

Isolierung und Charakterisierung einer Aminopeptidase aus dem Verdauungstrakt des Flusskrebse*s Astacus leptodactylus*

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von

Dominic Weber

aus

Aurich

Hochschule Bremerhaven
Fachbereich 1 „Technologie“
Studiengang Lebensmitteltechnologie

Bremerhaven, 11. Mai 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven durchgeführt.

Wahrscheinlich darf man ganz allgemein sagen, dass sich in der Geschichte des menschlichen Denkens oft die fruchtbarsten Entwicklungen dort ergeben haben, wo zwei verschiedene Arten des Denkens sich getroffen haben.

Werner Heisenberg

Betreuung:

Referent: Prof. Dr. Matthias Nagel
Hochschule Bremerhaven

Korreferent: Dr. Reinhard Saborowski
Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Material und Methoden..... | 5 |
| 2.1 Untersuchungen im Verdauungstrakt | 5 |
| 2.1.1 Tiermaterial und Probenahme | 5 |
| 2.1.2 Vorversuche | 7 |
| 2.1.3 Enzymkinetik | 9 |
| 2.2 Chromatographische Auftrennung und Charakterisierung der Magenflüssigkeit von <i>Astacus leptodactylus</i> | 10 |
| 2.2.1 Chromatographische Auftrennung der Magenflüssigkeit..... | 10 |
| 2.2.2 Ultrafiltration | 12 |
| 2.2.3 Schnelltests in Mikrotiterplatten..... | 13 |
| 2.2.4 Proteinbestimmung | 14 |
| 2.2.5 SDS PAGE | 15 |
| 2.2.6 Aktivitätsgel mit Alanin-AMC | 17 |
| 2.2.7 Bearbeitung der Gele | 18 |
| 2.2.8 Gelfiltration | 19 |
| 2.2.9 Glykoprotein-Färbung..... | 21 |
| 2.2.10 Einfluss von Inhibitoren | 22 |
| 2.2.11 Temperatur-Optimum der Enzymaktivität..... | 25 |
| 2.2.12 pH-Optimum des Enzyms..... | 26 |
| 2.2.13 Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 26 |
| 2.2.14 ICP-MS..... | 28 |
| 2.2.15 Lagerstabilität | 28 |
| 2.3 Molekularbiologische Untersuchungen..... | 29 |
| 2.3.1 Isolierung der RNA | 29 |
| 2.3.2 Herstellen von cDNA | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.3.3 Western Blot..... | 31 |
| 2.3.4 N-terminale Sequenzierung..... | 33 |
| 3. Ergebnisse..... | 35 |
| 3.1 Vorversuche | 35 |
| 3.1.1 Relative Enzymaktivitäten und pH-Profile | 35 |
| 3.1.2 Absoluter Verlauf der Enzymaktivitäten..... | 39 |
| 3.1.3 Verhältnis der Enzymaktivität | 42 |
| 3.2 Bestimmung der Enzymkinetik in der Magenflüssigkeit von <i>Astacus leptodactylus</i> | 43 |
| 3.3 Chromatographische Auftrennung und Charakterisierung der Magenflüssigkeit von <i>Astacus leptodactylus</i> | 47 |
| 3.3.1 Anionenaustauscherchromatographie über die Uno Q6R-Säule..... | 47 |
| 3.3.2 Anionenaustauscherchromatographie über die Resource Q-Säule..... | 47 |
| 3.3.3 Anreicherungsschema..... | 48 |
| 3.3.4 Aktivitätsgel | 50 |
| 3.3.5 Bestimmung der Molmasse mittels SDS-PAGE | 51 |
| 3.3.6 Bestimmung der Molmasse mittels Gelfiltration..... | 53 |
| 3.3.6.1 Charakterisierung der Fraktionen | 55 |
| 3.3.7 Glykoprotein-Färbung..... | 55 |
| 3.3.8 Bestimmung der Inhibitionsverläufe | 57 |
| 3.3.8.1 Inhibition mit Cobalt | 58 |
| 3.3.8.2 Inhibition mit Mangan..... | 59 |
| 3.3.8.3 Inhibition mit Zink..... | 60 |
| 3.3.8.4 Inhibition mit Bestatin..... | 61 |
| 3.3.8.5 Inhibition mit Puromycin..... | 62 |
| 3.3.8.6 Einfluss zweiwertiger Ionen | 63 |
| 3.3.8.7 Einfluss von Inhibitoren..... | 64 |
| 3.3.9 Bestimmung des Temperatur-Optimums und der Aktivierungsenergie..... | 65 |

| | |
|--|----|
| 3.3.9.1 Bestimmung des Temperatur-Optimums | 65 |
| 3.3.9.2 Bestimmung der Aktivierungsenergie | 65 |
| 3.3.10 Bestimmung des pH-Optimums..... | 67 |
| 3.3.11 Isoelektrische Fokussierung..... | 68 |
| 3.3.12 ICP-MS..... | 69 |
| 3. 3.13 Lagerstabilität | 70 |
| 3.3.13.1 Lagerung im Kühlschrank | 70 |
| 3.3.13.2 Lagerung bei -20 °C..... | 70 |
| 3.3.13.3 Lagerung bei -80 °C..... | 70 |
| 3.3.13.4 Gefriergetrocknete Probe | 71 |
| 3.3.14 N-terminale Sequenzierung | 71 |
| 4. Diskussion | 73 |
| 4.1 Das Verdauungssystem dekapoder Crustaceen | 73 |
| 4.2 Charakterisierung und Vergleich der Aminopeptidase..... | 79 |
| 4.2.1 Molmasse | 81 |
| 4.2.2 Aufbau des Moleküls und Co-Faktoren | 82 |
| 4.2.3 Einfluss von Inhibitoren und zweiwertigen Ionen..... | 84 |
| 4.2.3.1 Bestatin..... | 84 |
| 4.2.3.2 Puromycin..... | 85 |
| 4.2.3.3 Zink..... | 85 |
| 4.2.3.4 Mangan..... | 86 |
| 4.2.4 pH-Optimum | 86 |
| 4.2.5 Temperatur-Optimum und Aktivierungsenergie..... | 87 |
| 4.2.6 Enzymkinetik | 87 |
| 4.2.7 Aminopeptidasen aus Crustaceen..... | 88 |
| 4.2.8 Verwandtschaft zu Insekten | 89 |
| 4.3 Naturstoffe aus aquatischen Quellen und ihre Anwendungen | 91 |
| 4.3.1 Hydrolysate und Silagen aus Fischereiresten | 92 |

| | |
|--|----|
| 4.3.2 Anwendungen von Verdauungsenzymen in der Lebensmittelindustrie | 94 |
| 5. Ausblick | 95 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 97 |
| Zusammenfassung | |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Prozentualer Anteil innerhalb der Gruppe der Crustaceen, die aus Fischereibeständen stammen..... | 1 |
| Abb. 1.2: Einteilung der Peptidasen..... | 2 |
| Abb. 1.3: Aufbau malacostracer Krebse..... | 4 |
| Abb. 2.1: Entnahme der Magenflüssigkeit bei <i>Astacus leptodactylus</i> | 6 |
| Abb. 2.2: Entnahme des Mitteldarmdrüsen Gewebes bei <i>Astacus leptodactylus</i> | 6 |
| Abb. 2.3: Chromatographische Auftrennung der Magenflüssigkeit von <i>Astacus leptodactylus</i> | 11 |
| Abb. 2.4: Aufbau eines Tankblots | 32 |
| Abb. 3.1: Bestimmung der relativen Enzymaktivität in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> bei verschiedenen pH-Werten. | 35 |
| Abb. 3.2: Bestimmung der relativen Enzymaktivität im Mitteldarmdrüsenextrakt von <i>A. leptodactylus</i> bei verschiedenen pH-Werten | 36 |
| Abb. 3.3: Bestimmung der relativen Enzymaktivität in der Magenflüssigkeit von <i>H. americanus</i> bei verschiedenen pH-Werten..... | 37 |
| Abb. 3.4: Bestimmung der relativen Enzymaktivität im Mitteldarmdrüsenextrakt von <i>H. americanus</i> bei verschiedenen pH-Werten | 37 |
| Abb. 3.5: Bestimmung der relativen Enzymaktivität in der Magenflüssigkeit von <i>C. pagurus</i> bei verschiedenen pH-Werten | 38 |
| Abb. 3.6: Bestimmung der relativen Enzymaktivität im Mitteldarmdrüsenextrakt von <i>C. pagurus</i> bei verschiedenen pH-Werten..... | 39 |
| Abb. 3.7: Bestimmung der Enzymaktivität mit Ala-NA und Leu-NA bei <i>A. leptodactylus</i> | 40 |
| Abb. 3.8: Bestimmung der Enzymaktivität mit Pro-NA und Val-NA bei <i>A. leptodactylus</i> | 40 |
| Abb. 3.9: Bestimmung der Enzymaktivität mit Ala-NA und Leu-NA bei <i>H. americanus</i> | 41 |
| Abb. 3.10: Bestimmung der Enzymaktivität mit Ala-NA und Leu-NA bei <i>C. pagurus</i> 41 | |
| Abb. 3.11: Verhältnis des Substratumsatzes von NA-Substraten in Magenflüssigkeit und Mitteldarmdrüsenextrakt bei <i>Homarus americanus</i> und <i>Cancer pagurus</i> | 42 |
| Abb. 3.12: Verhältnis des Substratumsatzes von Nitroanilid-Substraten in Magenflüssigkeit und Mitteldarmdrüsenextrakt bei <i>Astacus leptodactylus</i> | 43 |

| | |
|---|----|
| Abb. 3.13: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> mit Ala-NA..... | 44 |
| Abb. 3.14: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> mit Leu-NA..... | 45 |
| Abb. 3.15: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> mit Val-NA..... | 46 |
| Abb. 3.16: Elutionsprofil des FPLC-Laufs mit Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> über Uno Q6R | 47 |
| Abb. 3.17: Elutionsprofil des FPLC-Laufs mit Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> über Resource Q | 48 |
| Abb. 3.18: Aktivitätsgel von <i>Astacus</i> -Proben mit Ala-AMC als Substrat | 50 |
| Abb. 3.19: Mit Coomassie R-250 angefärbtes Aktivitätsgel von <i>Astacus</i> -Proben | 51 |
| Abb. 3.20: Bestimmung der Molmasse. Vergleich zwischen nativen und denaturierten Proben..... | 52 |
| Abb. 3.21: Auftragung des Molmassen-Standards gegen die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten..... | 54 |
| Abb. 3.22: Beispiel eines Elutionsprofils eines Gelfiltrationslaufes | 54 |
| Abb. 3.23: Glykoprotein-Färbung | 56 |
| Abb. 3.24: Mit Coomassie angefärbtes Gel der Glykoprotein-Färbung..... | 57 |
| Abb. 3.25: Einfluss von Cobalt-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 58 |
| Abb. 3.26: Einfluss von Mangan-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 59 |
| Abb. 3.27: Einfluss von Zink-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 60 |
| Abb. 3.28: Einfluss von Bestatin auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 61 |
| Abb. 3.29: Einfluss von Puromycin auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 62 |
| Abb. 3.30: Einfluss zweiwertiger Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase von <i>A. leptodactylus</i> | 63 |
| Abb. 3.31: Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der Aminopeptidase von <i>A. leptodactylus</i> | 64 |

| | |
|--|----|
| Abb. 3.32: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> bei verschiedenen Temperaturen | 65 |
| Abb. 3.33: Arrhenius-Diagramm..... | 66 |
| Abb. 3.34: Bestimmung der Enzymaktivität mit Ala-NA in der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> bei verschiedenen pH-Werten | 67 |
| Abb. 3.35: Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung | 68 |
| Abb. 3.36: Anteile der mittels ICP-MS gemessenen Metalle in einer aufgereinigten Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von <i>Astacus leptodactylus</i> | 69 |
| Abb. 3.37: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität (-20 °C-P robe) | 70 |
| Abb. 3.38: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität (-80 °C-P robe) | 71 |
| Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes dekapoder Krebse. ... | 74 |
| Abb. 4.2: Familie der Zink-Metalloproteasen..... | 82 |
| Abb. 4.3: Darstellung der Interaktion von Bestatin mit Aminopeptidasen | 84 |
| Abb. 4.4: Großgliederung der Arthropoden..... | 90 |
| Abb. 4.5: Schema der Proteinhydrolysat-Herstellung aus Abfällen..... | 93 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel..... | 16 |
| Tabelle 2.2: Ablauf der Glykoprotein-Färbung | 22 |
| Tabelle 2.3: Inhibitoren und ihre Wirkungsweise..... | 24 |
| Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Mastermixes für einen Ansatz | 30 |
| Tabelle 3.1: Beispiel eines Anreicherungsschemas des aufgereinigten Enzyms aus der Magenflüssigkeit von <i>A. leptodactylus</i> | 49 |
| Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Gelfiltrationsstandards..... | 53 |
| Tabelle 3.3: Zusammensetzung der mittels ICP-MS gemessenen Metalle | 69 |
| Tabelle 4.1: Organismen mit membrangebundenen Alanyl-Aminopeptidasen..... | 80 |
| Tabelle 4.2: Bacteria und Eukaryota mit membrangebundenen Alanyl-Aminopeptidasen | 81 |
| Tabelle 4.3: K_M -Werte von Aminopeptidasen verschiedener Organismen, gemessen mit dem Substrat L-Alanin-4-Nitroanilid | 88 |
| Tabelle 4.4: K_M -Werte von Aminopeptidasen verschiedener Organismen, gemessen mit dem Substrat L-Leucin-4-Nitroanilid..... | 88 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|---|
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| μM | μmol/l |
| A. dem | demineralisiertes Wasser |
| Ala-AMC | Alanin-7-Amino-4-methylcoumarin |
| Ala-NA | L-Alanin-4-nitroanilid |
| AMV | Avian Myeloblastosis Virus |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BRENDA | Braunschweig Enzyme Database |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| dNTP | Desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| E-64 | trans-Epoxy succinyl-leucyl-amido-(4-guanido)-butan |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EC | Enzyme Commission |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| HPLC | High Performance (Pressure) Liquid Chromatography |
| ICP-MS | Massenspektrometrie mit induktiv-gekoppeltem Plasma |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| kDa | Kilodalton |
| Leu-NA | L-Leucin- <i>p</i> -nitroanilid |
| M | mol/l |
| MDD | Mitteldarmdrüse |
| MeOH | Methanol |
| MF | Magenflüssigkeit |

| | |
|----------|--|
| mM | mmol/l |
| MW | Mittelwert; Molekulargewicht |
| NA | Nitroanilid |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylylsulfonylfluorid |
| Pro-NA | L-Prolin- <i>p</i> -nitroanilid |
| PSA | Puromycin-sensitive Aminopeptidase |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| R | allgemeine Gaskonstante |
| RT | Reverse-Transkriptase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Stabw. | Standardabweichung |
| STANA | Succinyl-tri-Alanin-4-Nitroanilid |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit (= $\mu\text{mol}/\text{min}$) |
| UV | Ultraviolett-Strahlung |
| Val-NA | L-Valin- <i>p</i> -nitroanilid |

1. EINLEITUNG

Krebstiere (Crustacea) bewohnen hauptsächlich aquatische Ökosysteme und erfüllen dort wichtige ökologische Funktionen. Viele Arten haben zudem eine hohe ökonomische Bedeutung (LeBlanc 2007). Im Jahr 2008 wurden insgesamt 142,2 Millionen Tonnen Fisch und Meeresfrüchte gefangen, wobei 89,7 Millionen Tonnen aus der Fischerei und 52,5 Millionen Tonnen aus der Aquakultur entstammten. Die Crustaceen machten mit 10,8 Millionen Tonnen insgesamt einen Anteil von 7,6 % aus. Bei den Wildfängen waren Shrimps (60 %), Süßwasser-Krebse (17 %) sowie Meereskrebse und Seespinnen (15 %) die wichtigsten Vertreter (Abb. 1.1). In der Aquakultur dominierten Shrimps (67,8 %) und Süßwasser-Krebse (27,3 %). Diese Gruppen deckten zusammen mit Krebsen und Seespinnen (4,8 %) fast den gesamten Bereich der Fänge aus der Aquakultur ab (FAO 2008).

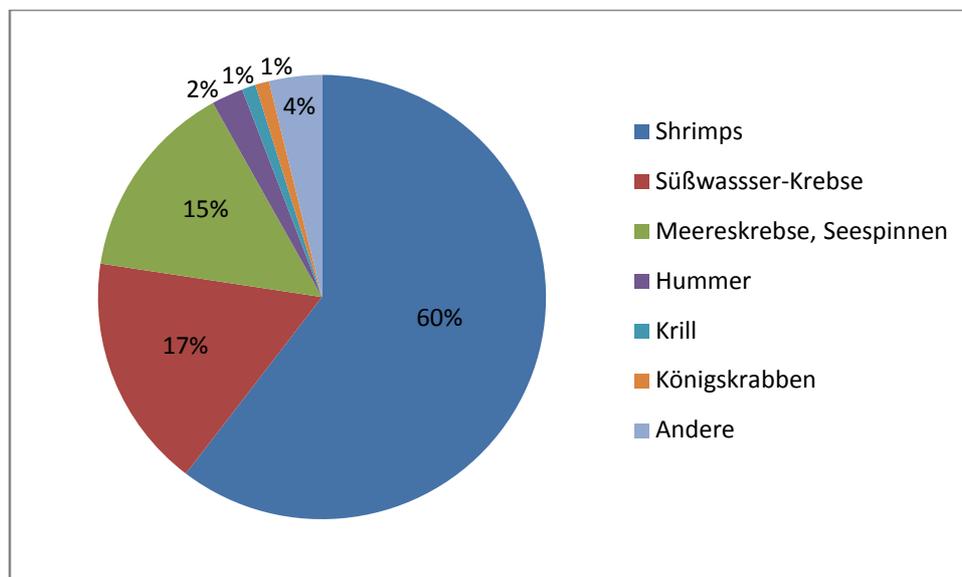


Abb. 1.1: Prozentualer Anteil innerhalb der Gruppe der Crustaceen, die aus Fischereibeständen stammen (FAO 2008).

Allerdings werden nur etwa 50 % bis 60 % der gefangenen Fisch und Meeresfrüchte für den menschlichen Gebrauch verwertet. Somit fallen große Mengen bisher ungenutzte Abfälle an. In den letzten Jahren stieg jedoch das Interesse an diesen Abfällen als potentielle Ressourcen für Proteine und Lipide (Rustad 2003). Proteine in Form von Hydrolysaten haben ein breites Anwendungsspektrum z.B. im Bereich der Futtermittelindustrie, als Zusatzstoffe in der menschlichen Ernährung, in der Medizin sowie im Chemie- und Biotechnologiesektor. Durch eine gezielte Auf-

1 Einleitung

bereitung dieser Abfälle lassen sich zudem Naturstoffe wie Chitin und Chitosan, Enzyme, Vitamine, Öle und Aromastoffe isolieren (Le Gal 1999, Guérard et al. 2005). Enzyme aus aquatischen Lebewesen nehmen dabei aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften eine wichtige Rolle ein.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen proteinabbauende Enzyme aus dem Verdauungstrakt dekapoder Krebse. Diese werden synonym auch als Proteasen, Proteinasen oder proteolytische Enzyme bezeichnet. Der Begriff „Peptidase“ beschreibt zudem die Eigenschaft dieser Enzyme, Peptidbindungen zu hydrolysieren. Der Abbau von Proteinen erfolgt durch Hydrolyse von entweder endständigen oder innerhalb des Proteins gelegenen Peptidbindungen. Die Enzyme werden entsprechend in Exo- bzw. Endopeptidasen unterteilt. Exopeptidasen werden wiederum nach dem Proteinende, an dem sie wirksam werden, in Amino- und Carboxypeptidasen eingeteilt (Abb 1.1) und nach der Anzahl der abgespaltenen Aminosäuren in Mono-, Dipeptidyl- und Tripeptidylpeptidasen (Bauer 2002).

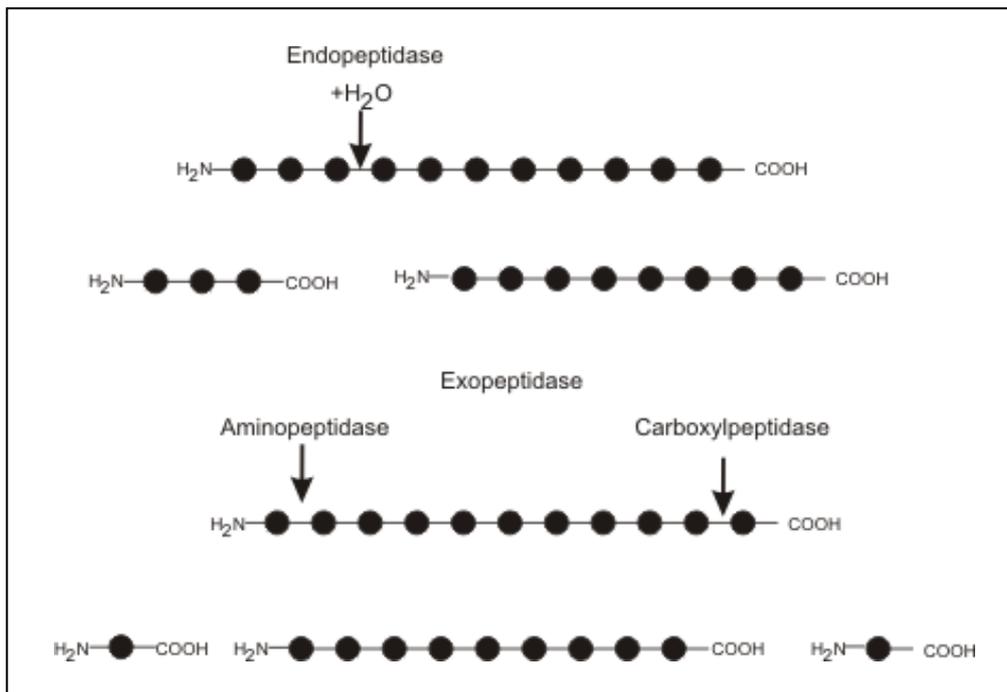


Abb. 1.2: Einteilung der Peptidasen, Quelle:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Peptidase_actions.png?uselang=de (25.4.2011)

1 Einleitung

Einige Crustaceen produzieren große Mengen an Proteasen mit beachtlichen Aktivitäten. Von einigen Verdauungsenzymen aus Crustaceen (Trypsine) ist bekannt, dass sie resistent gegen Autoproteolyse sind. Diese Eigenschaft macht sie für Anwendungen in der Biotechnologie besonders interessant. Zudem ist die Beschaffung dieser Enzyme recht einfach (Hehemann et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Galizische Sumpfkrebs *Astacus leptodactylus*, der Amerikanische Hummer *Homarus americanus* und der Taschenkrebs *Cancer pagurus* auf ihre Aminopeptidase-Aktivität untersucht. *Astacus leptodactylus* bewohnt meist klare Fließgewässer und Seen in Europa. Er kann aber auch in sumpfigen Gewässern leben. Er erreicht meist Größen zwischen 16 bis 18 cm. Seine Ernährungsweise ist omnivor. *Homarus americanus* lebt an der Küste Nordamerikas von Labrador bis North Carolina. Die Hummer können eine Körperlänge von 20 bis 60 cm erreichen, wobei das Gewicht zwischen 0,5 bis 4 kg liegt. Der Lebensraum von *Cancer pagurus* sind sandige und felsige Meeresböden in Nord- und Ostsee, Atlantik und Mittelmeer. Er kann eine Carapaxbreite bis 25 bis 30 cm erreichen. Ebenso wie der Hummer bevorzugt er eine carnivore Ernährungsweise.

