114           | 0,2478               | 42,4  |               |                    |

Tab. 35 Darstellung der pH-Wert Abhängigkeit auf die Enzymaktivität (%)

| pH | HG.1 | HG.2 | HG.3 | Mittelwert Aktivität [%] | Standardabweichung |
|----|------|------|------|--------------------------|--------------------|
| 3  | 0    | 1    | 0    | 0                        | 0,52               |
| 4  | 0    | 1    | 0    | 0                        | 0,56               |
| 5  | 4    | 4    | 1    | 3                        | 1,63               |
| 6  | 34   | 33   | 31   | 33                       | 1,61               |
| 7  | 52   | 52   | 53   | 52                       | 0,67               |
| 8  | 36   | 34   | 34   | 35                       | 1,21               |
| 9  | 34   | 33   | 34   | 33                       | 0,62               |
| 10 | 100  | 100  | 100  | 100                      | 0,00               |
| 11 | 89   | 87   | 86   | 87                       | 1,42               |
| 12 | 0    | 1    | 2    | 1                        | 1,03               |

Tab. 36 Test unterschiedlicher Puffer mit verschiedenen pH-Werten und ihren Einfluss auf die Enzymaktivität

| Puffer    | pH | Mittelwert<br>$\Delta E_{405}/\text{mL} \cdot \text{min}$ | Standardabweichung |
|-----------|----|---|--------------------|
| Citrat    | 3  | 0,000   | 0,277              |
|           | 4  | 0,017   | 0,034              |
| Glycin    | 3  | 0,000   | 0,036              |
|           | 8  | 5,890   | 0,71               |
|           | 9  | 16,985  | 2,45               |
|           | 10 | 13,438  | 5,44               |
|           | 11 | 2,515   | 0,16               |
| Universal | 3  | 0,003   | 0,009              |
|           | 4  | 0,000   | 0,012              |
|           | 5  | 0,025   | 0,028              |
|           | 8  | 0,250   | 0,23               |
|           | 9  | 0,240   | 0,22               |
|           | 10 | 0,562   | 0,39               |
|           | 11 | 0,760   | 0,51               |
| Acetat    | 3  | 0,037   | 0,091              |
|           | 4  | 0,177   | 0,025              |
|           | 5  | 0,477   | 0,155              |
| Tris      | 8  | 8,328   | 0,493              |
|           | 9  | 18,630  | 0,782              |
|           | 10 | 9,35  | 0,547              |
|           | 11 | 1,22  | 0,343              |

Tab. 37 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymstabilität bei der aufgereinigten Phosphatase

| HG.1 | HG.2 | Mittelwert Aktivität [%] | Standardabweichung |
|------|------|--------------------------|--------------------|
| 13   | 19   | 16                       | 4,5                |
| 43   | 46   | 45                       | 2,0                |
| 70   | 100  | 85                       | 21,5               |
| 100  | 83   | 92                       | 11,9               |
| 94   | 84   | 89                       | 7,0                |
| 83   | 84   | 83                       | 0,3                |
| 84   | 78   | 81                       | 3,9                |
| 80   | 77   | 78                       | 1,9                |
| 78   | 68   | 73                       | 6,8                |
| 30   | 58   | 44                       | 20,1               |