Alle drei Arten gehören zum Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer) und zur Klasse der Malacostraca (Höhere Krebse). Diese kennzeichnet sich durch die Einteilung ihres Körpers in verschiedene Segmente (Tagmata). Der vordere Abschnitt wird durch den Kopfbereich (Cephalon) gebildet. Der Brustabschnitt (Thorax) bildet, meist aufgrund einer Verschmelzung mit dem Cephalon, den Cephalothorax. Der hintere Abschnitt heißt Abdomen bzw. Pleon. Der gesamte Körper der Krebse wird von einer chitinösen Cuticula umgeben. Diese bildet im Rückenbereich einen schützenden Panzer (Carapax). Der Name Decapoda (Zehnfüßer) kommt von den fünf Brustextremitätenpaaren (Walther 2008, Abb. 1.3). Der Verdauungskanal besteht aus drei Regionen; Vorder-, Mittel- und Enddarm. Der Vorderdarm besteht wiederum aus Ösophagus, Kaumagen (Cardia) und Filtermagen (Pylorus). Zentrales Organ der Verdauung ist die Mitteldarmdrüse (Hepatopancreas), die die Funktionen von Darm, Leber und Bauchspeicheldrüse der Wirbeltiere vereint (Merrill et al. 1985, Vogt 1996).

1 Einleitung

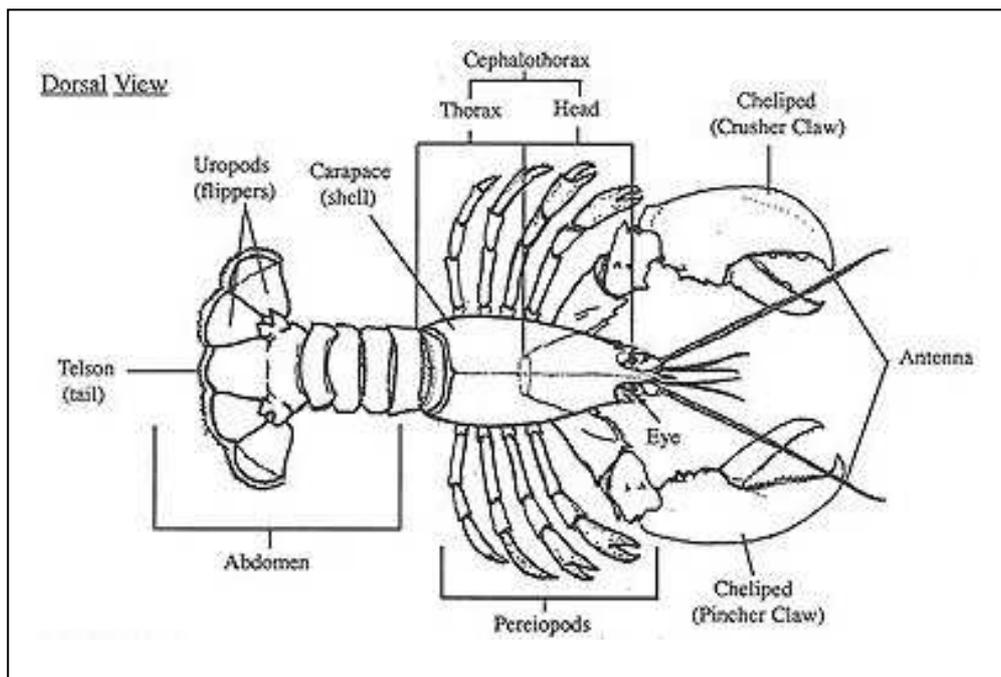


Abb. 1.3: Aufbau malacostracer Krebse. Quelle: <http://knol.google.com/k/lobster#> (30.4.2011)

Ziel dieser Arbeit ist es, die biochemischen Eigenschaften der Aminopeptidasen von *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus* und *Homarus americanus* zu untersuchen und im Hinblick auf ihre physiologische Bedeutung zu diskutieren. Außerdem soll exemplarisch eine Aminopeptidase aus dem Verdauungstrakt isoliert und näher charakterisiert werden. Des Weiteren sollen biotechnologische Applikationen für Verdauungsenzyme aus Crustaceen aufgezeigt und die Ergebnisse in diesem Zusammenhang diskutiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungen im Verdauungstrakt

2.1.1 Tiermaterial und Probenahme

Geräte und Chemikalien

Ultraschallstab: Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson, Danbury USA)

Zentrifuge: 5417R mit Rotor FA 45-24-11 (Eppendorf, Hamburg)

Neben dem Galizischen Sumpfkrebs *Astacus leptodactylus*, der letztlich im Mittelpunkt der Untersuchungen stand, wurden auch vergleichende Untersuchungen mit dem Taschenkrebs *Cancer pagurus* und dem Amerikanischen Hummer *Homarus americanus* durchgeführt.

Die Flusskrebse und die Hummer wurden von einem Fischhändler aus Cuxhaven bezogen (Cux-Fisch Ditzer GmbH). Die Flusskrebse stammten aus Armenien und die Hummer aus Kanada. Das durchschnittliche Gewicht der Flusskrebse betrug 53 g und die Hummer wogen im Mittel 510 g. Die Taschenkrebse wurden im September mit Körben vor Helgoland gefangen. Die Hummer und die Taschenkrebse wurden in Becken mit Seewasser gehältert. Das Wasser stammte aus dem 15 °C-Kreislaufsystem des Alfred-Wegener-Instituts. Die Flusskrebse wurden in 60 Liter-Aquarien in Süßwasser gehältert.

Für die biochemischen Untersuchungen wurden den Tieren Magenflüssigkeit und Mitteldarmdrüsengewebe entnommen. Für die Entnahme der Magenflüssigkeit wurde den Tieren eine Injektionsspritze mit einem aufgesetzten Teflon-Schlauch durch den Ösophagus in den Magen eingeführt (Abb. 2.1). Die Entnahme erfolgte am lebenden Tier. Es wurden jeweils etwa 500 µl Flüssigkeit entnommen.



Abb. 2.1: Entnahme der Magenflüssigkeit bei *Astacus leptodactylus*

Die Mitteldarmdrüsen wurden bei den Flusskrebse und den Hummern wie folgt entnommen: Zunächst wurden die Tiere mehrere Minuten bei -80 °C betäubt. Dann wurde das Abdomen mit einer Gewebeschere entfernt. Durch Einschnitte in den Carapax wurde die Mitteldarmdrüse freigelegt und das Gewebe konnte entnommen werden (Abb. 2.2).



Abb. 2.2: Entnahme des Mitteldarmdrüsengewebes bei *Astacus leptodactylus*

Die Taschenkrebse wurden zur Betäubung etwa 45 min auf Eis gelegt. Die Mitteldarmdrüsen wurden freigelegt, indem der Carapax abgehoben wurde.

Probenaufbereitung

Die Magenflüssigkeit wurde nach der Entnahme in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zunächst auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben bei 14000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Mitteldarmdrüsengewebe wurden nach der Entnahme ebenfalls in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und direkt bei -80 °C eingefroren.

Für die Aktivitätsmessungen in den Magenflüssigkeiten wurden die Proben mit demineralisiertem Wasser (A. dem) verdünnt. Die Mitteldarmdrüsen wurden wie folgt aufgeschlossen: Etwa 50 mg des gefrorenen Gewebes wurde mit einem Spatel entnommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Dann wurde 1 ml A. dem hinzugefügt und die Probe mit einem Ultraschallstab für 5 x 2 Sekunden homogenisiert. Die Probe stand dabei auf Eis um lokale Überhitzungen zu vermeiden. Danach wurde die Probe bei 14000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.1.2 Vorversuche

Geräte und Chemikalien

Photometer: Spectrophotometer DU 800 mit Software DU 800 (Beckmann Coulter, Unterschleißheim-Lohhof); Kältethermostat Lauda RC6CS (Lauda-Königshofen)

Küvetten: Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas Typ 104B-OS (Hellma, Mühlheim)

Auswerte-Software: STATCON SigmaStat 3.5

Universalpuffer nach Ellis (1961)

250 ml 0,1 M Na₂CO₃ · H₂O (Sigma-Aldrich, Steinheim, S4132)

250 ml 0,1 M 2-Amino-2-Methyl-Propan-1,3-diol (Sigma, Steinheim, A9199)

2 MATERIAL UND METHODEN

250 ml 0,1 M NaH₂PO₄ · H₂O (Merck, Darmstadt, A807846)

250 ml 0,1 M Citronensäure Monohydrat (Merck, Darmstadt, K17142744)

Wichtig ist, dass die Lösungen in dieser Reihenfolge zusammengeführt werden. Die jeweiligen pH-Werte wurden bei 30 °C mittels 1 M NaOH bzw. HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, 154938)

L-Alanin-4-nitroanilid Hydrochlorid (Ala-NA, Sigma, Steinheim, A9325)

L-Leucin-*p*-nitroanilid (Leu-NA, Sigma, St. Louis USA, L9125)

Trifluoacetat-Salz (Pro-NA, Sigma, Steinheim, P5267)

L-Valin-*p*-nitroanilid Hydrochlorid (Val-NA, Sigma, Steinheim, V6005)

In Vorversuchen wurde zunächst ermittelt, welche der drei Arten (*Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus*, *Homarus americanus*) die höchste Aminopeptidase-Aktivität aufweist und deren pH-Maximum bestimmt. Gemessen wurde in der Magenflüssigkeit und im Überstand des Mitteldarmdrüsenextraktes (siehe Punkt 2.1.1) im Bereich von pH 5 bis pH 9. Als Puffer wurde ein Universalpuffer (Ellis 1961) verwendet, da er einen großen pH-Bereich abpuffern kann. Als Substrate wurden die Nitroanilid-Formen von Alanin (Ala-NA), Leucin (Leu-NA), Prolin (Pro-NA) und Valin (Val-NA) eingesetzt.

Durchführung

960 µl des entsprechenden Ellis-Puffers (100 mM) wurden mit 20 µl der 50 mM Substrat-Stammlösungen (in DMSO) und 20 µl der vorverdünnten Probe versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) photometrisch bei 405 nm und 30 °C gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat 3.5.

2.1.3 Enzymkinetik

Geräte und Chemikalien

Photometer (siehe Punkt 2.1.2)

Küvetten (siehe Punkt 2.1.2)

Auswerte-Software: GraphPad Prism Version 3.00

Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8

Tris (AppliChem, Darmstadt, A1086)

Der pH-Wert wurde bei 30 °C mit 1 M HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurde der Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

DMSO (siehe 2.1.2)

Ala-NA (siehe 2.1.2)

Leu-NA (siehe 2.1.2)

Val-NA (siehe 2.1.2)

Durchführung

Die Charakterisierung der Reaktionskinetik der Aminopeptidase erfolgte mit den Nitroanilid-Substraten für Alanin (Ala-NA), Leucin (Leu-NA) und Valin (Val-NA). Gemessen wurde die Enzymaktivität in der Magenflüssigkeit des Flusskrebsses in einem 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8. Substratkonzentrationen von 2,5 µM bis 7,5 mM wurden durch Zugabe unterschiedlicher Mengen verschiedener Stammlösungen (in DMSO) des jeweiligen Substrates erreicht (5 bis 50 µl). Es wurde immer 20 µl Probe eingesetzt, wobei die Verdünnungen so angepasst wurden, dass sich die Aktivität im Bereich bis höchstens 0,1 Extinktionseinheiten pro Minute bewegte. Die Puffervolumina wurden so angepasst, dass ein Endvolumen von 1000 µl in der Glasküvette zustande kam. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und photometrisch bei 405 nm über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) bei 30 °C gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit der Software „GraphPad Prism 3.00“.

2.2 Chromatographische Auftrennung und Charakterisierung der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus*

2.2.1 Chromatographische Auftrennung der Magenflüssigkeit

Geräte und Chemikalien

FPLC-System: Pharmacia LKB (Uppsala Schweden) mit Steuergerät Programmer GP-250 Plus; Pumpen Pump P-500; Mischventil Valve V-7; UV-Detektor zur Proteinbestimmung (280 nm) Uvicord SII; Leitfähigkeitsmonitor Conductivity Monitor; Fraktionssammler FRAC-100; Analogschreiber REC 102

Anionenaustauschersäulen: UNO Q 6R (Bio-Rad, München, 720-0013); Resource Q (Pharmacia, Uppsala Schweden, 301416)

Gelfiltrationssäule: NAP-10 Säulen Sephadex G 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire UK, 17-0854-01)

Puffer A: 50 mM Tris-HCl (siehe 2.1.3)

Puffer B: 1 M NaCl in Puffer A

NaCl (AppliChem, Darmstadt, A3597)

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Der Ablauf der chromatographischen Auftrennung ist in folgender Abbildung (Abb. 2.3) dargestellt.

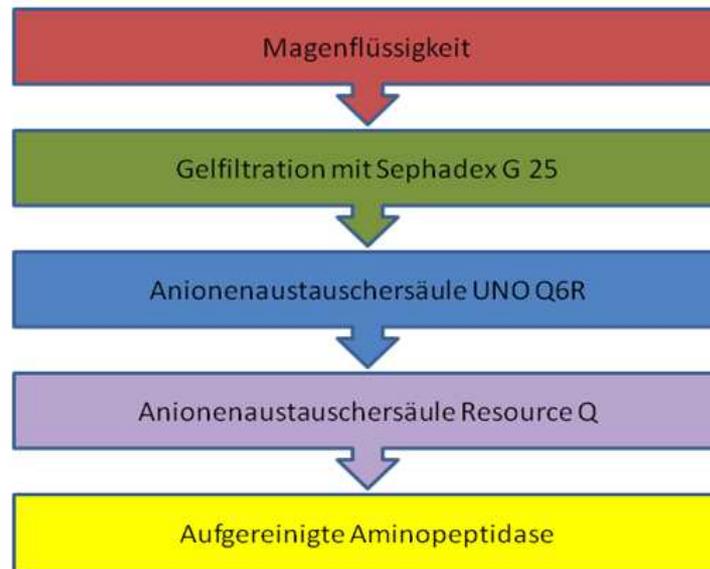


Abb. 2.3: Chromatographische Auftrennung der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus*

Vorreinigung über Gelfiltrationssäule

Die Gelfiltrationssäule (Sephadex G 25) wurde eingesetzt, um Schmutzpartikel und Zelltrümmer zu entfernen. Die Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml wurde zunächst mit Puffer A äquilibriert. 500 µl der Magenflüssigkeit wurden mit dem gleichen Volumen an Puffer A vorverdünnt. Die verdünnte Probe wurde auf die Säule aufgebracht und es wurde gewartet, bis die Flüssigkeit vollständig in die Säulenmatrix eingesickert war. Eluiert wurde mit 1,5 ml Puffer A.

Anionenaustauscherchromatographie über FPLC

Das FPLC-System setzt sich aus einem Steuergerät, zwei Kolbenpumpen, einem Ventil, über das die Probe über eine Probenschleife in das FPLC-System eingebracht wird, der Trennsäule, einem UV-Detektor, einem Fraktionssammler und einem Analogschreiber zusammen.

Zunächst wurde die Probe über die starke Anionenaustauschersäule UNO Q 6R aufgetrennt, danach wurden einige der Fraktionen über die starke Anionenaustauschersäule Resource Q aufgetrennt. Die Säulen haben leicht unterschiedliche Bindungseigenschaften. Die UNO Q 6R-Säule besitzt ein „continuous bed“, derivatisiert mit $-N^+(CH_3)_3$ -Gruppen. Die Resource Q-Säule dagegen besitzt eine Grundmatrix aus monodispersem Polystyrol und eine gebundene Matrix aus einer quartären Ammoniumverbindung.

Durchführung

Zu Beginn wurden die Pumpen A und B, die Probenschleife und die Trennsäule mit Puffer A gespült. Dann wurde das System mit Puffer B gespült, um etwaige Verunreinigungen von der Säule zu entfernen. Anschließend wurde gründlich mit Puffer A nachgespült, bzw. äquilibriert. Das Ventil wurde so eingestellt, dass die Probe aus der Gelfiltration durch Einspritzen mittels Hamilton-Spritze direkt in die Probenschleife gelangte. Es wurde nun ein Programm gestartet, bei dem die Flussrate 1 ml/min betrug. Durch kontinuierliches Zumischen von Puffer B über die Pumpe B wurde eine ansteigende NaCl-Konzentration von 0 bis 1 M erzeugt. Über den Fraktionssammler wurden 70 Fraktionen á 0,5 ml aufgefangen. Der Proteingehalt wurde gemessen und ebenso wie die Salzkonzentration mit dem Analogschreiber aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden mittels Schnelltest (siehe Punkt 2.2.3) auf ihre Aktivität untersucht. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereint und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2.2 Ultrafiltration

Geräte und Chemikalien

Ultrafiltrationseinheiten: Amicon Ultra-15 (Millipore, Tullagreen Irland, UFC901024)

Zentrifuge: 5810 R mit Rotor A-4-62 (Eppendorf, Hamburg)

Puffer. 50 mM Tris-HCl pH 8 (siehe 2.1.3)

Die Protein-Lösung wird auf ein Membranfilter definierter Ausschlussgröße gegeben, unter dem sich ein Auffanggefäß befindet. Nach Zentrifugation bleiben höhermolekulare Bestandteile, die größer als die Ausschlussgröße der verwendeten Membran sind, auf der Membran zurück.

Durchführung

Es wurden Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei 3300 x g für 30 min bei 4 °C. Danach wurde die Membran mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 gespült und die Zentrifugation zweimal wiederholt. Nach diesen Schritten konnte etwa 500 µl Lösung aufgefangen werden.

2.2.3 Schnelltests in Mikrotiterplatten

Geräte und Chemikalien

Photometer: Multiskan FC mit Software Skanlt 2.5.1 (Thermo Scientific, Vantaa Finnland)

Mikrotiterplatte: Ratiolab (Dreieich, 6018210)

Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8 (siehe 2.1.3)

DMSO (siehe 2.1.3)

Ala-NA (siehe 2.1.3)

Leu-NA (siehe 2.1.3)

Pro-NA (siehe 2.1.3)

Val-NA (siehe 2.1.3)

Succinyl-tri-Alanin-4-Nitroanilid (STANA, Sigma-Aldrich, Steinheim, S4760)

Durchführung

Jeweils 20 µl der einzelnen Fraktionen wurden in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurde jeweils 250 µl einer 1 mM Substratlösung mit einer Multipette hinzugefügt. Die Substrate wurden hierzu zunächst in DMSO

gelöst und dann in Puffer überführt. Je nach Substrat wurde die Extinktion nach einigen Minuten bis hin zu 45 min nach Inkubation bei 405 nm und Raumtemperatur gemessen.

2.2.4 Proteinbestimmung

Geräte und Chemikalien

Photometer (siehe 2.2.3)

Mikrotiterplatte (siehe 2.2.3)

Farbreagenz: Protein Assay Kit (Bio-Rad, München, 500-006)

Das Reagenz wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit A. dem verdünnt

Standard: Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, 85040C)

Es wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie-Blue reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Extinktion bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Lösung.

Durchführung

Die Bestimmung erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten. Es wurden jeweils 10 µl der vorverdünnten Probe vorgelegt und mit 40 µl A. dem aufgefüllt. Für die Farbreaktion wurden die Proben anschließend mit 250 µl Farbreagenz versetzt. Nach etwa 10 min erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm.

Um den Proteingehalt bestimmen zu können, wurde eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Es wurden 0 bis 50 µl einer 0,1 mg/ml BSA-Lösung eingesetzt. Das Volumen wurde mit A. dem auf 50 µl aufgefüllt. Danach wurde das Farbreagenz dazu pipettiert.

2.2.5 SDS PAGE

Geräte und Chemikalien

Gelelektrophoresesystem: Gelelektrophorese-Kammer Hoefer Mighty Small II SE 250 (Hoefer, San Francisco USA); Gel-Caster Hoefer Mighty small; Spacer 0,75 mm; Glasplatte 100 x 80 mm

Spannungsquelle Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden)

Umwälzkühler Minichiller (Huber, Offenburg)

Trenngelbuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris (siehe 2.1.3)

Sammelgelbuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Tris (siehe 2.1.3)

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Elektroden-Puffer 5x pH 8,3

| | |
|---|---------|
| Tris (siehe 2.1.3) | 15,15 g |
| Glycin (Sigma, Steinheim, G7126) | 72,05 g |
| Natriumdodecylsulfat (SDS, Merck, Darmstadt, L151212) | 5,00 g |

Mit A.dem auf 1000 ml auffüllen. Der pH-Wert muss nicht mehr eingestellt werden. Vor der Zugabe von SDS wurde der Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Trenn- und Sammelgel (siehe Tabelle 2.1)

Trenn- bzw. Sammelgelbuffer (siehe oben)

30 % Acrylamid-Lösung (AppliChem, Darmstadt, A3626)

SDS (siehe Elektroden-Puffer)

Ammoniumpersulfat (APS, Sigma, St. Louis USA, A6761)

N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin (TEMED, Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden, 17-1312-01)

2 MATERIAL UND METHODEN

Probenpuffer

| | |
|---|--------|
| Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, 108122) | 2,0 mg |
| Sammelgelpuffer (siehe oben) | 2,5 ml |
| Glycerin (AppliChem, Darmstadt, A3552) | 3,0 ml |
| 10 % SDS (siehe Elektroden-Puffer) | 4,0 ml |
| Mit A. dem auf 10 ml auffüllen | |

Isopropanol (Sigma, Steinheim, 405-7)

β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, 444203)

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE in Anlehnung an die Methode nach Laemmli (1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel konzentriert bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Dies führt zu schärferen Banden und erlaubt die Auftrennung größerer Proteinmengen als in Gelen ohne Sammelgel.

Durchführung

Die Gele wurden manuell in einem Gel-Caster hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

| Lösungen | Trenngel (ml) | Sammelgel (ml) |
|--------------------|-----------------|----------------|
| | 12 % T, 2,7 % C | 4 % T, 2,7 % C |
| A. dem | 4,16 | 2,8 |
| Trenngelpuffer | 3,12 | --- |
| 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 (ml) | 12,5 | 4,5 |

Zunächst wurde ein sog. Sandwich, bestehend aus einer Glasplatte, einer Keramikplatte entsprechender Größe und Abstandhaltern zusammengesetzt und in den Gel-Caster gespannt. Dann wurde das Trenngel in den Raum zwischen einer Glas- und einer Keramikplatte gegossen. Die Acrylamid-Lösung wurde bis etwa 2 cm unterhalb der maximalen Füllhöhe aufgefüllt. Direkt nach dem Eingießen wurde die Lösung mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet, damit ein gerader Abschluss des Gels entsteht und zudem kein Luftsauerstoff an das Gel kommt. Nach etwa 30 min war das Gel auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde dann abgegossen. Um es vollständig zu entfernen wurde mehrmals mit Sammelgel-Puffer gespült. Nun wurde das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Teflonkamm eingesetzt um die Probenaschen zu formen. Nach 30 min war auch das Sammelgel auspolymerisiert. Anschließend wurde das Gel-Sandwich samt Kamm in eine vertikale Gelelektrophorese-Kammer überführt. Die Kammer wurde mit 250 ml Elektroden-Puffer gefüllt. Erst dann wurde der Probenkamm entfernt und die Proben, die mit dem gleichen Volumen an Proben-Puffer verdünnt wurden, in die Geltaschen gefüllt. Einige Proben wurden durch Aufkochen mit 5 % Mercaptoethanol denaturiert.

Pro Gel wurde eine Stromstärke von 15 mA angelegt bei einer maximalen Spannung von 300 V. Die Temperatur wurde auf 4 °C eingestellt. Die Elektrophorese dauerte etwa 1,5 Stunden.

2.2.6 Aktivitätsgel mit Alanin-AMC

Geräte und Chemikalien

Gel-Dokumentationssystem: ChemiDoc XRS mit Software Quantity One (Bio-Rad, München)

Puffer: 0,1 M Tris-HCl pH 7

Tris (siehe 2.1.3)

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Alanin-7-Amino-4-methylcoumarin (Ala-AMC, Peptanova, Sandhausen, 3147-v)

DMSO (siehe 2.1.3)

Substrat-Lösung: 0,1 mM Ala-AMC in Puffer

Durchführung

Das Substrat wurde zunächst in DMSO gelöst und in 50 ml des Puffers überführt. Die Gele wurden 3 Minuten in dieser Lösung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie mehrmals mit A. dem gespült, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern und dann unter UV-Licht fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Quantity One“ von Bio-Rad.

2.2.7 Bearbeitung der Gele

Geräte und Chemikalien

Dokumentationssystem (siehe 2.2.6)

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R 250 (Biomol, Hamburg, 3285) 0,5 g

Methanol (AppliChem, Darmstadt, A2389) 400 ml

Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, A0820) 100 ml

Mit A. dem auf 1000 ml auffüllen

Den Farbstoff zunächst in Methanol lösen, dann die anderen Komponenten hinzufügen. Die Lösung wurde anschließend über Faltenfilter (Cellulose) filtriert.

Entfärbelösung

Methanol (siehe oben) 400 ml

Essigsäure (siehe oben) 70 ml

Mit A. dem auf 1000 ml auffüllen

Colloidal Staining Kit (Invitrogen, Carlsbad USA, LC6025)

Färbung

Die Coomassie-Färbung wird zum Anfärben der Proteinbanden verwendet. Der Farbstoff der Färbelösung lagert sich an die basische Seitenketten der Aminosäuren an und bewirkt eine Blaufärbung.

Außerdem wurden Anfärbungen mit dem Colloidal Staining Kit durchgeführt. Diese besitzt eine höhere Sensivität als die normale Coomassie-Färbung.

Zum Anfärben wurden die Gele für mindestens 5 Stunden in etwa 50 ml Färbelösung gelegt und geschwenkt.

Entfärben

Nach dem Färben werden die Gele kurz mit A. dem abgespült und für mindestens 30 min in etwa 50 ml Entfärbelösung gelegt und geschwenkt.

Auswertung

Die Gele wurden im Anschluss im Dokumentationssystem fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Quantity One“.

2.2.8 Gelfiltration

Geräte und Chemikalien

HPLC-System: BioTek Instruments (Neufahrn) mit UV-Detektor LC-95 (Perkin Elmer, Rodgau); Software: Kroma System 2000 (BioTek Instruments, Neufahrn)

Vorsäule Bio-Sil 250 Guard (Bio-Rad, München)

Trennsäule Bio-Sil 250 (Bio-Rad, München)

Auswerte-Software: Microsoft Excel 2007

Mikrotiterplatte (siehe 2.2.3)

Gelfiltrations-Standard Bio-Rad (München, 151-1901)

Saliner Phosphat-Puffer pH 6,8

50 mM NaH₂PO₄ · H₂O (Merck, Darmstadt, A807846)

50 mM Na₂HPO₄ Dihydrat (Merck, Darmstadt, K10343780)

150 mM NaCl (AppliCem, Darmstadt, A3597)

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Bei der Gelfiltration, die auch Ausschlusschromatographie genannt wird, besteht die stationäre Phase aus porösen partikulären Materialien, die wie ein Molekularsieb wirken. Kleine Partikel können in die Gelpartikel eindringen bzw. treten viel mehr mit den Teilchen in Wechselwirkung als große Moleküle. Entsprechend wird die Elution der kleinen Partikel verzögert, während größere Moleküle früher eluieren. Die verschiedenen Moleküle werden also nach ihrer Größe, genauer gesagt nach dem Stokes Radius, aufgetrennt.

Für die Gelfiltration wurde ein HPLC-System verwendet. Es bestand aus einem Steuergerät, zwei Kolbenpumpen, einem Ventil, über das die Probe über eine Probenschleife in das HPLC-System eingebracht wurde, einer Vorsäule, der Trennsäule und einem UV-Detektor. Die digitale Datenaufnahme erfolgte mit der Software Kroma System 2000.

Durchführung

Das System wurde zunächst mit salinem Puffer äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Der Arbeitsdruck stellte sich dabei auf in etwa 14 MPa ein. Danach wurde das Ventil so eingestellt, dass die Probe durch Einspritzen mittels Hamilton-Spritze direkt in die Probenschleife gelangte. Injiziert wurde zunächst 20 µl eines Standards und danach die Proben. Direkt nach der Injektion begann das Programm mit der Aufzeichnung der Extinktion bei 280 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Excel.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde das Eluat in einer 96-well Mikrotiterplatte fraktioniert. Aus den einzelnen Fraktionen wurde dann jeweils 20 µl für die Schnelltests (siehe Punkt 2.2.3) entnommen.

2.2.9 Glykoprotein-Färbung

Geräte und Chemikalien

Gel-Dokumentationssystem (siehe 2.2.6)

Probenpuffer (siehe 2.2.5)

Methanol (siehe 2.2.7)

2 % Periodsäure-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, P0430)

Schiffs Reagenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, S5133)

1 % Natriumdisulfit-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, S9000)

Peroxidase (Sigma, St. Louis USA, P8250)

Mit Hilfe der Glykoprotein-Färbung, auch PAS-Färbung (Periodic-Acid-Schiff) genannt, können kohlenhydrathaltige Komponenten nachgewiesen werden. In diesem Fall sollte untersucht werden, ob es sich bei dem isolierten Protein um ein Glykoprotein handelt, also ein Makromolekül, das aus einem Protein und einer oder mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen besteht.

Durch die Zugabe von Periodsäure kommt es beim Vorhandensein dieser Verbindungen zur Oxidation von Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Diese reagieren mit der fuchsin-schwefeligen Säure des Schiff'schen Reagenz und bewirken eine rot-violette Färbung. Beim anschließenden Spülen mit Natriumdisulfit wird überschüssige Säure wieder entfernt.

Durchführung

Die Glykoprotein-Färbung wurde mit einem 12%-Gel (siehe Punkt 2.2.5) wie in Tabelle 2.2 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2.2: Ablauf der Glykoprotein-Färbung

| Schritt | Lösung | Inkubationszeit |
|-----------|----------------------------|--------------------|
| Fixierung | 50 % MeOH-Lösung | 30 min |
| Waschen | A. dem | 2 x 10 min |
| Oxidation | 2 % Periodsäure-Lösung | 30 min |
| Waschen | A. dem | 2 x 10 min |
| Färbung | Schiffs Reagenz | 100 min im Dunkeln |
| Reduktion | 1 % Natriumdisulfit-Lösung | 60 min |
| Waschen | A. dem | 2 x 10 min |

Als Positivkontrolle wurde eine Peroxidase-Lösung von 2 mg/ml hergestellt. Diese wurde mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer verdünnt. Es wurden 7 bis 14 µl auf das Gel aufgetragen.

Die Gele wurden unter Weißlicht fotografiert und daraufhin mit einer Coomassie-Lösung angefärbt (siehe Punkt 2.2.7).

2.2.10 Einfluss von Inhibitoren

Geräte und Chemikalien

Photometer (siehe 2.1.2)

Küvetten (siehe Punkt 2.1.2)

Auswerte-Software: GraphPad Prism Version 3.00

Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8 (siehe 2.1.3)

CaCl₂ · 2 H₂O Merck, Darmstadt, TA362582)

CoCl₂ · 6 H₂O (Merck, Darmstadt, B824039)

CuCl₂ · 2 H₂O (AppliChem, Darmstadt, A2787

FeCl₂ · 4 H₂O (AppliChem, Darmstadt, A3584)

MgCl₂ (Sigma, St. Louis USA, M8266)

MnCl₂ · 4 H₂O (Merck, Darmstadt, A474527)

SrCl₂ · 6 H₂O (Riedel-de Haën, Seelze, 13909)

ZnCl₂ (AppliChem, Darmstadt, A0990)

DMSO (siehe 2.1.2)

2 MATERIAL UND METHODEN

Ala-NA (siehe 2.1.2)

Puromycin (AppliChem, Darmstadt, A2856)

Bestatin (Sigma-Aldrich, Steinheim, B8385)

PMSF (Sigma, Steinheim, P7626)

E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim, E3132)

Pepstatin A (Sigma, Steinheim, P4265)

β -Mercaptoethanol (siehe 2.2.5)

EDTA Dinatriumsalz (Sigma, Steinheim, E6635)

Es wurden die Inhibitionsverläufe mit Zink, Mangan, Cobalt sowie mit den spezifischen Aminopeptidase-Inhibitoren Bestatin und Puromycin bestimmt.

Durchführung

Es wurde bei Zink-, bzw. Mangan-Konzentrationen von 0 bis 10 mM gemessen. Für die Messung des Einflusses von Puromycin auf die Enzymaktivität wurden Konzentrationen von 0 bis 2 mM verwendet. Die Konzentrationen von Bestatin und Cobalt betragen 0 bis 1 mM.

Es wurden zunächst Stammlösungen der Inhibitoren hergestellt, die im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden. In einer Küvette wurden 940 μ l eines 50 mM Tris-HCl-Puffers pH 8 mit jeweils 20 μ l der Inhibitor-Lösung und 20 μ l der vorverdünnten Probe versetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Danach wurden 20 μ l einer Ala-NA-Stammlösung (50 mM in DMSO) zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) photometrisch bei 405 nm gemessen. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 3.00 wurde eine Trendlinie ermittelt, wodurch sich der IC_{50} -Wert errechnen ließ.

Einfluss zweiwertiger Ionen

Da das Enzym laut Literatur wahrscheinlich zweiwertige Ionen wie Zink als Co-Faktoren besitzt, wurde der Einfluss zweiwertiger Ionen untersucht. Die Endkonzentrationen in der Glasküvette betragen jeweils 1 mM. 940 µl eines 50 mM Tris-HCl-Puffers pH 8 wurden jeweils mit 20 µl der 50 mM Ionen-Stammlösungen und 20 µl der vorverdünnten Probe versetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Danach wurden 20 µl einer Ala-NA-Stammlösung (50 mM in DMSO) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bei 30 °C gemessen.

Einfluss von Inhibitoren

Tabelle 2.3 zeigt, welche Inhibitoren in welcher Konzentration eingesetzt wurden.

Tabelle 2.3: Inhibitoren und ihre Wirkungsweise

| Inhibitor | Konzentration | Wirkungsweise |
|-------------|---------------|-------------------|
| PMSF | 1 mM | Serin-Protease |
| E-64 | 100 µM | Cystein-Protease |
| Pepstatin A | 100 µM | Aspartat-Protease |
| β-ME | 1 mM | Cystein-Protease |
| EDTA | 100 µM | Komplexbildner |
| EDTA | 1 mM | Komplexbildner |

Durchführung

In einer Glasküvette wurden 940 µl eines 50 mM Tris-HCl-Puffers pH 8 jeweils mit 20 µl einer 50 mM bzw. 5 mM Inhibitor-Lösung (in DMSO) und 20 µl der vorverdünnten Probe versetzt. Bei der Ausgangsprobe ohne Inhibitor-Lösung wurde 20 µl DMSO eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Danach wurden 20 µl einer Ala-NA-Stammlösung (50 mM in DMSO) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) photometrisch bei 405 nm bei 30 °C gemessen.

2.2.11 Temperatur-Optimum der Enzymaktivität

Geräte und Chemikalien

Photometer (siehe 2.1.2)

Küvetten (siehe Punkt 2.1.2)

Auswerte-Software: Microsoft Excel 2007

Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8 (siehe 2.1.3)

DMSO (siehe 2.1.2)

Ala-NA (siehe 2.1.2)

Durchführung

Das Temperatur-Optimum der Enzymaktivität wurde im Bereich von 6 bis 72 °C gemessen. Als Reaktionspuffer wurde ein 50 mM Tris-HCl-Puffer verwendet, der bei den jeweiligen Messtemperaturen auf pH 8 eingestellt wurde. Es wurden 960 µl des Puffers mit 20 µl einer Ala-NA-Stammlösung (50 mM in DMSO) versetzt und für 5 min bei der entsprechenden Messtemperatur vorinkubiert. Durch Zugabe von 20 µl der vorverdünnten Probe wurde die Reaktion gestartet. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Es wurde über einen Zeitraum von 2 min (linearer Bereich) gemessen. Die Aktivitäten wurden in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur dargestellt. Aus den ermittelten Aktivitäten wurde zudem ein Arrhenius-Diagramm erstellt, wodurch sich die Aktivierungsenergie der Reaktion (Formel 1) bestimmen ließ.

Formel 1: Gleichung für die Berechnung der Aktivierungsenergie

$$E_A = -m * R$$

E_A Aktivierungsenergie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)

m ermittelte Steigung aus Arrhenius-Diagramm

R Allgemeine Gaskonstante ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

2.2.12 pH-Optimum der Enzymaktivität

Geräte und Chemikalien

Photometer (siehe 2.1.2)

Küvetten (siehe Punkt 2.1.2)

Puffer: 50 mM Tris-HCl

Tris (siehe 2.1.3)

Der pH-Wert wurde bei 30 °C mit 1 M HCl bzw. NaOH eingestellt. Vor der Benutzung wurden die Puffer mittels Wasserstrahlpumpe filtriert (0,2 µm-Membranfilter aus hydrophilem Polypropylen) und entgast.

Ala-NA (siehe 2.1.2)

DMSO (siehe 2.1.2)

Durchführung

Durch die Messung der Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten in der Magenflüssigkeit aus Vorversuchen (siehe Punkt 2.1.2) war der ungefähre Bereich des pH-Optimums bereits bekannt. Es wurde daher der Bereich von pH 7,4 bis pH 8,4 gewählt. Gemessen wurde in einem 50 mM Tris-HCl-Puffer, der bei 30 °C auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt wurde. Es wurden 960 µl des Puffers mit 20 µl einer Ala-NA-Stammlösung (50 mM in DMSO) versetzt. Durch Zugabe von 20 µl der vorverdünnten Probe wurde die Reaktion gestartet. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und über einen Zeitraum von 2 Minuten (linearer Bereich) photometrisch bei 405 nm und 30 °C gemessen. Die Messtemperatur betrug 30 °C.

2.2.13 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Geräte und Chemikalien

Elektrophorese-Kammer: Phast System (Pharmacia LKB, Uppsala Schweden)

Gele: PhastGele 3-9 (Pharmacia LKB, Uppsala Schweden)

Fixierlösung

10% Trichloressigsäure (TCA, Merck, Darmstadt, 0807)

Waschlösung

30% Methanol (siehe 2.2.7)

10 % Essigsäure (siehe 2.2.7)

Die IEF ist ein elektrophoretisches Trennverfahren. Die Trennung findet in einem Gel mit einem pH-Gradienten statt. Die geladenen Moleküle der amphoteren Verbindungen wandern im elektrischen Gleichstromfeld in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen, bis sie im pH-Gradienten an dem pH-Wert angekommen, an dem ihre Nettoladung null ist. Dieser pH-Wert ist der isoelektrische Punkt (pI) der Verbindung.

Durchführung

Es wurde mit dem Phast System (Pharmacia LKB) und den PhastGelen 3-9 gearbeitet, d.h. die Gele decken den Bereich von pH 3 bis pH 9 ab. Die Gele bestehen aus homogenem Polyacrylamid (5% T, 3% C). Das Gel wurde zunächst vorsichtig aus der Verpackung genommen, die obere Schutzfolie entfernt und auf die markierte Fläche im Phast System gelegt. Die Fokussierung umfasste drei Schritte: Vorfokussierung für den Aufbau des pH-Gradienten, Probenauftragung und die eigentliche Fokussierung. Es wurden folgende Einstellungen gewählt:

1. Vorfokussierung: 2000 V, 2,5 mA, 15 °C
2. Probenauftragung: 200 V, 2,5 mA, 35 °C
3. Fokussierung: 2000 V, 2,5 mA, 15 °C

Nach der Vorfokussierung wurden die Proben mittels Probenapplikator aufgetragen. Nach der Fokussierung wurde das Gel einige Minuten in 10 % TCA fixiert, danach wurde es für 5 Minuten in einem Gemisch aus 30% Methanol und 10 % Essigsäure gewaschen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie (siehe Punkt 2.2.7).

2.2.14 ICP-MS

Geräte und Chemikalien

ICP-Massenspektrometer: Elan 6000 (Perkin Elmer, San José USA)

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von Elementen in relativ kurzer Zeit. Sie beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 5000 °C. Die flüssigen Proben werden dabei über ein Zerstäubersystem in Form feinsten Tröpfchen mit dem Trägergas Argon in das ICP-MS transportiert. Einzelne Ionen werden dann durch ein Massenfilter aufgetrennt und detektiert.

Durchführung

Die Analyse wurde nicht selbst durchgeführt, sondern von der Arbeitsgruppe Kriews im Alfred-Wegener-Institut. Es wurde mit dem Gerät Elan 6000 gearbeitet, als interner Standard wurde 10 ppb Rhodium eingesetzt. Die Messdauer betrug 3 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

2.2.15 Lagerstabilität

Geräte und Chemikalien

Gefriertrocknungsanlage: Alpha 1-4 (Christ, Osterode am Harz)

Durchführung

Für verschiedene Untersuchungen wurden einzelne Proben mehrmals benutzt. Einige der Proben wurden zwischendurch bei -20 °C und andere bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden also mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren. Um den Effekt des wiederholten Einfrierens zu untersuchen wurden regelmäßig Aktivitätstests (siehe Punkt 2.2.3) der aufgetauten Proben durchgeführt. Eine Probe wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert. Auch hier wurden Aktivitätstests durchgeführt.

Außerdem wurde eine Probe gefriergetrocknet, um einer Aufkonzentrierung des Proteins für die SDS-PAGE zu erzielen. Die Aktivität wurde gemessen, nachdem die Probe in der ursprünglichen Menge Wasser wieder aufgelöst wurde.

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Isolierung der RNA

Geräte und Chemikalien

Zentrifuge: Sprout Mini (Omnilab, Bremen)

RNeasy Mini Kit mit Säule RNeasy Mini spin (Qiagen, Hilden)

RNAlater (Ambion, Austin USA)

Ethanol (AppliChem, Darmstadt, A4930)

Durchführung

Zunächst wurden etwa 30 mg der in RNAlater eingelegten Mitteldarmdrüsen in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen. Dann wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mikropistills in 600 µl RLT-Lysis-Puffer homogenisiert. Anschließend wurde 3 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde 70 % Ethanol im gleichen Verhältnis zum Volumen des Überstandes hinzugegeben und durch Aufziehen mit einer Pipette vorsichtig durchmischt. Die Probe wurde dann auf eine RNeasy Mini spin Säule gegeben und es wurde 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen wurde 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und wie beim vorherigen Schritt zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei weitere Waschschrte, bei dem jeweils 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben wurden. Zentrifugiert wurde 15 s bei 8000 x g. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurde die Säule auf ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben. Um die RNA zu eluieren wurde 1 min bei 8000 x g zentrifugiert.

2.3.2 Herstellen von cDNA

Geräte und Chemikalien

Photometer: Spektrophotometer Nano Drop ND-1000 mit Software ND-1000 (PEQLAB, Wilmington Delaware USA)

Zentrifuge (siehe 2.3.1)

PCR Gerät (Thermocycler Mastercycler, Eppendorf, Hamburg)

Reverse Transcription System Kit (Promega, Madison USA, A3500)

Mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus Retroviren, kann ein Komplementärstrang zur RNA, die sog. komplementäre DNA (cDNA), gebildet werden. Die verwendete RT stammt aus dem *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV). Sie benötigt einen Primer zur Initiation der DNA-Synthese. In diesem Fall wird ein Oligo-dT-Primer verwendet. Die Thymin-Basen und das Nukleotid binden sich komplementär zum PolyA-Schwanz am 3'-Ende der RNA.

Durchführung

Es wurde nach der Anleitung des „Reverse Transcription Systems“ gearbeitet. Zunächst wurde mit dem Spektrophotometer Nano Drop ND-1000 der RNA-Gehalt bestimmt. Danach wurde der sogenannte Mastermix (Tabelle 2.4) hergestellt. Von dem Mastermix wurden 10,1 µl in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde so viel µl der RNA-Lösung hinzu pipettiert, dass sich 1 µg RNA im Ansatz befanden. Mit nuklease-freiem Wasser wurde der Reaktionsansatz auf 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Mastermixes für einen Ansatz

| Komponente | Volumen (µl) |
|----------------------------------|--------------|
| MgCl-Lösung (25 µM) | 4 |
| Reverse Transcription Puffer 10x | 2 |
| dNTP-Mix (10mM) | 2 |
| RNasin | 0,5 |
| AMV Reverse Transkriptase | 0,6 |
| Oligo dT-Primer | 1 |
| Gesamtvolumen | 10,1 |

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Reaktionsgefäße wurden dann in das PCR-Gerät gestellt. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

- 42 °C 15 min
- 95 °C 5 min
- 3 °C 5 min

Nach Ablauf der cDNA-Synthese wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.3.3 Western Blot

Geräte und Chemikalien

Western-Blot-System: Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München, 170-3930)

Spannungsquelle (siehe 2.2.5)

Filterpapier aus Cellulose (Herkunft unbekannt)

PVDF-Membran ProBlot (ABI, Foster City USA)

Transferpuffer

10 mM NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, 1106323)

3 mM Na₂CO₃ (siehe 2.1.2)

0,025 % SDS (siehe 2.2.5)

Methanol (siehe 2.2.7)

Beim Western Blot werden die Proteine aus einem SDS-Gel oder einem nativen Gel auf eine Trägermembran übertragen. Als Trägermembranen dienen zumeist Membranen aus PVDF (Polyvinylidenfluorid), Nylon oder Nitrocellulose. Je nach Art der Pufferzufuhr unterscheidet man zwischen semi-dry-Blotting und Tank-Blotting (Abb. 2.4).