Tab. 38 Einfluss unterschiedlicher Zinchlorid-Ionen auf die Enzymaktivität

| Konzentration ZnCl (mM) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Mittelwert Aktivität (%) | Standardabweichung |
|-------------------------|------------------|----------------------|---|--------------------------|--------------------|
| <b>0</b>                | 0,2597           | 0,0851               | 21,83   | 100                      | 0,00               |
|                         | 0,2334           | 0,0831               | 18,79   |                          |                    |
|                         | 0,2260           | 0,0878               | 13,82   |                          |                    |
| <b>2</b>                | 0,1632           | 0,0833               | 9,99  | 40                       | 5,10               |
|                         | 0,1434           | 0,0835               | 7,49  |                          |                    |
|                         | 0,1373           | 0,0881               | 4,92  |                          |                    |
| <b>4</b>                | 0,1114           | 0,0839               | 3,44  | 20                       | 4,67               |
|                         | 0,1115           | 0,0839               | 3,45  |                          |                    |
|                         | 0,1227           | 0,0884               | 3,43  |                          |                    |
| <b>6</b>                | 0,1084           | 0,0854               | 2,88  | 13                       | 1,17               |
|                         | 0,1059           | 0,0852               | 2,59  |                          |                    |
|                         | 0,1070           | 0,0911               | 1,59  |                          |                    |
| <b>8</b>                | 0,1013           | 0,0865               | 1,85  | 10                       | 3,91               |
|                         | 0,0982           | 0,0864               | 1,48  |                          |                    |
|                         | 0,1122           | 0,0916               | 2,06  |                          |                    |
| <b>0</b>                | 0,2597           | 0,0851               | 21,83   | 100                      | 0,00               |
|                         | 0,2334           | 0,0831               | 18,79   |                          |                    |
|                         | 0,2260           | 0,0878               | 13,82   |                          |                    |

Tab. 39 Einfluss unterschiedlicher Magnesiumchlorid-Ionen auf die Enzymaktivität

| Konzentration<br>MgCl <sub>2</sub> (μM) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | ΔE <sub>405</sub> /mL<br>*min | Aktivität<br>(%) | Standardabweichung |
|---|---------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------|--------------------|
| <b>0,1</b>                              | 0,2597              | 0,0851                  | 21,83                         | 100              | 0,000              |
|   | 0,2334              | 0,0831                  | 18,79                         |                  |                    |
|   | 0,2781              | 0,1268                  | 21,61                         |                  |                    |
| <b>1</b>                                | 0,1848              | 0,0866                  | 9,82                          | 54               | 17,109             |
|   | 0,1672              | 0,0851                  | 8,21                          |                  |                    |
|   | 0,1949              | 0,083                   | 15,99                         |                  |                    |
| <b>10</b>                               | 0,200               | 0,0848                  | 11,52                         | 57               | 14,514             |
|   | 0,168               | 0,0848                  | 8,32                          |                  |                    |
|   | 0,1938              | 0,084                   | 15,69                         |                  |                    |
| <b>100</b>                              | 0,1753              | 0,0878                  | 8,75                          | 51               | 14,640             |
|   | 0,1707              | 0,0875                  | 8,32                          |                  |                    |
|   | 0,1895              | 0,0877                  | 14,54                         |                  |                    |
| <b>1000</b>                             | 0,2072              | 0,0889                  | 11,83                         | 60               | 16,694             |
|   | 0,1786              | 0,0899                  | 8,87                          |                  |                    |
|   | 0,2084              | 0,0889                  | 17,07                         |                  |                    |
| <b>10000</b>                            | 0,271               | 0,1285                  | 14,25                         | 76               | 21,050             |
|   | 0,243               | 0,1265                  | 11,65                         |                  |                    |
|   | 0,2781              | 0,1268                  | 21,61                         |                  |                    |