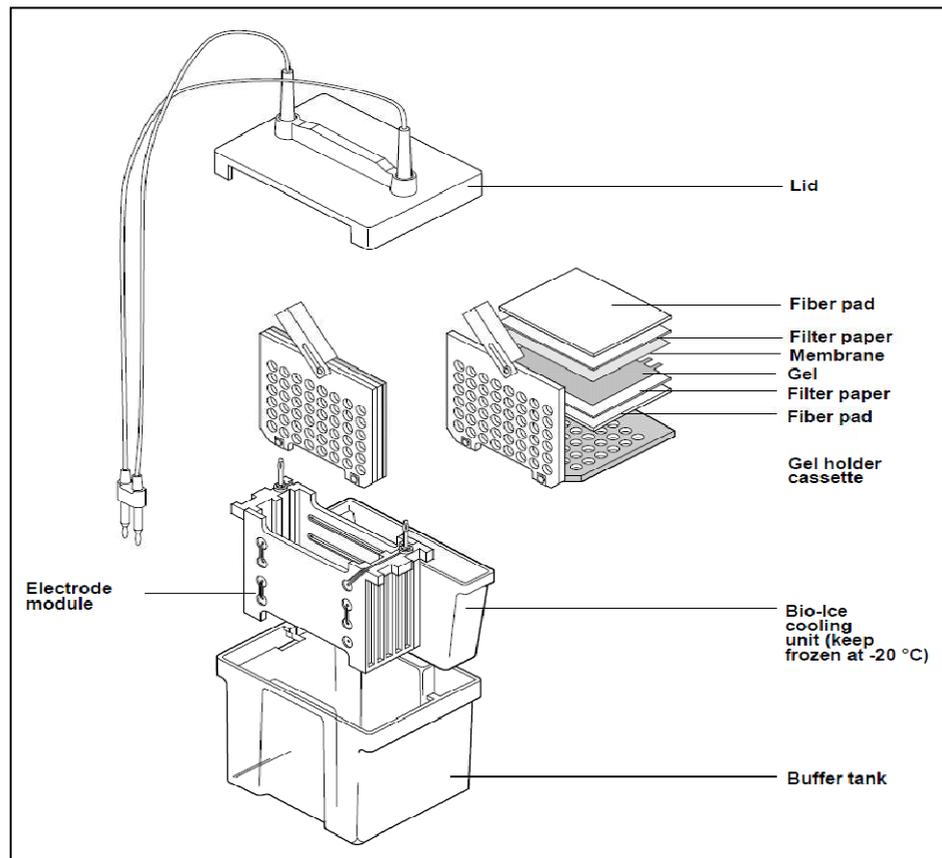


Abb. 2.4: Aufbau eines Tankblots (Quelle: Instruction Manual, Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad)

Durchführung

Die SDS-Gele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung kurz mit A. dem gewaschen und für 30 min im Transfer-Puffer vorinkubiert. Vier dicke Lagen und vier dünne Lagen Filterpapier wurden ebenfalls 30 min im gleichen Puffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde zunächst kurz in reinem Methanol aktiviert und dann im Transfer-Puffer vorinkubiert. Anschließend wurden zwei dicke Lagen und zwei dünne Lagen des Filterpapiers auf die Blot-Kassette gelegt. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasröhrchen entfernt. Nun wurde das Gel mittig auf das oberste Filterpapier gelegt und die PVDF-Membran wiederum auf dem Gel platziert. Dann wurden wieder zwei dünne und zwei dicke Filterpapiere aufgelegt und Luftblasen wie oben beschrieben entfernt. Die Blot-Kassette wurde geschlossen und in die Blot-Kammer gehängt. Die Kammer wurde mit einer Kühleinheit bestückt und mit vorgekühltem Transfer-Puffer aufgefüllt. Die mit einem Rührstäbchen versehene Kammer wurde nun geschlossen und auf einen Magnetrührer gestellt. Es wurde eine Spannung von 35 V angelegt und eine Stromstärke von 120 mA eingestellt. Die

Transferzeit betrug 2 Stunden und 45 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran kurz in A. dem gewaschen und in reinem Methanol geschwenkt. Die Membran wurde danach für etwa 30 min in Coomassie-Färbelösung (siehe 2.2.7) gelegt, kurz in reinem Methanol entfärbt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Das Gel wurde ebenfalls mit Coomassie angefärbt, um den Erfolg des Transfers überprüfen zu können.

2.3.4 N-terminale Sequenzierung

Geräte und Chemikalien

Sequenziersystem: Procise Edman Sequencer Model 491 mit online ABI PTH AminoAcid Analyser Model 140C (Applied Biosystems)

Probenvorbereitung

Die angefärbten Protein-Banden wurden nach dem Western Blot (siehe 2.3.3) vorsichtig mit einem sterilen Skalpell aus der getrockneten PVDF-Membran ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde mit Parafilm umwickelt und bis zum Versand im Kühlschrank gelagert. Der Transport erfolgte bei Raumtemperatur.

Analyse

Die N-terminale Sequenzierung wurde von der Firma Proteome Factory AG in Berlin durchgeführt. Diese setzte laut eigenen Angaben für die N-terminale Proteinsequenzierung einen Applied Biosystems Model 491 Procise Edman Sequencer mit online ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyser ein. Die Sequenzierung verläuft nach dem von Edman (1949) entwickelten Verfahren. Zunächst wird dabei unter alkalischen Bedingungen die freie Aminosäure am N-Terminus mit PITC (Phenylisothiocyanat) markiert. Unter sauren Bedingungen erfolgt dann die Abspaltung dieser PTC-markierten Aminosäure vom Restpeptid getrennt. Die PTH-Aminosäure wird über ein chromatographisches Verfahren aufgetrennt und identifiziert. Der Edman-Zyklus wird mit dem Restpeptid mehrmals wiederholt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorversuche

3.1.1 Relative Enzymaktivitäten und pH-Profile

Es wurden zunächst die Enzymaktivitäten in den Magenflüssigkeiten und in den Mitteldarmdrüsenextrakten der drei Dekapoden-Arten bestimmt. Die Aktivitäten wurden bei verschiedenen pH-Werten bestimmt (siehe 2.1.2). Der jeweils höchste Wert wurde als 100 % gesetzt und die anderen Werte wurden auf diesen Wert bezogen.

Beim Flusskrebs *Astacus leptodactylus* wurde bei allen eingesetzten Substraten eine deutliche Enzymaktivität gemessen, wobei diese sowohl in der Magenflüssigkeit als auch im Mitteldarmdrüsenextrakt bei pH 8 am höchsten war (Abb. 3.1 und Abb. 3.2).

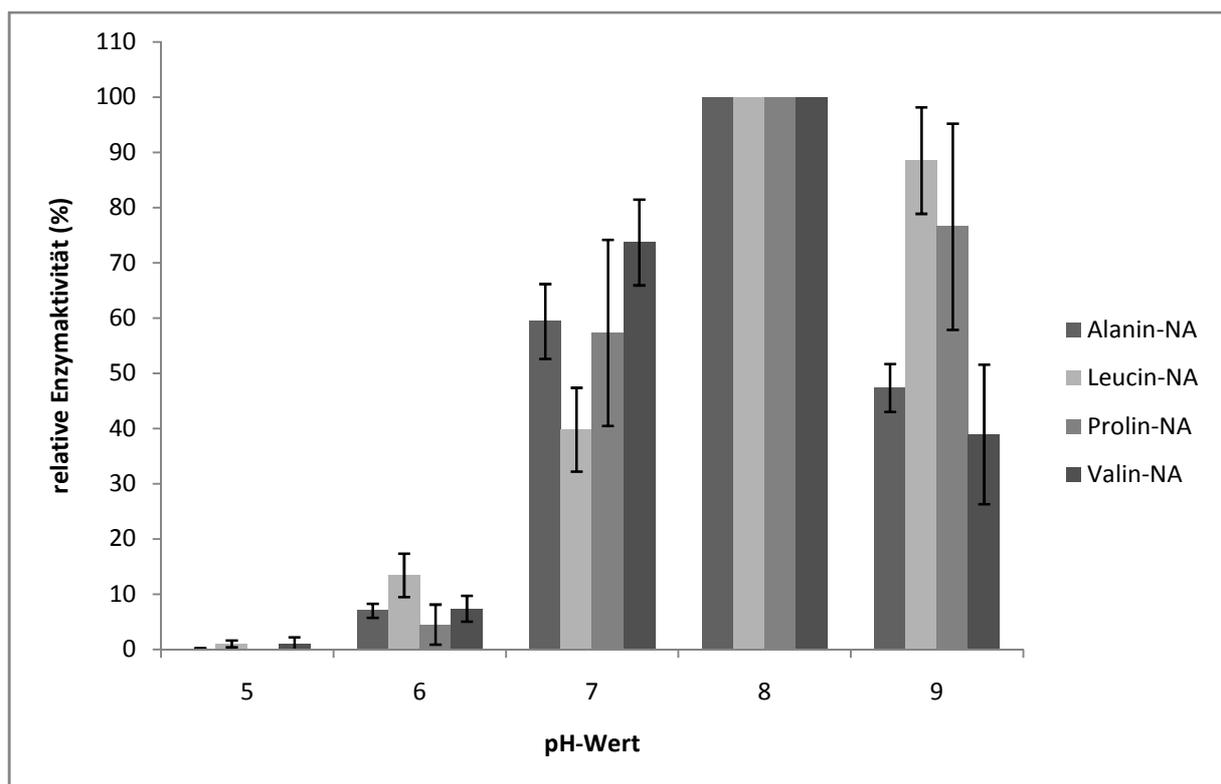


Abb. 3.1: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* bei verschiedenen pH-Werten (MW \pm Stabw., n = 5).

3 ERGEBNISSE

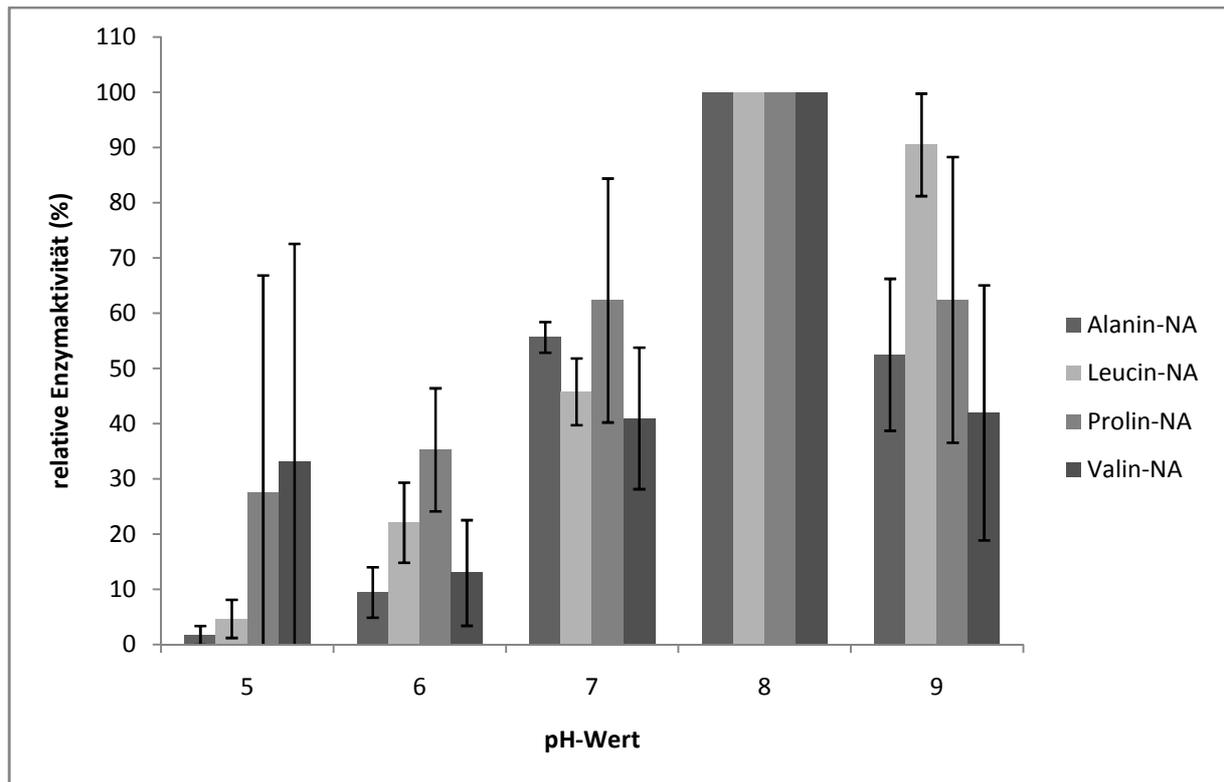


Abb. 3.2: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten im Mitteldarmdrüsenextrakt von *A. leptodactylus* bei verschiedenen pH-Werten (MW \pm Stabw., n = 5)

Beim Amerikanischen Hummer, *Homarus americanus*, wurde in der Magenflüssigkeit der Umsatz der Substrate Ala-NA und Leu-NA nachgewiesen. Die Substrate Pro-NA und Val-NA wurden nicht umgesetzt. Der Umsatz des Substrates Ala-NA war im Bereich von pH 5 bis pH 8 in etwa gleich hoch. Er fiel bei pH 9 jedoch stark ab. Bei Messungen mit dem Substrat Leu-NA begann dieser drastische Abfall der Aktivität bereits bei pH 7 (Abb. 3.3). Bei pH 8 war nur noch 10 % der maximalen Aktivität vorhanden und bei pH 9 fand kein Umsatz des Substrates statt.

Im Mitteldarmdrüsenextrakt des Hummers wurde nur Aktivität mit dem Substrat Ala-NA gemessen. Hier wurde die höchste Aktivität bei pH 5 gemessen (Abb. 3.4). Die Substrate Pro-NA, Val-NA und Leu-NA wurden nicht umgesetzt.

3 ERGEBNISSE

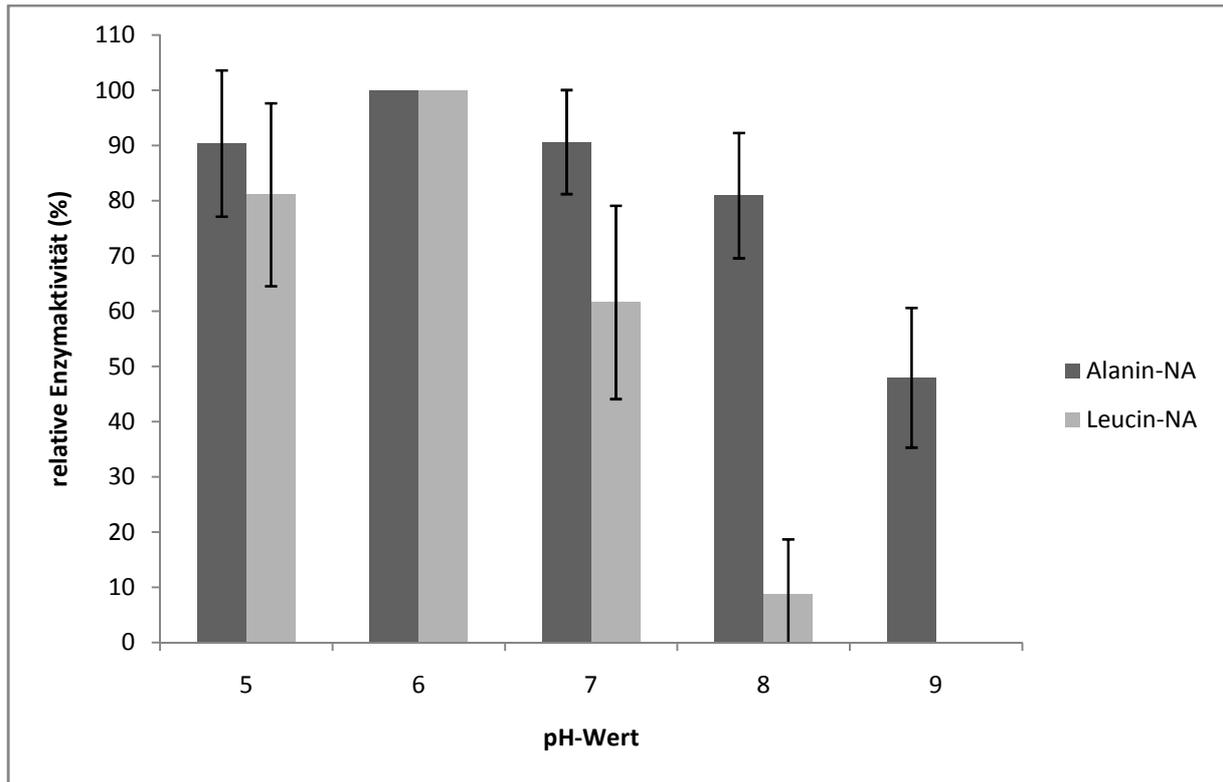


Abb. 3.3: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten in der Magenflüssigkeit von *H. americanus* bei verschiedenen pH-Werten (MW \pm Stabw., n = 4)

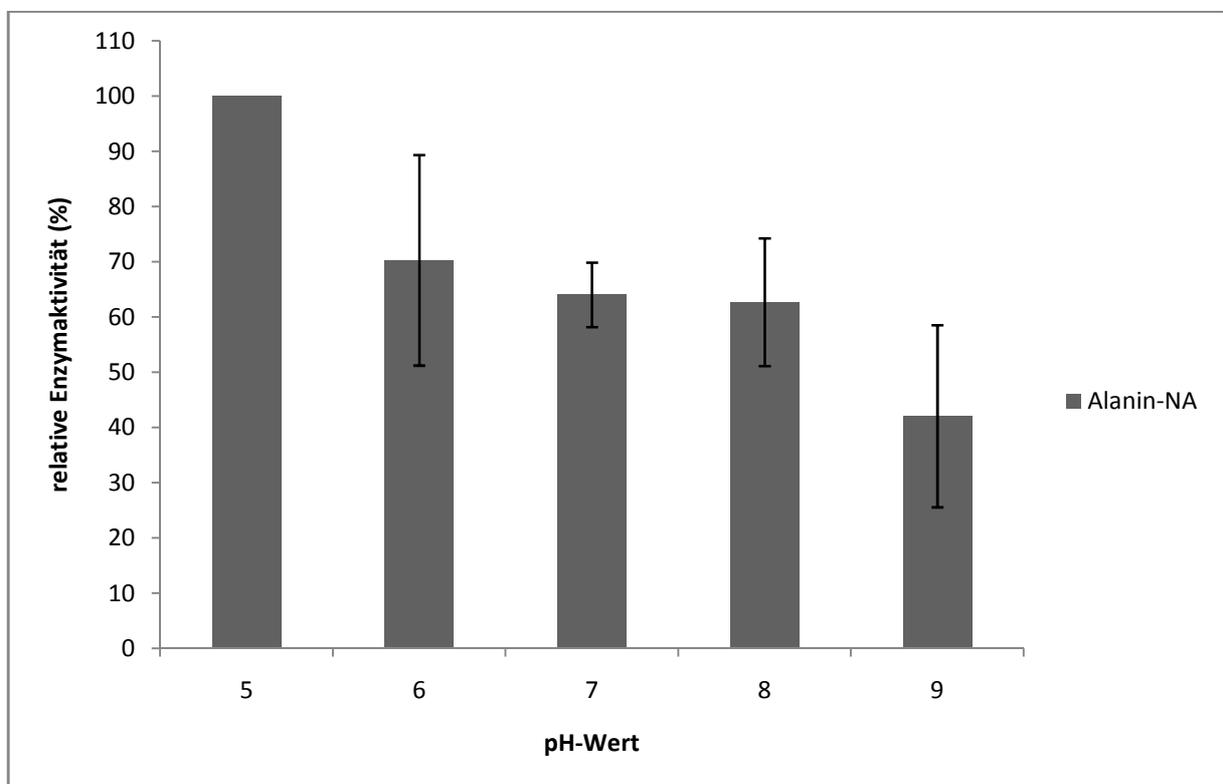


Abb. 3.4: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten im Mitteldarmdrüsenextrakt von *H. americanus* bei verschiedenen pH-Werten, (MW \pm Stabw., n = 3)

3 ERGEBNISSE

Beim Taschenkrebs *Cancer pagurus* wurde die Peptidase-Aktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA gemessen. In der Magenflüssigkeit waren die Enzymaktivitäten bei pH 6 am höchsten. Von pH 5 auf pH 6 stieg der Umsatz von Alanin-NA von 40 % auf 100 % an. Der Umsatz von Leucin-NA erhöhte sich sogar von ca. 10 % bei pH 5 auf 100 % bei pH 6. Bei höheren pH-Werten von pH 7 bis pH 9 verringerte sich der Umsatz beider Substrate kontinuierlich (Abb. 3.5). Die Substrate Pro-NA und Val-NA wurden nicht umgesetzt.

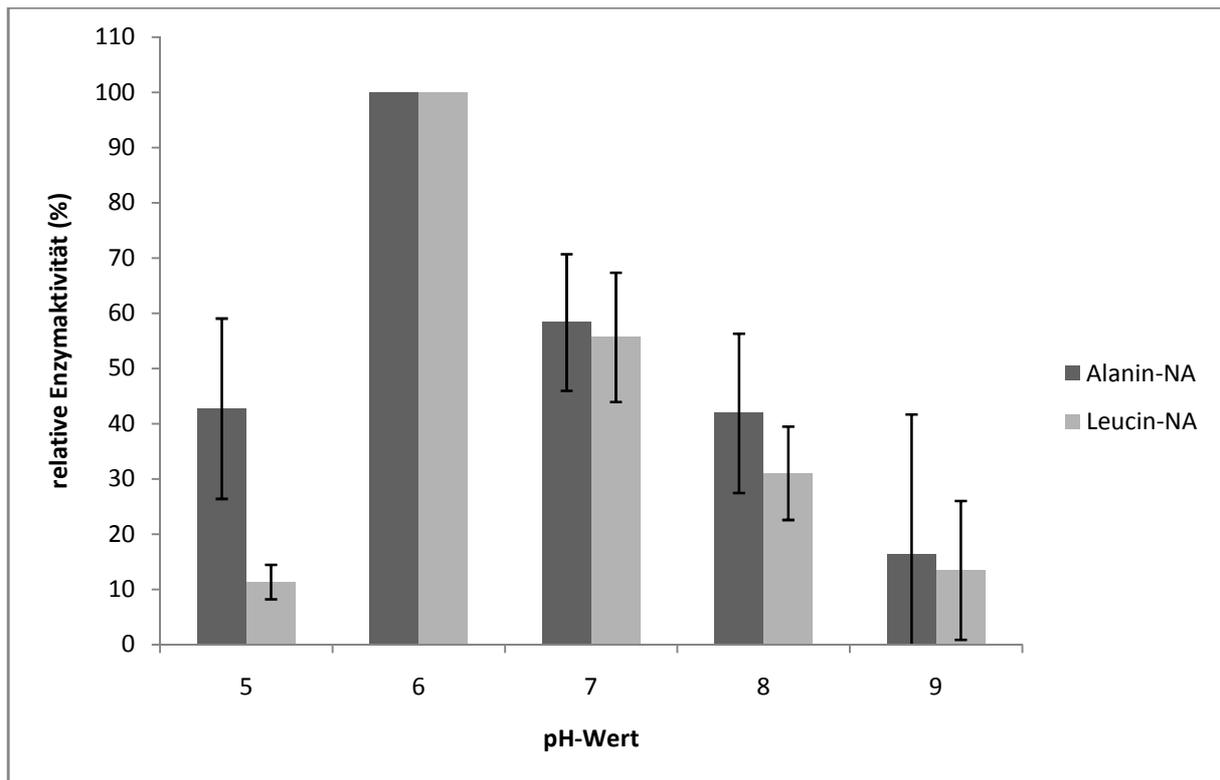


Abb. 3.5: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten in der Magenflüssigkeit von *C. pagurus* bei verschiedenen pH-Werten, (MW \pm Stabw., n = 4)

Im Mitteldarmdrüsenextrakt des Taschenkrebses wurde die höchste Enzymaktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA bei pH 5 gemessen (Abb. 3.6). Die Aktivitäten wiesen eine hohe Streuung auf. Die Substrate Val-NA und Pro-NA wurden nicht umgesetzt.

3 ERGEBNISSE

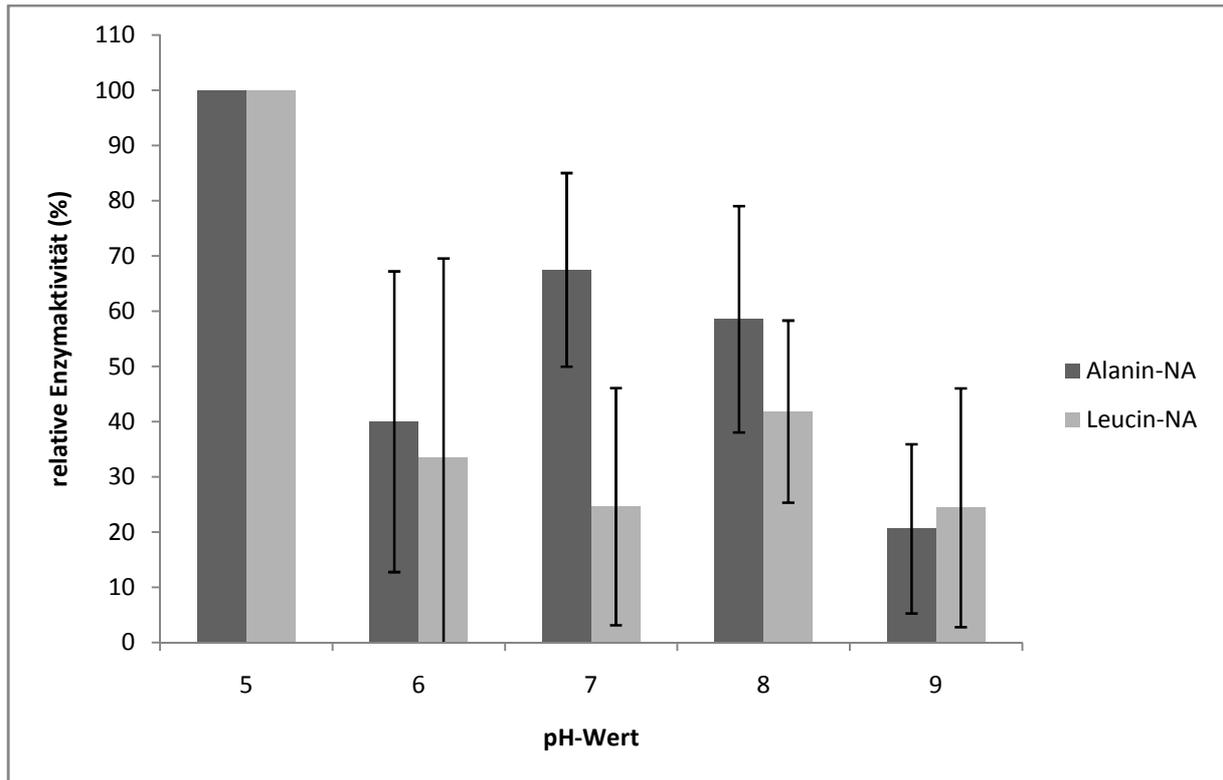


Abb. 3.6: Bestimmung der relativen Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten im Mitteldarmdrüsenextrakt von *C. pagurus* bei verschiedenen pH-Werten, (MW \pm Stabw., n = 4)

3.1.2 Absoluter Verlauf der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden wie folgt berechnet:

Formel 2: Berechnung der Enzymaktivität mit Nitroanilid (NA)-Substraten

$$A = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}} \times \varepsilon \times d}$$

| | |
|---------------------|--|
| A | Enzymaktivität (U·ml ⁻¹ Probe) |
| ΔE | Extinktionsänderung pro Zeiteinheit |
| ε | millimolarer Extinktionskoeffizient von 4-Nitroanilin ($\varepsilon_{405\text{nm}} = 10,2 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) |
| V_{gesamt} | Gesamtvolumen im Messansatz (L) |
| V_{Probe} | Volumen der eingesetzten Probe (L) |
| d | Schichtdicke der Küvette (cm) |

3 ERGEBNISSE

Durch Bestimmung der Proteingehalte (siehe 2.2.4) der gemessenen Proben konnte die spezifische Aktivität ermittelt werden. Für *A. leptodactylus* wurde die spezifische Aktivität bei pH 8 bestimmt, für *H. americanus* und *C. pagurus* bei pH 5. Mit Hilfe der Software „SigmaStat 3.5“ wurde zudem getestet, ob sich die Werte signifikant unterscheiden.

Bei *Astacus leptodactylus* wurden die höchsten Aktivitäten gemessen. Alle eingesetzten Substrate wurden umgesetzt. Mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA wurden die höchsten Aktivitäten gemessen. In den Magenflüssigkeiten wurden höhere Aktivitäten gemessen als in den Mitteldarmdrüsen (Abb. 3.7 und Abb. 3.8).

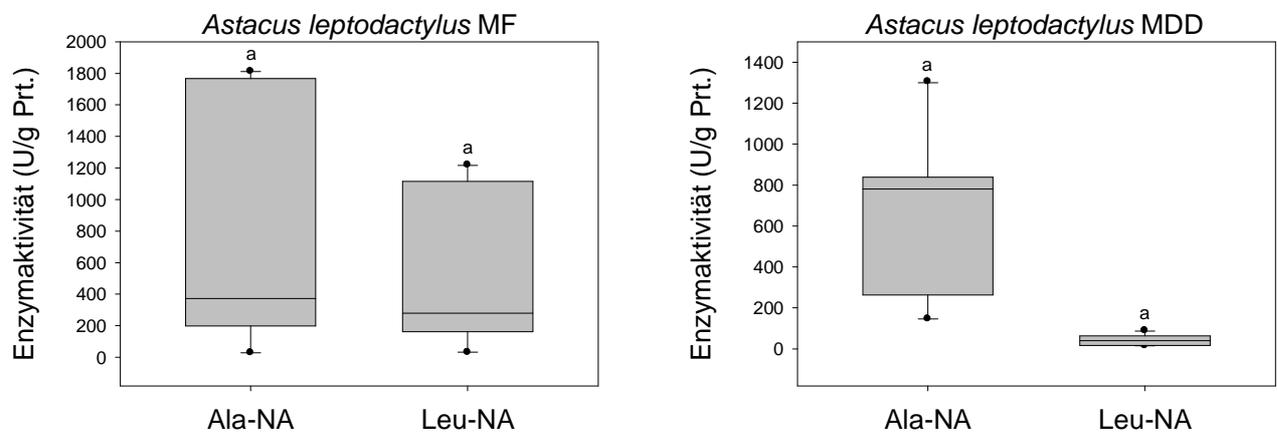


Abb. 3.7: Bestimmung der Enzymaktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA bei *A. leptodactylus* bei pH 8; Boxplot-Darstellung (MW \pm Stabw., n = 6). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz.

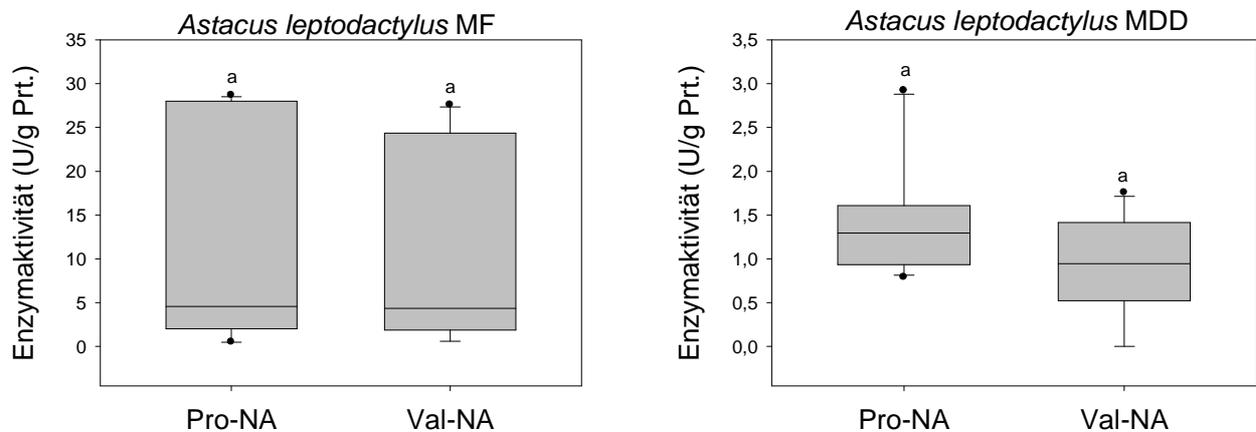


Abb. 3.8: Bestimmung der Enzymaktivität mit den Substraten Pro-NA und Val-NA bei *A. leptodactylus* bei pH 8, Boxplot-Darstellung (MW \pm Stabw., n = 6). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz.

3 ERGEBNISSE

Der Amerikanische Hummer wies geringere Aktivitäten auf als der Flusskrebis. Allerdings traten beim Hummer im Mitteldarmdrüsenextrakt höhere Aktivitäten auf als in der Magenflüssigkeit. Es konnten nur Aktivitäten mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA gemessen werden. Die spezifische Aktivität in der Magenflüssigkeit unterschied sich signifikant von der spezifischen Aktivität in Extrakten der Mitteldarmdrüse (Abb. 3.9).

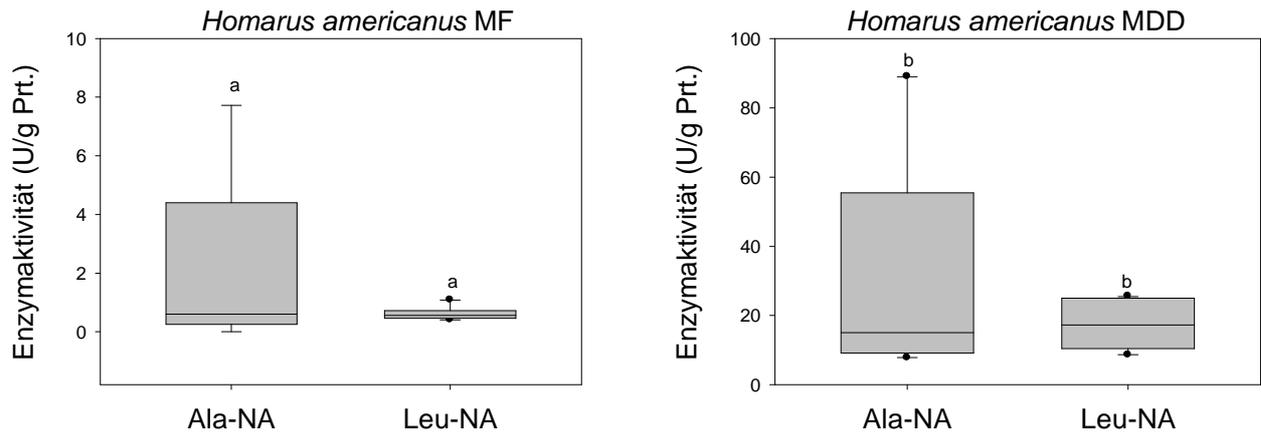


Abb. 3.9: Bestimmung der Enzymaktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA bei *H. americanus* bei pH 5. Boxplot-Darstellung (MW \pm Stabw., n = 5). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz.

Die Taschenkrebse wiesen die wenigsten Aktivitäten auf. Auch hier waren die Aktivitäten im Mitteldarmdrüsenextrakt höher als in der Magenflüssigkeit und es konnte nur Aktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA gemessen werden. Es wurde Signifikanz festgestellt (Abb. 3.10).

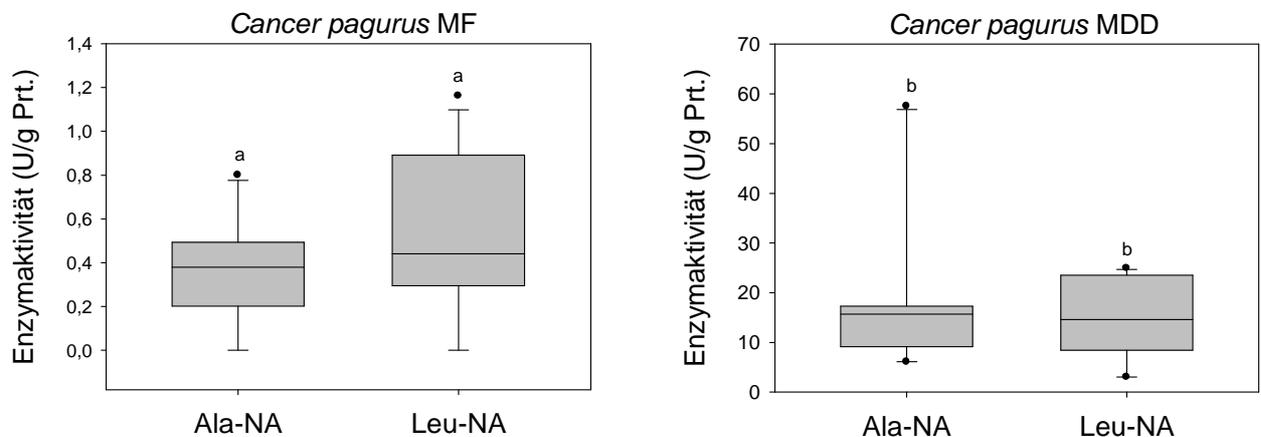


Abb. 3.10: Bestimmung der Enzymaktivität mit den Substraten Ala-NA und Leu-NA bei *C. pagurus* bei pH 5. Boxplot-Darstellung (MW \pm Stabw., n = 6). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz.

3.1.3 Verhältnis der Enzymaktivität

Es wurde die spezifische Aktivität in der Magenflüssigkeit mit der spezifischen Aktivität im Mitteldarmdrüsenextrakt (siehe 3.1.2) verglichen. Dazu wurden die Quotienten aus mehreren Proben berechnet.

Beim Hummer und beim Taschenkrebs waren die gemessenen Aktivitäten jeweils im Mitteldarmdrüsenextrakt höher als in der Magenflüssigkeit (Abb. 3.11).

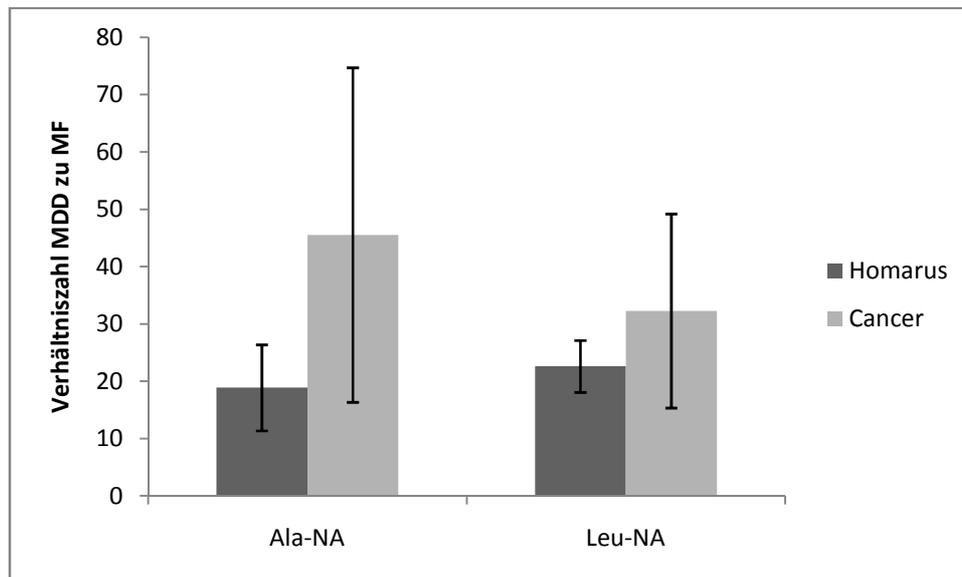


Abb. 3.11: Verhältnis des Substratumsatzes von Nitroanilid (NA)-Substraten in Magenflüssigkeit und Mitteldarmdrüsenextrakt bei *Homarus americanus* und *Cancer pagurus*, (MW ± Stabw., n = 5)

3 ERGEBNISSE

Beim Flusskrebbs war die Aktivität bei drei Substraten in der Magenflüssigkeit höher als im Extrakt der Mitteldarmdrüse, beim Substrat Ala-NA war es allerdings umgekehrt (Abb. 3.12).

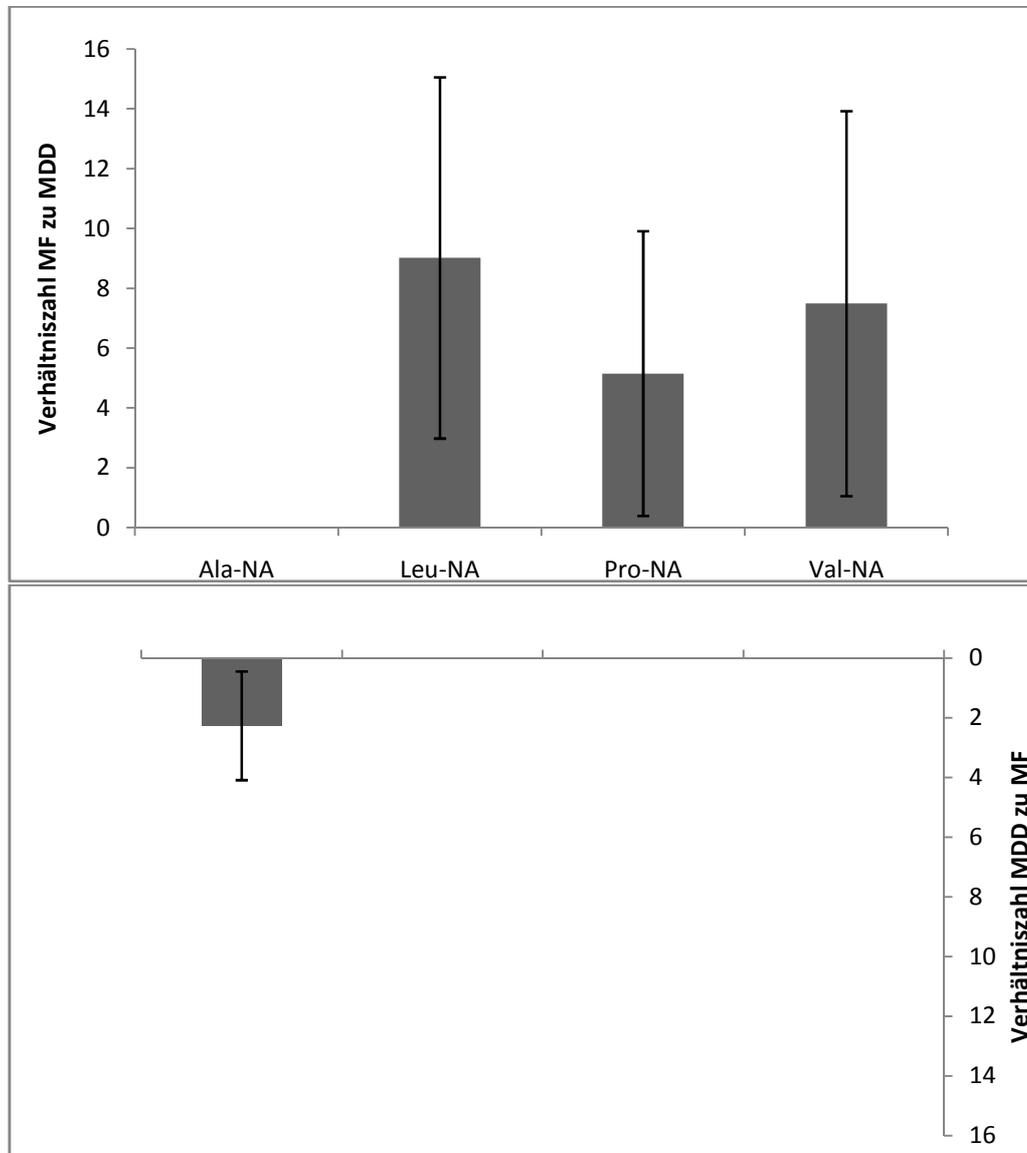


Abb. 3.12: Verhältnis des Substratumsatzes von Nitroanilid (NA)-Substraten in Magenflüssigkeit und Mitteldarmdrüsenextrakt bei *Astacus leptodactylus* (MW ± Stabw., n = 6)

3.2 Bestimmung der Enzymkinetik in der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus*

Die Michaeliskonstante (K_M) repräsentiert diejenige Substratkonzentration, bei welcher die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Die K_M -Werte wurden mit Hilfe der Software „GraphPad Prism“ ermittelt. Grafisch wurde sowohl die

3 ERGEBNISSE

relative Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis zur Substratkonzentration als auch die Transformation nach Eadie und Hofstee (Dombi 1992) dargestellt. Bei der Eadie-Hofstee-Transformation wird der Faktor aus der relativen Enzymaktivität (%) und der Substratkonzentration (μM) gegen die relative Enzymaktivität in (%) aufgetragen. Der Kehrwert der Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem K_M -Wert. Die niedrigen Werte wurden bei der Eadie-Hofstee-Darstellung nicht berücksichtigt.

Gemessen wurde die Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus* mit dem Substrat Ala-NA. Der Kurvenlauf entsprach dem typischen Verlauf der Kinetik nach Michaelis und Menten (1913; Abb. 3.13). Nach Eadie-Hofstee betrug der K_M -Wert $619,8 \mu\text{M}$. Die Software errechnete einen K_M -Wert von $609 \mu\text{M}$.

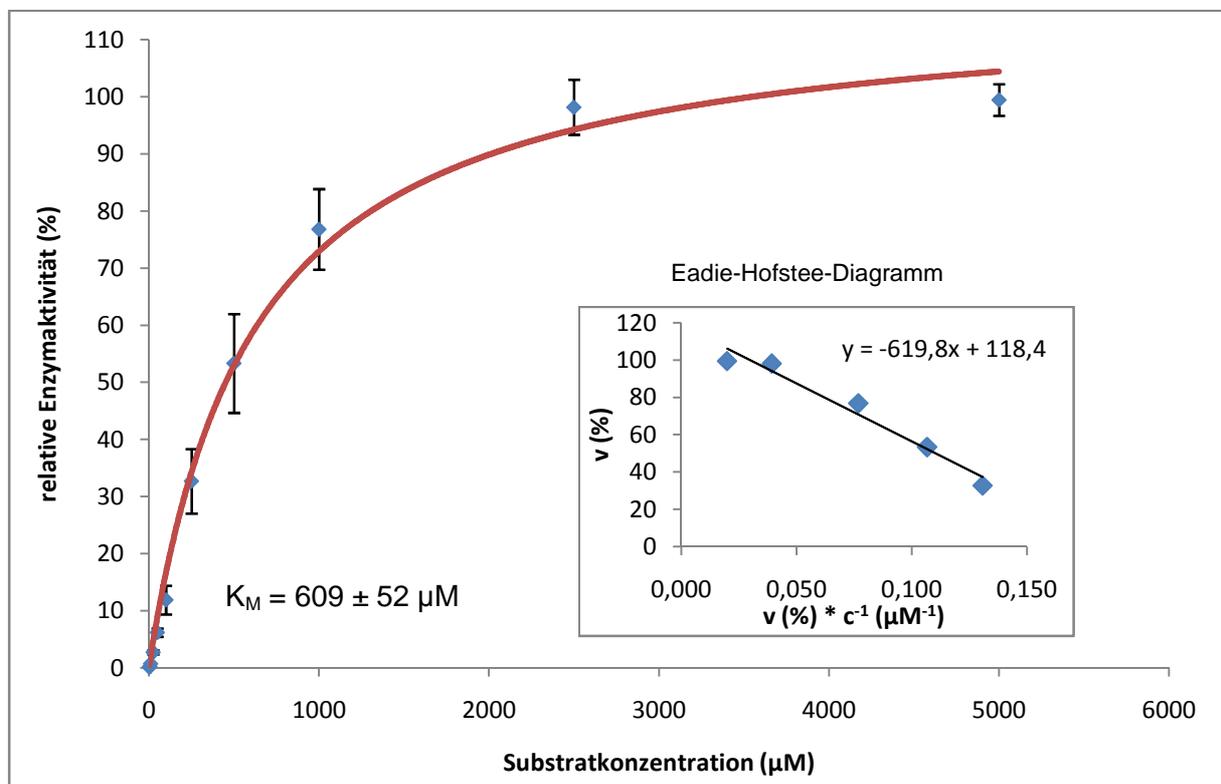


Abb. 3.13: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* mit dem Substrat Ala-NA (MW \pm Stabw., $n=3$)

3 ERGEBNISSE

Außerdem wurde die Aminopeptidase-Aktivität mit dem Substrat Leu-NA gemessen. Auch hier zeigte sich der typische Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.14). Mit der Software „GraphPad Prism“ wurde ein K_M -Wert von $183 \mu\text{M}$ mit errechnet und nach Eadie und Hofstee ein K_M -Wert von $204,7 \mu\text{M}$.