Tab. 40 Thermostabilität gemessen mit dem Tris/HCl pH 9 Puffer

| Temperatur  | Inkubationszeit<br>(min) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | ΔE <sub>405</sub> / min *mL | Aktivität<br>(%) | Werte<br>angepasst |
|-------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------|
| <b>0°C</b>  | 0                        | 0,5453              | 0,0823                  | 9,260                       | 100              | 100                |
|             | 20                       | 0,4709              | 0,0794                  | 7,830                       | 85               | 98                 |
|             | 60                       | 0,5282              | 0,0865                  | 8,834                       | 95               | 98                 |
| <b>40°C</b> | 0                        | 0,5453              | 0,0823                  | 9,260                       | 100              | 100                |
|             | 5                        | 0,5361              | 0,0839                  | 9,044                       | 98               | 98                 |
|             | 10                       | 0,5378              | 0,0901                  | 8,954                       | 97               | 97                 |
|             | 20                       | 0,5324              | 0,0875                  | 8,898                       | 96               | 93                 |
|             | 40                       | 0,4400              | 0,0881                  | 7,038                       | 76               | 81                 |
|             | 60                       | 0,4697              | 0,0828                  | 7,738                       | 84               | 79                 |
| <b>50°C</b> | 0                        | 0,5453              | 0,0823                  | 9,260                       | 100              | 100                |
|             | 5                        | 0,4320              | 0,0790                  | 7,060                       | 76               | 79                 |
|             | 10                       | 0,3918              | 0,0778                  | 6,280                       | 68               | 65                 |
|             | 20                       | 0,3598              | 0,0828                  | 5,540                       | 60               | 50                 |
|             | 40                       | 0,2401              | 0,0836                  | 3,130                       | 34               | 34                 |
|             | 60                       | 0,1704              | 0,0830                  | 1,748                       | 19               | 30                 |
| <b>55°C</b> | 0                        | 0,5453              | 0,0823                  | 9,260                       | 100              | 100                |
|             | 5                        | 0,0886              | 0,0842                  | 0,176                       | 2                | 5                  |
|             | 10                       | 0,0833              | 0,0836                  | -0,012                      | 0                | 0                  |
|             | 20                       | -                   | -                       | -                           | -                | 0                  |
|             | 40                       | -                   | -                       | -                           | -                | 0                  |
|             | 60                       | -                   | -                       | -                           | -                | 0                  |

Tab. 41 Temperaturstabilität gemessen mit dem Universalpuffer pH 9

| Temperatur | Inkubationszeit (min) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{min} \cdot \text{mL}$ | Aktivität (%) | Werte angepasst |
|------------|-----------------------|------------------|----------------------|---|---------------|-----------------|
| 0°C        | 0                     | 0,3319           | 0,0945               | 1,583   | 100           | 100             |
|            | 20                    | 0,3190           | 0,0921               | 1,513   | 96            | 98              |
|            | 60                    | 0,3195           | 0,0933               | 1,508   | 95            | 98              |
| 30°C       | 0                     | 0,3319           | 0,0945               | 1,583   | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,3100           | 0,0908               | 1,461   | 92            | 95              |
|            | 10                    | 0,3098           | 0,0902               | 1,464   | 93            | 93              |
|            | 20                    | 0,3129           | 0,0914               | 1,477   | 93            | 93              |
|            | 40                    | 0,2963           | 0,0868               | 1,397   | 88            | 93              |
|            | 60                    | 0,3122           | 0,0914               | 1,472   | 93            | 93              |
| 40°C       | 0                     | 0,3319           | 0,0945               | 1,583   | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2949           | 0,0911               | 1,359   | 86            | 89              |
|            | 10                    | 0,2963           | 0,0907               | 1,371   | 87            | 86              |
|            | 20                    | 0,3071           | 0,0901               | 1,447   | 91            | 85              |
|            | 40                    | 0,2907           | 0,0852               | 1,370   | 87            | 85              |
|            | 60                    | 0,2955           | 0,0865               | 1,393   | 88            | 85              |
| 50°C       | 0                     | 0,3319           | 0,0945               | 1,583   | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,2699           | 0,0962               | 1,158   | 73            | 78              |
|            | 10                    | 0,2502           | 0,0939               | 1,042   | 66            | 63              |
|            | 20                    | 0,2225           | 0,0860               | 0,910   | 57            | 45              |
|            | 40                    | 0,1467           | 0,0840               | 0,418   | 26            | 26              |
|            | 60                    | 0,1270           | 0,0916               | 0,236   | 15            | 15              |
| 55°C       | 0                     | 0,5412           | 0,0833               | 3,053   | 100           | 100             |
|            | 5                     | 0,1862           | 0,0832               | 0,687   | 22            | 22              |
|            | 10                    | 0,1160           | 0,0909               | 0,167   | 5             | 5               |
|            | 20                    | 0,0967           | 0,0884               | 0,055   | 2             | 2               |
|            | 40                    | 0,0904           | 0,0896               | 0,005   | 0,2           | 1               |
|            | 60                    | 0,0826           | 0,0844               | -0,012  | 0             | 0               |