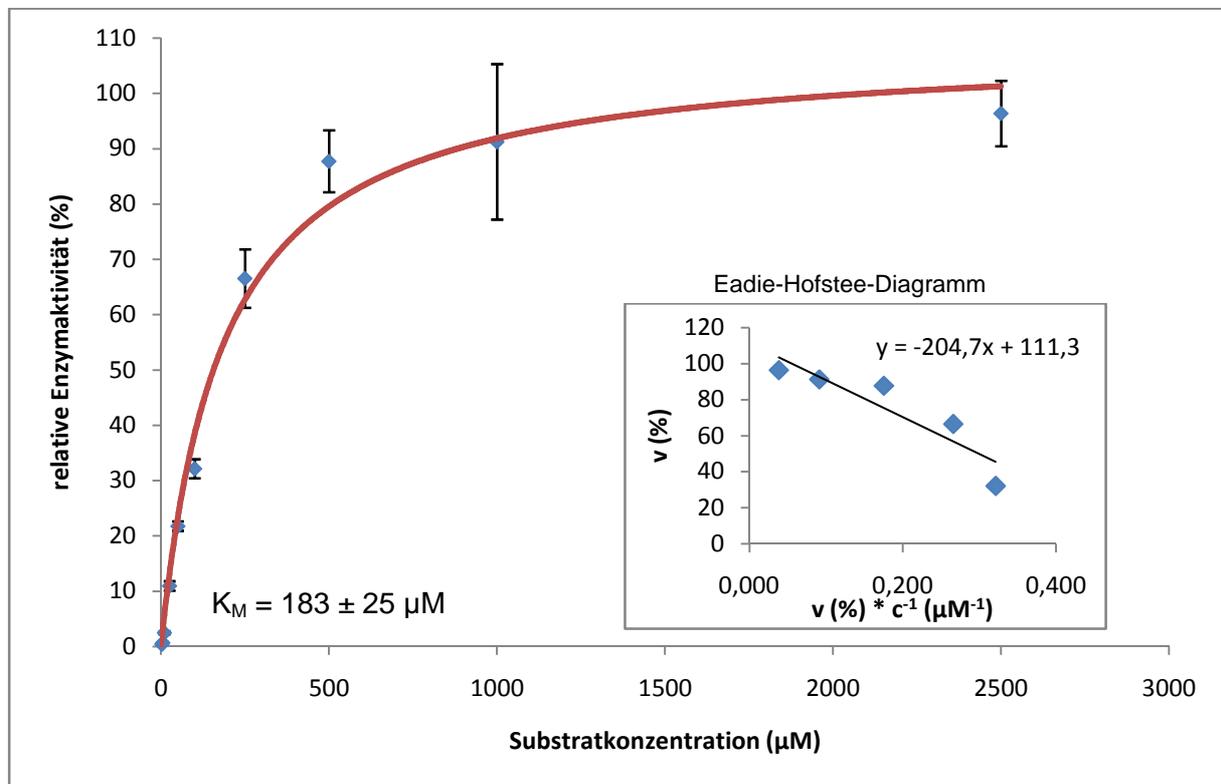


Abb. 3.14: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* mit dem Substrat Leu-NA (MW \pm Stabw., n=3)

3 ERGEBNISSE

Mit dem Substrat Val-NA zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei Ala-NA und Leu-NA (Abb. 3.15). Die Michaeliskonstante K_M betrug $1972 \mu\text{M}$ nach Eadie und Hofstee und $2292 \mu\text{M}$ nach Berechnung mit der Software.

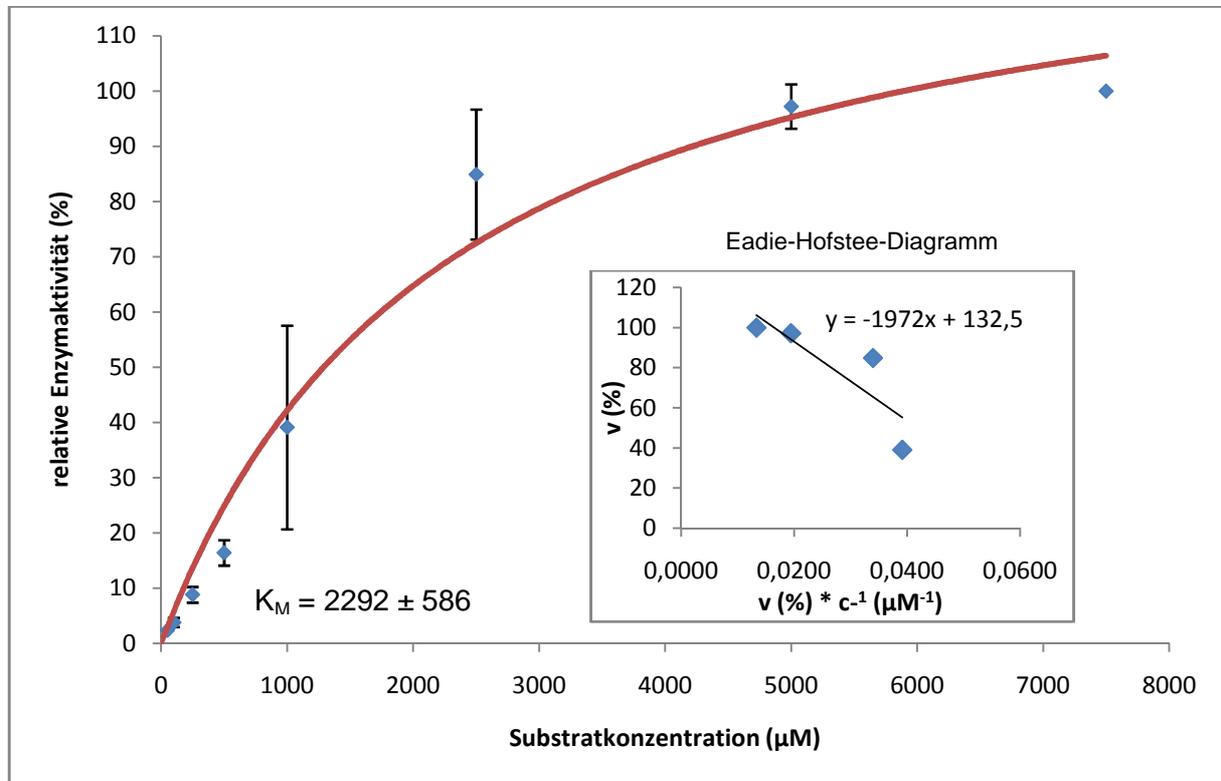


Abb. 3.15: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* mit dem Substrat Val-NA, (MW \pm Stabw., n = 3)

Mit dem Substrat Leu-NA war der K_M -Wert am niedrigsten. Das bedeutet, dass die Affinität zwischen Enzym und Substrat hier am höchsten war. Beim Einsatz von Ala-NA war der K_M -Wert etwas größer. Mit Val-NA als Substrat war der K_M -Wert am größten, was bedeutet, dass Enzym und dieses Substrat die geringste Affinität zueinander hatten.

Die von der Software „GraphPad Prism“ ermittelten K_M -Werte unterschieden sich nur geringfügig von denen, die nach Eadie-Hofstee ermittelt wurden.

3.3 Chromatographische Auftrennung und Charakterisierung der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus*

3.3.1 Anionenaustauscherchromatographie über die Uno Q6R-Säule

Die Magenflüssigkeitsproben wurden zunächst über Sephadex G 25 vorgereinigt und dann auf die UNO Q6R-Säule aufgetragen (siehe 2.2.1). Die höchsten Enzymaktivitäten traten in den Fraktionen 35 bis 37 bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 M auf. Der Proteingehalt war in diesen Fraktionen gering und stieg erst in den Fraktionen 40 bis 50 deutlich an (Abb. 3.16).

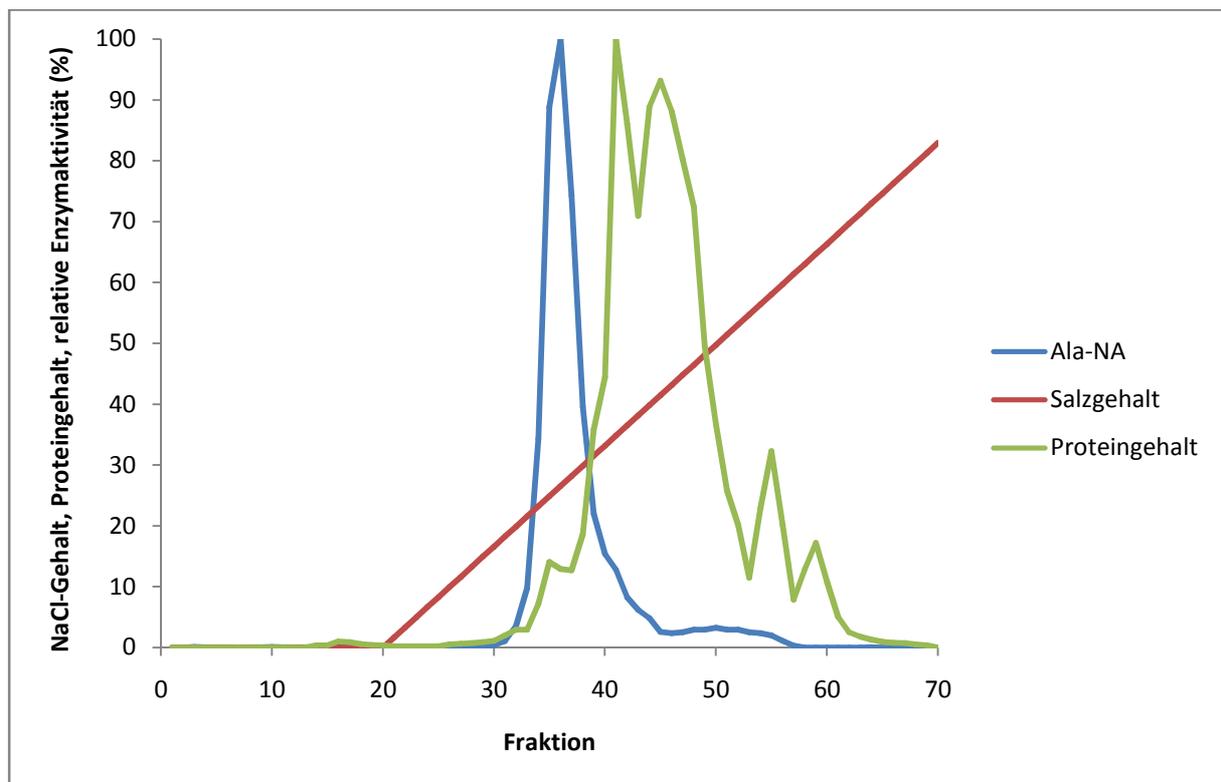


Abb. 3.16: Elutionsprofil des FPLC-Laufs mit Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* über die Anionenaustauschersäule Uno Q6R

3.3.2 Anionenaustauscherchromatographie über die Resource Q-Säule

Die Fraktionen 35 bis 37 wurden für den zweiten FPLC-Lauf über eine Resource Q-Säule verwendet (siehe 3.3.1). In diesem Lauf zeigte sich ebenfalls die höchste Aktivität in den Fraktionen 35 bis 37. Der NaCl-Gehalt betrug etwa 0,24 M. Auch bei diesem Lauf konnte weiteres Fremdprotein von dem aufzureinigenden Enzym erfolgreich abgetrennt werden (Abb. 3.17).

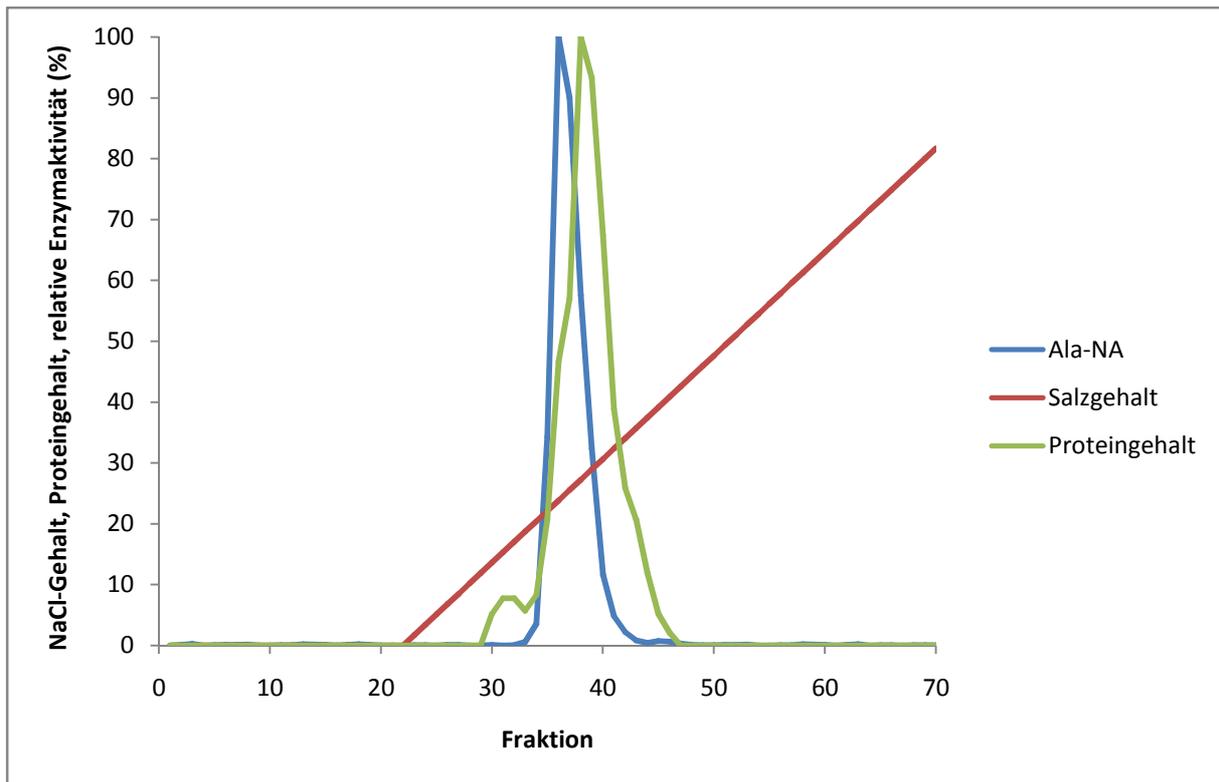


Abb. 3.17: Elutionsprofil des FPLC-Laufs mit Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* über die Anionenaustauschersäule Resource Q

3.3.3 Anreicherungsschema

Nach jedem Aufreinigungsschritt (siehe 2.2.1) wurde die spezifische Aktivität bestimmt (vgl. 2.2.4 und 2.2.11, Messtemperatur 30 °C). Der Proteingehalt der Probe verringerte sich nach jedem Schritt. Die spezifische Aktivität erhöhte sich dagegen. Lediglich der letzte Schritt, die Einengung der Proteinprobe (siehe 2.2.2), führte zu einer deutlichen Verringerung der spezifischen Aktivität und folglich auch zu einer Verringerung der Anreicherung und der Ausbeute (Tabelle 3.1).

3 ERGEBNISSE

Tabelle 3.1: Beispiel eines Anreicherungsschemas des aufgereinigten Enzyms aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

| Reinigungs-schritt | V (ml) | Aktivität (U/ml) | Gesamt-aktivität (U) | Protein-gehalt Bradford (mg/ml) | spez. Aktivität (U/mg Protein) | An-reiche-rungs-faktor | Aus-beute (%) |
|-------------------------------|--------|------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------|
| Rohextrakt | 0,5 | 10,343 | 5,172 | 10,6540 | 0,97 | 1,0 | 100 |
| Gelfiltration | 1 | 5,221 | 5,221 | 5,5790 | 0,94 | 1,0 | 100 |
| Uno Q6R | 1,5 | 0,814 | 1,221 | 0,0114 | 71,63 | 73,8 | 23,6 |
| Resource Q | 2,5 | 0,213 | 0,533 | 0,0017 | 122,55 | 126,2 | 10,3 |
| Einengung/ Ultrafiltration | 0,6 | 0,583 | 0,350 | 0,0245 | 23,79 | 24,5 | 6,8 |

Insgesamt wurden drei Aufreinigungsabläufe dokumentiert. Der Aufreinigungserfolg variierte deutlich zwischen den Proben. Nach der Anionentauscherchromatographie über die Resource Q-Säule wurden Anreicherungen von 31-fach bis 177-fach erreicht mit Ausbeuten von 10 bis 26 %. Bei jeder Probe wirkte sich die Einengung durch Ultrafiltration negativ auf die spezifische Aktivität aus.

3.3.4 Aktivitätsgel

Das in fluorogener Substratlösung inkubierte Gel (siehe 2.2.6) zeigte im Rohextrakt und nach der Gelfiltration über Sephadex G 25 zwei deutlich voneinander getrennte aktive Banden. Nach der weiteren Aufreinigung über Ionentauscher und nach Ultrafiltration war hingegen nur noch eine aktive Bande vorhanden. Die relative Position (apparenter R_f -Wert) wurde bestimmt, indem die gesamte Höhe des Gels vermessen wurde und die relative Laufstrecke der aktiven Bande in Relation zur Gesamthöhe berechnet wurde (Abb. 1). Der apparente R_f -Wert für die aktive Aminopeptidase-Bande betrug 0,29.

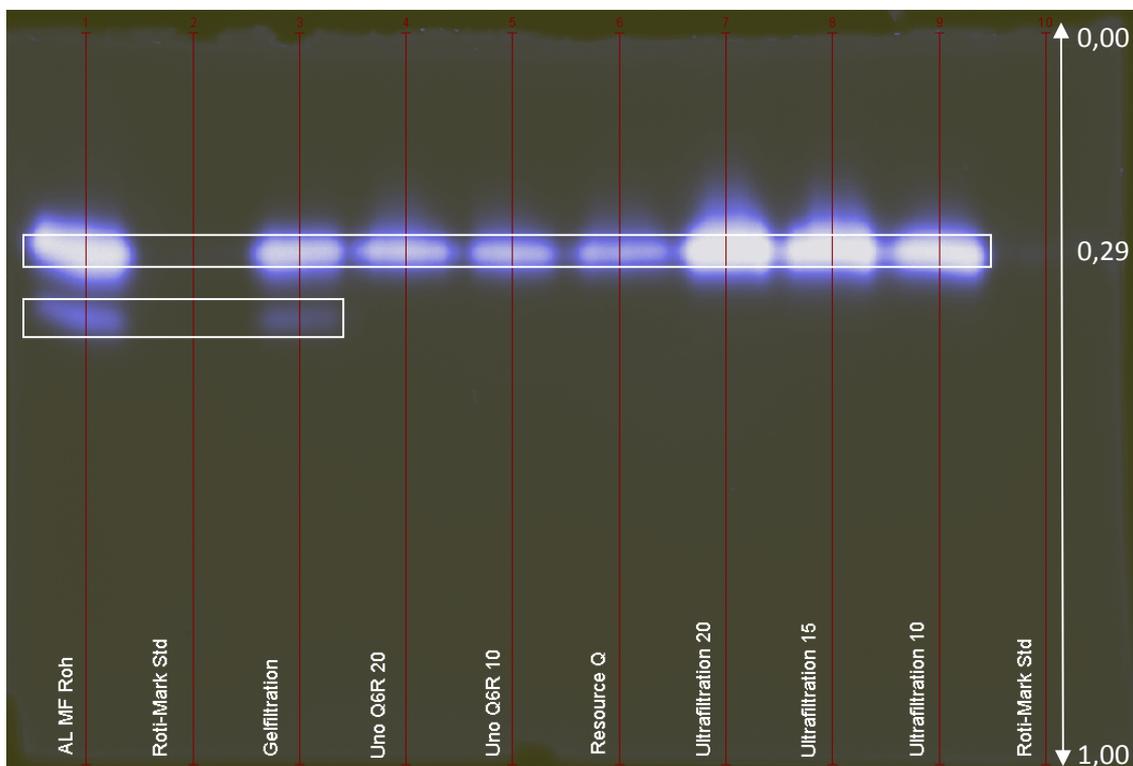


Abb. 3.18: Aktivitätsgel von *Astacus*-Proben mit Ala-AMC als Substrat. Bahn 1: Rohextrakt; 2 und 10 Standards, Bahn 3: Sephadex G 25-Probe, 4 und 5: Uno Q6R-Proben, Bahn 6: Resource Q-Probe, 7 bis 9 Ultrafiltrations-Proben

Das Gel wurde anschließend mit Coomassie angefärbt (siehe 2.2.7). Auf der Höhe, auf der im Aktivitätsgel die fluoreszierenden Banden zu sehen waren, konnten teilweise schwache Proteinbanden erkannt werden. Bei einigen Proben war der Proteingehalt jedoch zu gering und die Banden deshalb zu schwach (Abb. 3.19).

3 ERGEBNISSE

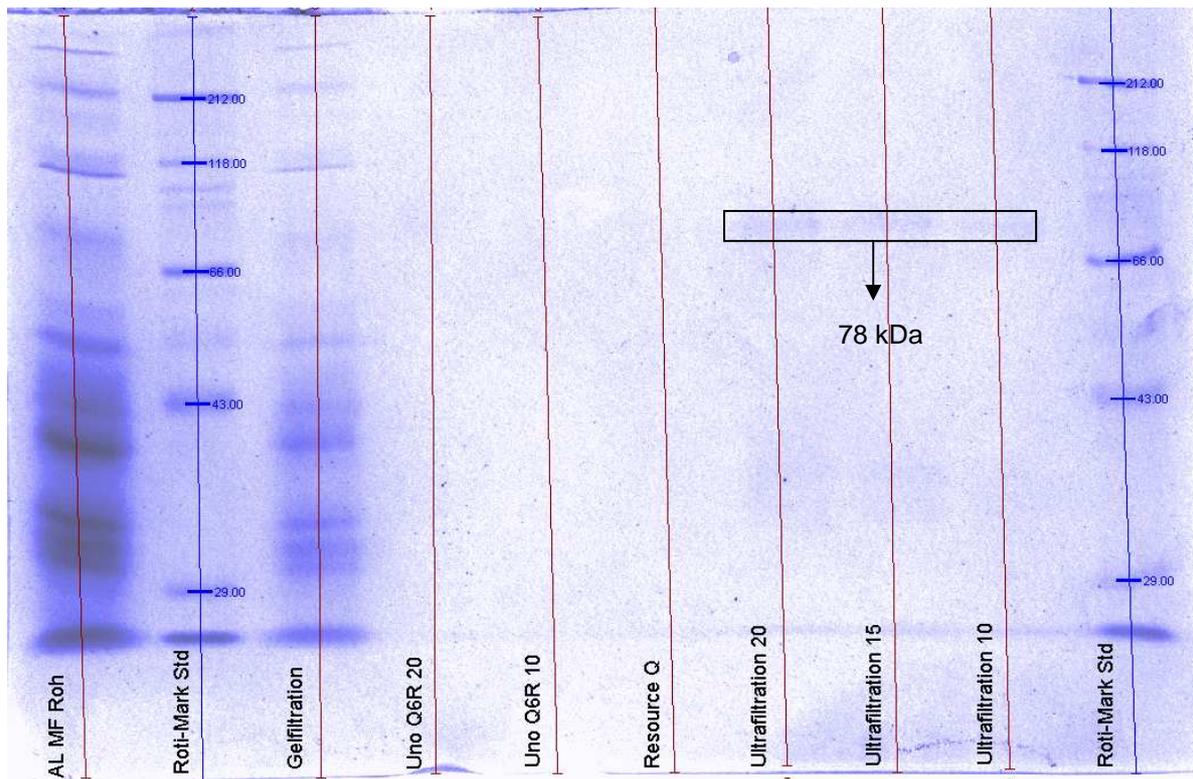


Abb. 3.19: Mit Coomassie R-250 angefärbtes Aktivitätsgel von *Astacus*-Proben. Bahn 1: Rohextrakt; 2 und 10 Standards; Bahn 3: Sephadex G 25-Probe; 4 und 5: Uno Q6R-Proben; Bahn 6: Resource Q-Probe; 7 bis 9 Ultrafiltrations-Proben

Die Bestimmung der Molmasse erfolgte durch den Vergleich mit den Laufstrecken der Standards und wurde mit dem Programm „Quantity One“ von Bio-Rad durchgeführt. Die apparente Molmasse der nicht denaturierten Aminopeptidase betrug etwa 78 kDa.

3.3.5 Bestimmung der Molmasse mittels SDS-PAGE

Die Molmassenbestimmung der Aminopeptidase wurde mit einem 12 %-Gel durchgeführt (siehe 2.2.5). Es wurden drei unterschiedliche Proben gemessen. Hierbei handelte es sich um mittels FPLC aufgereinigte Proben aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*, die mittels Ultrafiltration aufkonzentriert wurden (siehe 2.2.2). Ein Teil jeder Probe wurde nativ aufgetragen, der andere wurde vorher denaturiert. Der Begriff „nativ“ ist in diesem Zusammenhang nicht ganz korrekt, denn die Probe erfährt durch den Zusatz von SDS im Probenpuffer eine leichte Denaturierung. Die native Probe wurde im gleichen Volumenverhältnis mit Probenpuffer verdünnt, die denaturierte mit dem gleichen Probenpuffer, dem

3 ERGEBNISSE

allerdings 5 % Mercaptoethanol zugesetzt waren (siehe 2.2.5). Diese Probe wurde zudem kurz aufgeköcht. Aufgetragen wurde jeweils 20 µl. Es wurden zwei unterschiedliche Molmassen-Standards eingesetzt; Roti-Mark und InsiteMarker. Aufgetragen wurde jeweils 8 µl des Standards (Abb. 3.20).

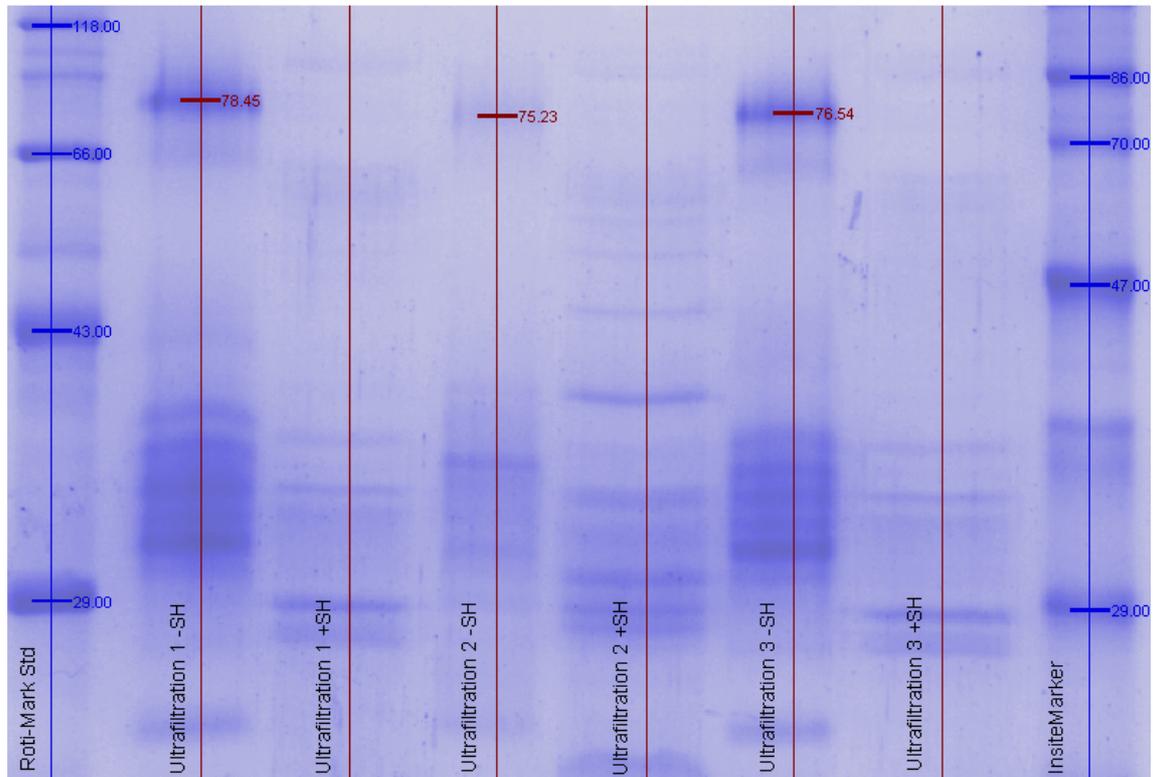


Abb. 3.20: Bestimmung der Molmasse. Vergleich zwischen nativen und denaturierten Proben. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie R-250. Bahn 1 und 8: Standards; Bahn 2, 4 und 6: native Proben; Bahn 3, 5 und 7: denaturierte Proben

Die nativen Proben zeigten mehrere Banden, wobei sich die Aminopeptidase-Banden im Bereich von 75 bis 78 kDa befanden. Die Lage dieser Bande wurde vorher mittels Aktivitätsgel (siehe Punkt 2.2.6) nachgewiesen. Die denaturierten Proben zeigten ein leicht verändertes Bandenmuster im Vergleich zu den nativen Proben. Wichtigster Unterschied war das Fehlen der aktiven Aminopeptidase-Bande bei den denaturierten Proben.

3.3.6 Bestimmung der Molmasse mittels Gelfiltration

Nach Injektion der Probe begann die Steuersoftware mit der Aufzeichnung des Chromatographielaufes. Daher konnten die Retentionszeiten exakt bestimmt werden und zudem musste für die Berechnung der Molmasse das Ausschlussvolumen der Trennsäule nicht bestimmt werden.

Zunächst wurde ein Gelfiltrations-Standard (siehe 2.2.8) injiziert, worauf die aufgereinigte Probe zweimal gemessen wurde. Schließlich wurde der Standard noch einmal zur Kontrolle eingesetzt. Der Standard enthielt folgende Komponenten (Tabelle 3.2):

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Gelfiltrationsstandards

| Komponente | Molekulargewicht (kDa) |
|-----------------------------|---------------------------|
| Thyroglobulin (bovine) | 670,00 |
| γ -Globulin (bovine) | 158,00 |
| Ovalbumin (chicken) | 44,00 |
| Myoglobin (horse) | 17,00 |
| Vitamin B ₁₂ | 1,35 |

Die Werte der Retentionszeit des Standards wurden gemittelt und gegen den Logarithmus der Molmasse der einzelnen Komponenten aufgetragen. Die Werte für die kleinste Komponente, Vitamin B₁₂, wichen deutlich von der ermittelten Regressionsgerade ab und wurden daher nicht in die Berechnung einbezogen (Abb. 3.21).

Nach Auftrennung der aufgereinigten Probe traten zwei Maxima mit einer Retentionszeit von etwa 10 min bzw. 12 min auf. Die Signalintensität des ersten Maximums entsprach dabei etwa einem Viertel der Intensität des zweiten Maximums. Der Verlauf des Elutionsprofils ist in Abb. 3.22 dargestellt.

3 ERGEBNISSE

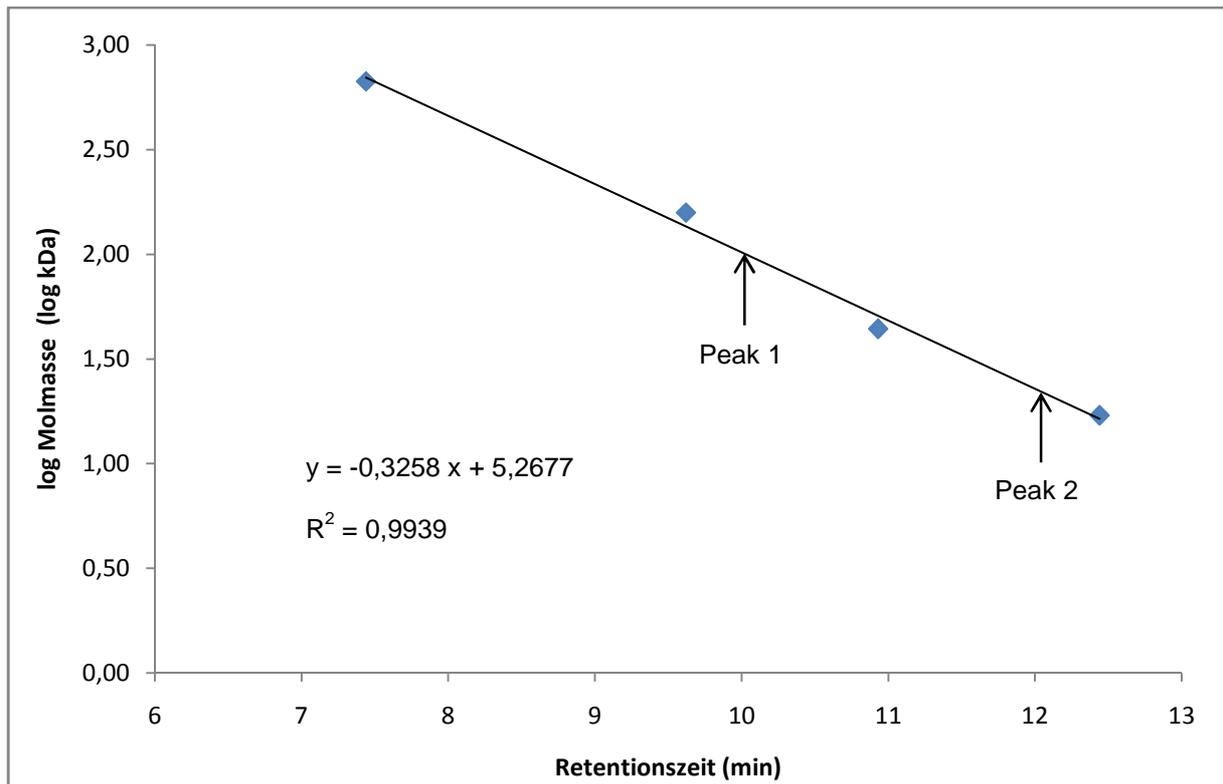


Abb. 3.21: Auftragung des Molmassen-Standards (log MW) gegen die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten. Mit den Pfeilen wurden die Retentionszeiten der aufgereinigten Probe markiert.

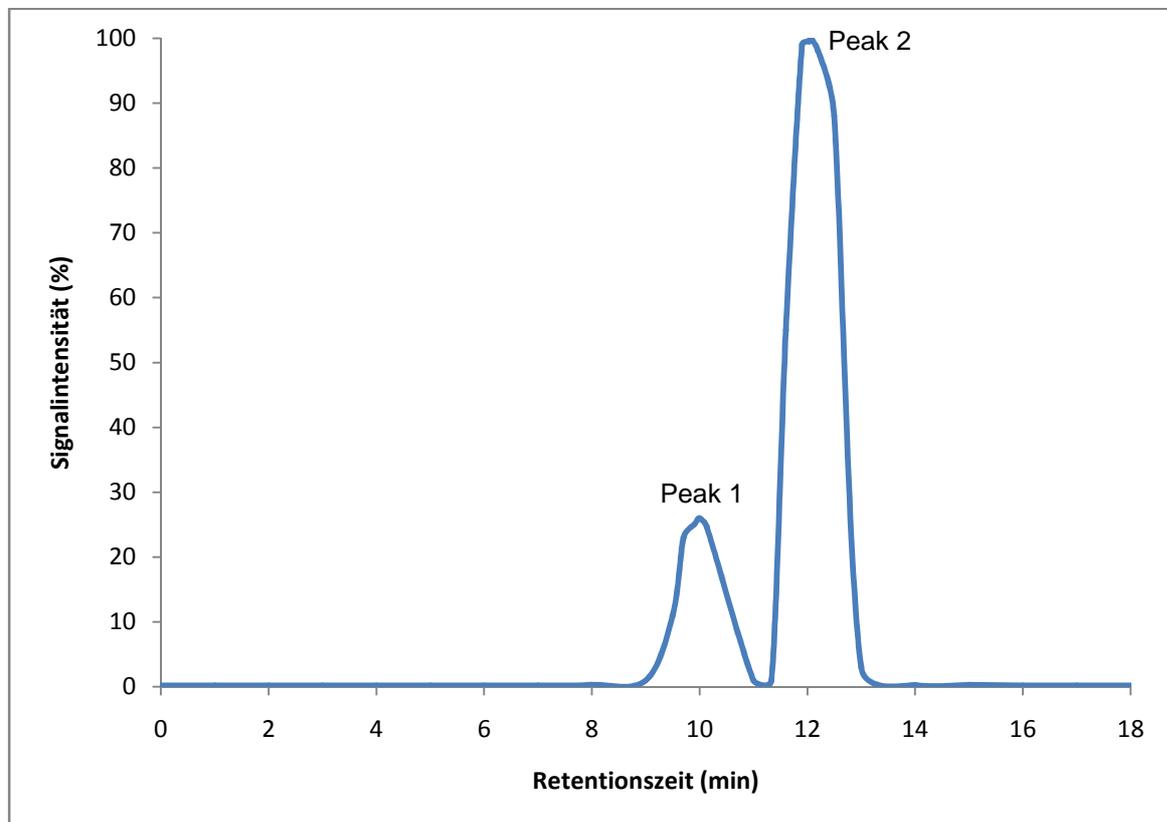


Abb. 3.22: Beispiel eines Elutionsprofils eines Gelfiltrationslaufes

Aus der Geradengleichung, die aus den logarithmierten Molmassen und den Retentionszeiten der Standards berechnet wurden, konnten die Molmassen der beiden Maxima bestimmt werden. Die Molmasse des ersten Maximums bei etwa 10 min betrug 92 kDa und die des zweiten Maximums 22,3 kDa.

3.3.6.1 Charakterisierung der Fraktionen

Da bei der Gelfiltration zwei Maxima auftraten bedurfte es einer Kontrolle der Aktivität der beiden Peaks. Daher wurde in einem weiteren Lauf das Eluat tropfenweise in einer Mikrotiterplatte fraktioniert. Das mittlere Tropfenvolumen betrug 78 µl. Aus den gesammelten Fraktionen wurden jeweils 20 µl für die Aktivitätstests entnommen (siehe 2.2.3). Als Substrat wurde neben Ala-NA auch STANA (Succinyl-tri-Alanin-4-Nitroanilid) eingesetzt. Letzteres ist ein spezifisches Substrat für die Endopeptidase Astacin.

In keiner der Fraktionen konnte ein Umsatz des Substrates STANA nachgewiesen werden. Bei den Messungen mit dem Substrat Ala-NA wurden im ersten Maximum hohe Aktivität gemessen und im zweiten Maximum nur geringe Aktivität festgestellt, die etwa 10 % der Aktivität vom ersten Maximum ausmachte.

3.3.7 Glykoprotein-Färbung

Für die Bestimmung von Glykoproteinen (siehe 2.2.9) wurde die Probe über ein 12 %-Gel aufgetrennt (siehe 2.2.5). Als Standards wurden jeweils 10 µl Roti-Mark und InsiteMarker verwendet. Vom Rohextrakt (Magenflüssigkeit) wurden 10 µl aufgetragen. Von den aufgereinigten Proben in den Bahnen 3 bis 5 wurden jeweils 20 µl und von der Positivkontrolle (Peroxidase) 5 bzw. 10 µl eingesetzt (Abb. 3.23).

3 ERGEBNISSE

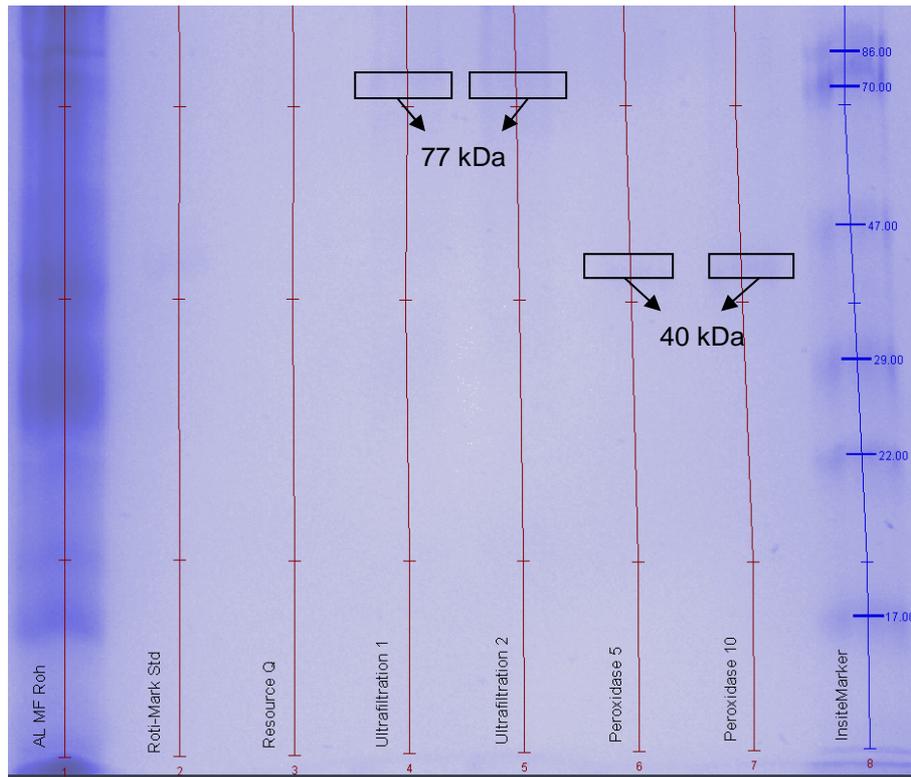


Abb. 3.23: Glykoprotein-Färbung. Bahn 1: *A. leptodactylus* MF Rohextrakt; Bahn 2 und 8: Standards; Bahn 3: Probe nach FPLC-Lauf über Resource Q-Säule; Bahn 4 und 5: Probe nach Ultrafiltration; Bahn 6 und 7: Positivkontrolle

Bei den mittels Ultrafiltration aufkonzentrierten Proben trat jeweils eine schwache Bande von 77 kDa auf. Zur besseren Veranschaulichung wurden diese Banden in Abb. 1 mit einem Rahmen versehen. Das gleiche gilt für die Positivkontrolle, die Banden von 40 kDa aufwies. Der Standard InsiteMarker zeigte nach der Glykoprotein-Färbung bereits Banden (Abb. 3.23).

Im Anschluss an die Glykoproteinfärbung wurde das Gel mit Coomassie angefärbt (siehe 2.2.7). Es zeigten sich die gleichen Banden wie bei der Glykoproteinfärbung. Allerdings kamen bei den Standards weitere Banden zum Vorschein. Die Zuordnung der Banden zum Roti-Mark-Standard erwies sich als schwierig. Daher wurde darauf verzichtet (Abb. 3.24).

3 ERGEBNISSE

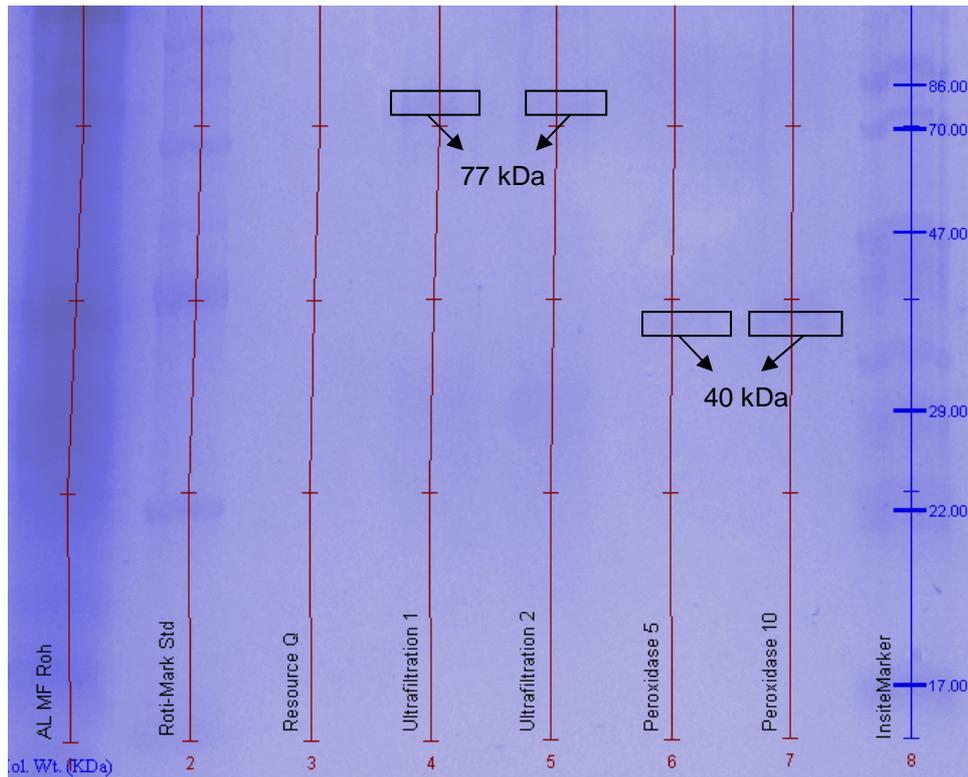


Abb. 3.24: Mit Coomassie angefärbtes Gel der Glykoprotein-Färbung. Bahn 1: *A. leptodactylus* MF Rohextrakt; Bahn 2 und 8: Standards; Bahn 3: Probe nach FPLC-Lauf über Resource Q-Säule; Bahn 4 und 5: Probe nach Ultrafiltration; Bahn 6 und 7: Positivkontrolle

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei der isolierten Aminopeptidase um ein Glykoprotein handelte.

3.3.8 Bestimmung der Inhibitionsverläufe

Es wurden die Inhibitionsverläufe für verschiedene zweiwertige Kationen und für zwei spezifische Aminopeptidase-Inhibitoren bestimmt (siehe 2.2.10). Außerdem wurde der IC_{50} -Wert bestimmt. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) ist diejenige Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Es wurde in einer Probe gemessen.