Tab. 42 Einfluss von L-Cystein als Inhibitor, Bestimmung mit Tris/HCl Puffer pH 9

| Konzentration L-Cystein ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|---|------------------|----------------------|---|---------------|--------------------|
| 0   | 0,2845           | 0,0864               | 24,76   | 100           | 0,00               |
|   | 0,2292           | 0,0847               | 18,06   |               |                    |
|   | 0,2305           | 0,0943               | 13,62   |               |                    |
| 2   | 0,1930           | 0,0850               | 13,50   | 61            | 7,00               |
|   | 0,1697           | 0,0847               | 10,63   |               |                    |
|   | 0,1865           | 0,0936               | 9,29  |               |                    |
| 4   | 0,1573           | 0,0854               | 8,99  | 34            | 6,73               |
|   | 0,1238           | 0,0851               | 4,84  |               |                    |
|   | 0,1489           | 0,0947               | 5,42  |               |                    |
| 6   | 0,1281           | 0,0856               | 5,31  | 24            | 2,67               |
|   | 0,1234           | 0,0847               | 4,84  |               |                    |
|   | 0,1273           | 0,0939               | 3,34  |               |                    |
| 8   | 0,1076           | 0,0854               | 2,78  | 14            | 2,64               |
|   | 0,1078           | 0,0857               | 2,76  |               |                    |
|   | 0,1154           | 0,0934               | 2,20  |               |                    |
| 10  | 0,1108           | 0,0866               | 3,03  | 12            | 2,35               |
|   | 0,1012           | 0,0871               | 1,76  |               |                    |
|   | 0,1160           | 0,0963               | 1,97  |               |                    |

Tab. 43 Einfluss von L-Cystein als Inhibitor, Bestimmung mit Universalpuffer pH 10

| Konzentration L-Cystein ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|---|------------------|----------------------|---|---------------|--------------------|
| <b>0</b>                                  | 0,1279           | 0,0931               | 1,2933  | 100           | 0,00               |
|   | 0,1563           | 0,0941               | 0,4147  |               |                    |
|   | 0,28             | 0,086                | 0,2320  |               |                    |
| <b>2</b>                                  | 0,1081           | 0,0954               | 0,6647  | 55            | 21,58              |
|   | 0,1393           | 0,0913               | 0,3200  |               |                    |
|   | 0,1925           | 0,0928               | 0,0847  |               |                    |
| <b>4</b>                                  | 0,1012           | 0,0966               | 0,3913  | 34            | 21,09              |
|   | 0,1260           | 0,0917               | 0,2287  |               |                    |
|   | 0,1474           | 0,0887               | 0,0307  |               |                    |
| <b>6</b>                                  | 0,0994           | 0,0927               | 0,3233  | 28            | 12,89              |
|   | 0,1172           | 0,0899               | 0,1820  |               |                    |
|   | 0,1339           | 0,0854               | 0,0447  |               |                    |
| <b>8</b>                                  | 0,0994           | 0,0927               | 0,2533  | 21            | 12,95              |
|   | 0,1094           | 0,089                | 0,1360  |               |                    |
|   | 0,1248           | 0,0868               | 0,0160  |               |                    |
| <b>10</b>                                 | 0,0994           | 0,0927               | 0,2167  | 18            | 10,04              |
|   | 0,1066           | 0,0885               | 0,1207  |               |                    |
|   | 0,116            | 0,0835               | 0,0213  |               |                    |

Tab. 44 Einfluss von Dinatriumhydrogen-Monophosphat als Inhibitor auf die Phosphataseaktivität

| Konzentration $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion Probe | Extinktion Blindwert | $\Delta E_{405} / \text{mL} \cdot \text{min}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|---|------------------|----------------------|---|---------------|--------------------|
| <b>0,1</b>  | 0,407            | 0,0889               | 31,81   | 99            | 1,82               |
|   | 0,2669           | 0,0903               | 35,32   |               |                    |
|   | 0,3964           | 0,0924               | 60,80   |               |                    |
| <b>1</b>  | 0,4041           | 0,0904               | 31,37   | 96            | 5,95               |
|   | 0,2466           | 0,0893               | 31,46   |               |                    |
|   | 0,4015           | 0,0876               | 62,78   |               |                    |
| <b>10</b>   | 0,3952           | 0,0893               | 30,59   | 93            | 4,48               |
|   | 0,2428           | 0,0876               | 31,04   |               |                    |
|   | 0,3867           | 0,0885               | 59,64   |               |                    |
| <b>100</b>  | 0,3158           | 0,0892               | 22,66   | 68            | 2,78               |
|   | 0,2038           | 0,0878               | 23,20   |               |                    |
|   | 0,3037           | 0,0894               | 42,86   |               |                    |
| <b>1000</b>   | 0,1496           | 0,1053               | 4,43  | 16            | 1,76               |
|   | 0,1152           | 0,0871               | 5,62  |               |                    |
|   | 0,1426           | 0,0879               | 10,94   |               |                    |
| <b>10000</b>  | 0,0901           | 0,0872               | 0,29  | 1             | 0,54               |
|   | 0,0917           | 0,0882               | 0,70  |               |                    |
|   | 0,0937           | 0,0895               | 0,84  |               |                    |
| <b>100000</b>   | 0,1089           | 0,0876               | 2,13  | 7             | 0,56               |
|   | 0,1017           | 0,0904               | 2,26  |               |                    |
|   | 0,1115           | 0,088                | 4,70  |               |                    |

Tab. 45 Einfluss von Adenosindiphosphat (ADP) als Inhibitor auf die Phosphataseaktivität

| Konzentration<br>ADP ( $\mu\text{M}$ ) | Extinktion<br>Probe | Extinktion<br>Blindwert | $\Delta E_{405}/\text{mL} \cdot \text{min}$ | Aktivität (%) | Standardabweichung |
|--|---------------------|-------------------------|---|---------------|--------------------|
| <b>0,1</b>                             | 0,2264              | 0,0862                  | 14,02                                       | 95            | 8,76               |
|  | 0,2672              | 0,0879                  | 35,86                                       |               |                    |
|  | 0,2048              | 0,0846                  | 24,04                                       |               |                    |
| <b>1</b>                               | 0,225               | 0,0842                  | 14,08                                       | 96            | 3,99               |
|  | 0,2621              | 0,0893                  | 34,56                                       |               |                    |
|  | 0,2131              | 0,0821                  | 26,20                                       |               |                    |
| <b>10</b>                              | 0,2240              | 0,0854                  | 13,86                                       | 99            | 1,12               |
|  | 0,2640              | 0,0887                  | 35,06                                       |               |                    |
|  | 0,2230              | 0,0813                  | 28,34                                       |               |                    |
| <b>100</b>                             | 0,2211              | 0,0839                  | 13,72                                       | 94            | 3,57               |
|  | 0,2548              | 0,0892                  | 33,12                                       |               |                    |
|  | 0,2106              | 0,0814                  | 25,84                                       |               |                    |
| <b>1000</b>                            | 0,1907              | 0,0858                  | 10,49                                       | 66            | 14,49              |
|  | 0,1772              | 0,0892                  | 17,60                                       |               |                    |
|  | 0,1852              | 0,0811                  | 20,82                                       |               |                    |
| <b>10000</b>                           | 0,1113              | 0,0867                  | 2,46  | 16            | 2,18               |
|  | 0,114               | 0,0903                  | 4,74  |               |                    |
|  | 0,1058              | 0,0833                  | 4,50  |               |                    |