3.3.8.1 Inhibition mit Cobalt

Co²⁺-Ionen zeigten im Bereich bis 10 µM kaum eine inhibitorische Wirkung auf die Enzymaktivität der Aminopeptidase. Bei Konzentrationen von 100 µM und 1000 µM sank die Aktivität auf 70 % ab (Abb. 3.25). Der IC₅₀-Wert wurde hier nicht bestimmt.

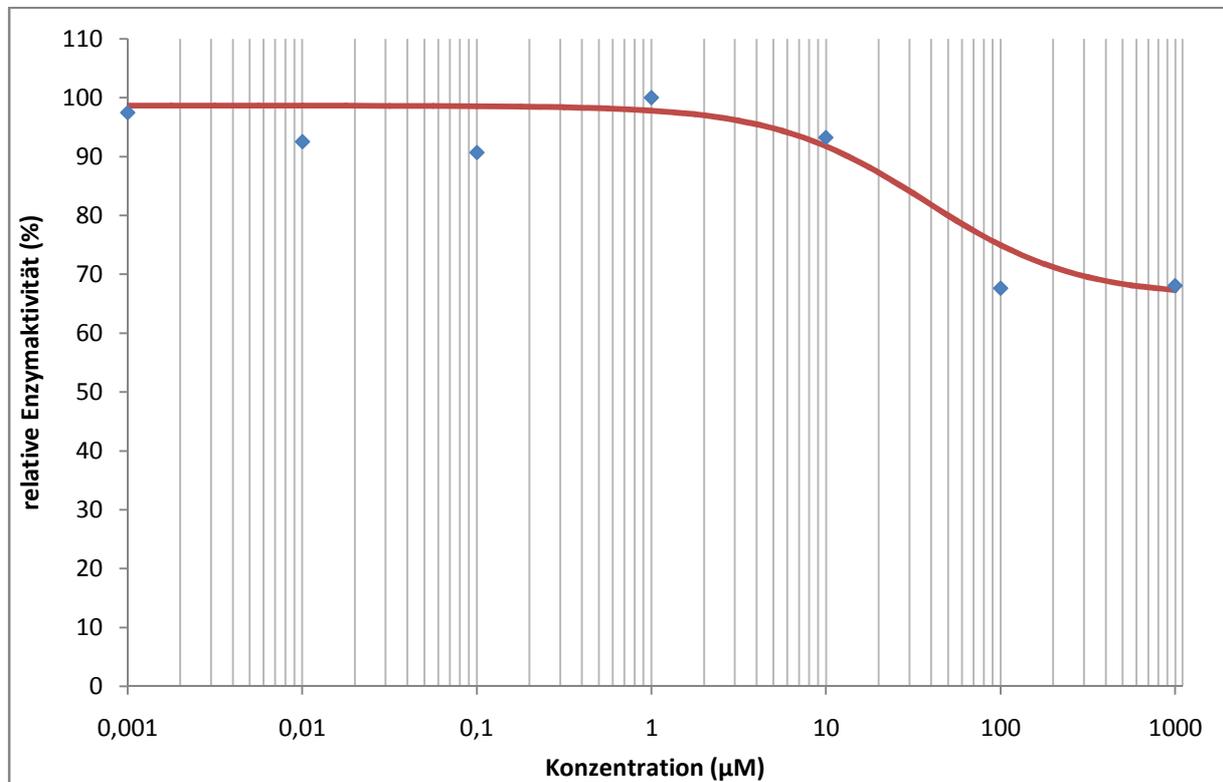


Abb. 3.25: Einfluss von Cobalt-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

3.3.8.2 Inhibition mit Mangan

Die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen bewirkte bis zu einer Konzentration von 10 μM keine Inhibition. Erst bei höheren Konzentrationen setzte eine inhibitorische Wirkung ein. Bei einer Konzentration von 10 mM wurde keine Enzymaktivität mehr gemessen (Abb. 3.26). Der IC_{50} -Wert wurde mit der Software „GraphPad Prism“ ermittelt. Er betrug 155,4 μM .

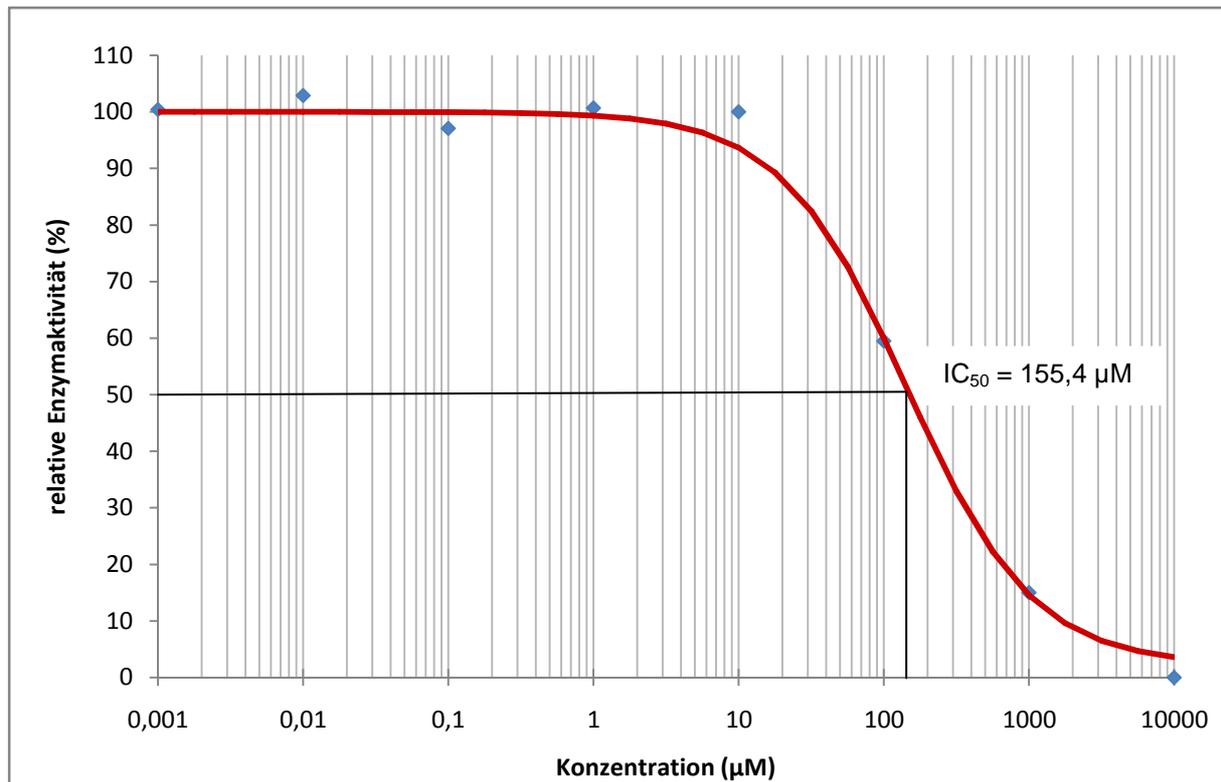


Abb. 3.26: Einfluss von Mangan-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

3.3.8.3 Inhibition mit Zink

Bereits eine geringe Konzentration von Zink (0,001 μM) bewirkte eine Hemmung der Enzymaktivität um 10 %. Bis zu einer Zink-Konzentration von 0,1 μM blieb diese Aktivität erhalten. Erst bei höheren Zink-Konzentrationen begann die Aktivität deutlich zu sinken. Bei 10 mM wurde keine Enzymaktivität mehr gemessen (Abb. 3.27). Der IC_{50} -Wert für Zink betrug 3 μM .

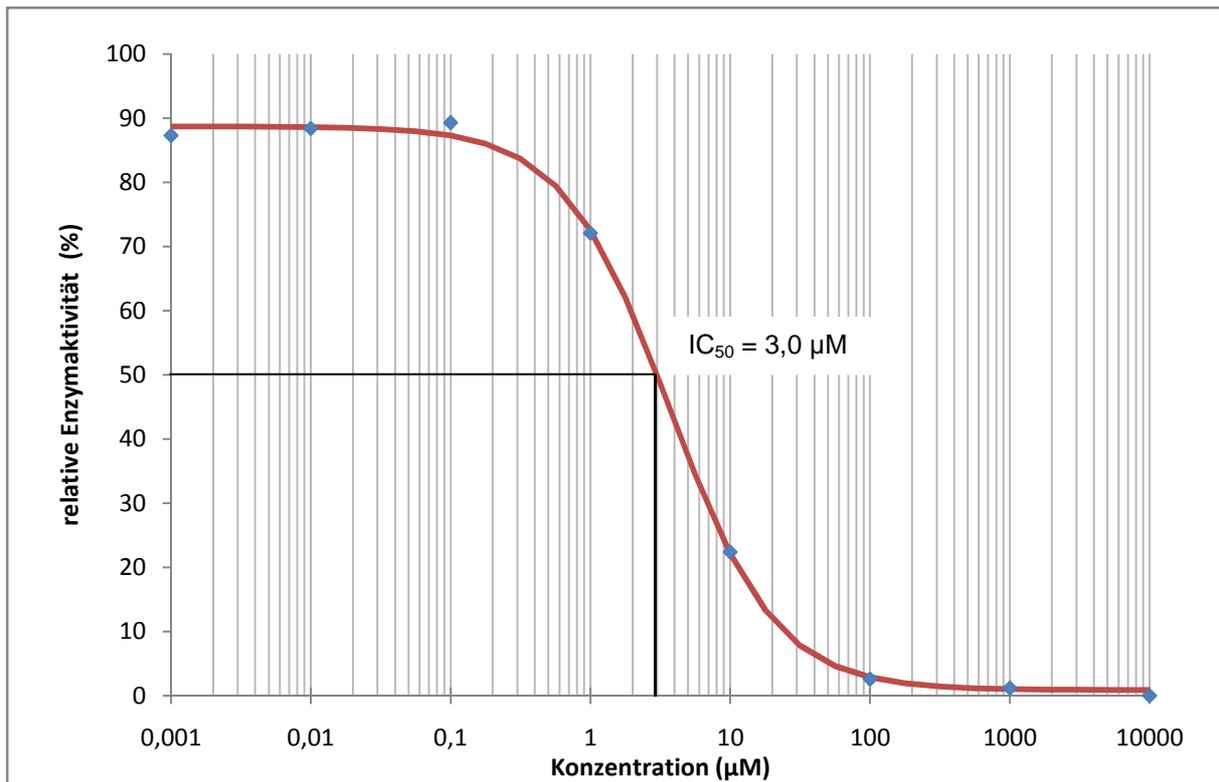


Abb. 3.27: Einfluss von Zink-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

3.3.8.4 Inhibition mit Bestatin

Bestatin ist ein spezifischer Inhibitor für Aminopeptidasen. Bei Konzentrationen von 0,001 μM bis 0,01 μM war die Enzymaktivität unverändert. Erst bei höheren Konzentrationen setzte die inhibitorische Wirkung ein. Bei einer Konzentration von 1000 μM wurde keine Aktivität mehr gemessen (Abb. 3.28). Der mit GraphPadPrism ermittelte IC_{50} -Wert betrug 0,68 μM . Bestatin war somit der stärkste Inhibitor für die isolierte Aminopeptidase.

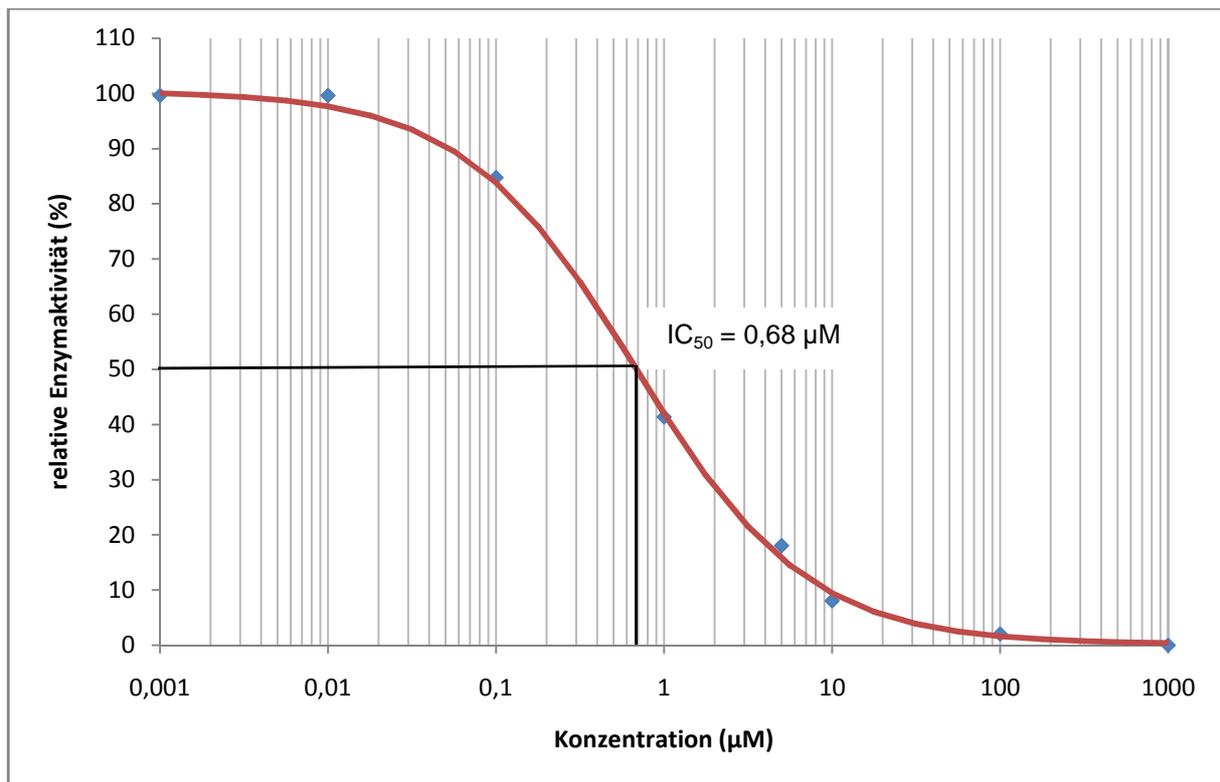


Abb. 3.28: Einfluss von Bestatin auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

3.3.8.5 Inhibition mit Puromycin

Puromycin ist ebenfalls ein spezifischer Aminopeptidase-Inhibitor. Bei Konzentrationen ab 1 μM setzte die Inhibition ein. Bei einer Konzentration von 2 mM war eine Restaktivität von 13 % vorhanden (Abb. 3.29). Der IC_{50} -Wert war 349,1 μM .

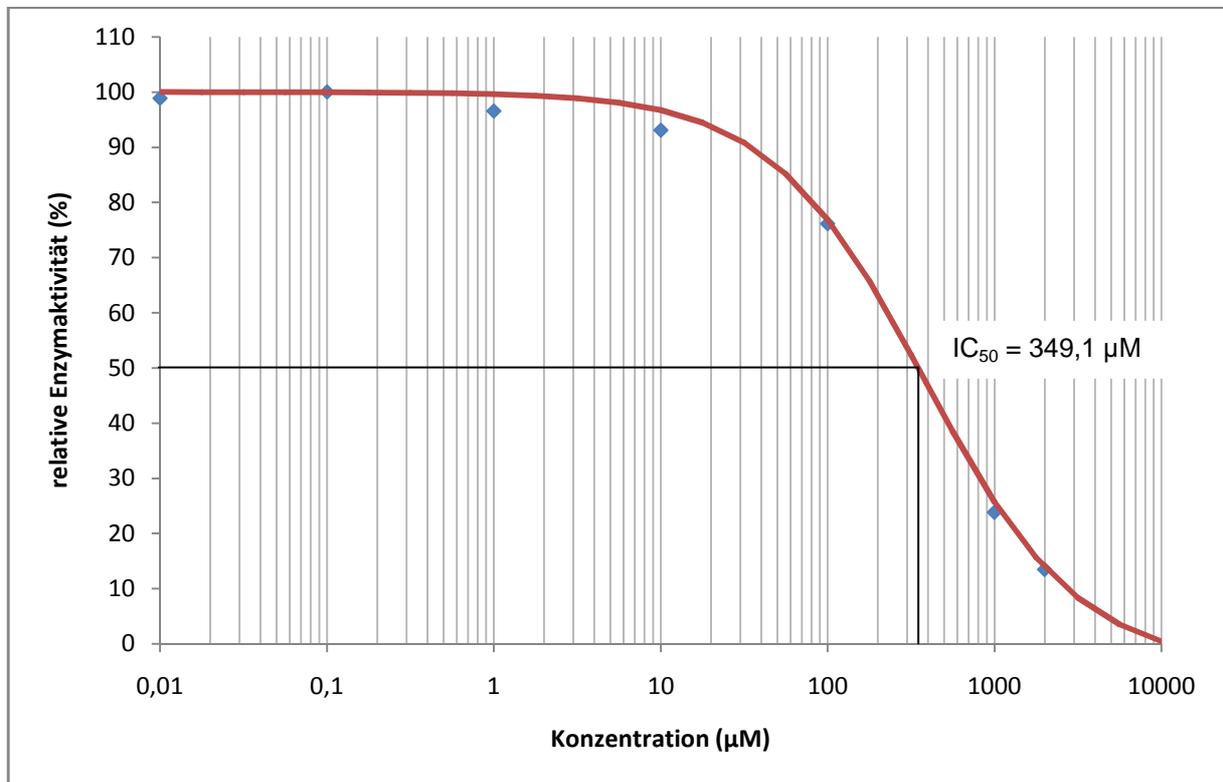


Abb. 3.29: Einfluss von Puromycin auf die Aktivität der Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

3.3.8.6 Einfluss zweiwertiger Ionen

Magnesium in einer Konzentration von 1 mM hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Aminopeptidase. Beim Einsatz von 1 mM Calcium verringerte sich die Aktivität. Es waren noch etwa 90 % Restaktivität vorhanden. Eine Hemmung auf etwa 65 % zeigten Cobalt, Strontium und Eisen. Die stärksten Hemmungen traten beim Einsatz von Kupfer (30 %), Mangan (14 %) und Zink (0,5 %) auf (Abb. 3.30).

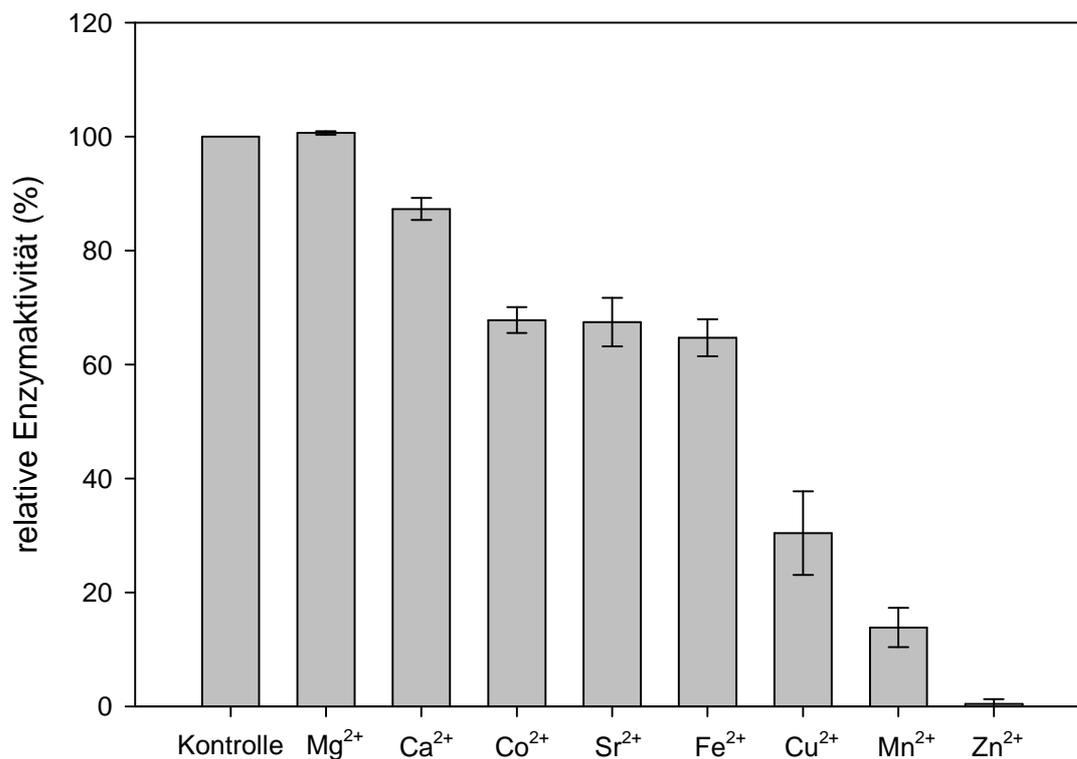


Abb. 3.30: Einfluss zweiwertiger Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase von *A. leptodactylus*. Die Konzentration der Metall-Ionen betrug 1 mM. (MW ± Stabw., n = 3)

3.3.8.7 Einfluss von Inhibitoren

Beim Einsatz von nicht-metallischen Inhibitoren waren die Hemmungen gering. Durch keinen Inhibitor wurde die Aktivität um mehr als 10 % verringert. Beim Einsatz des Komplexbildners EDTA war sogar ein Anstieg der Enzymaktivität zu verzeichnen (Abb. 3.31).

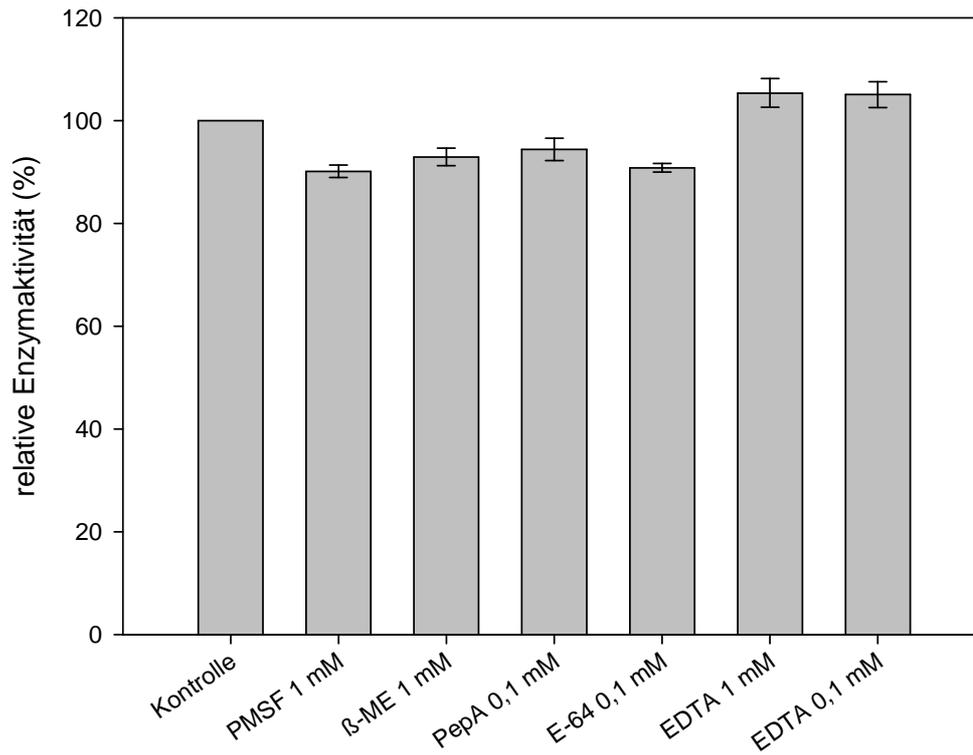


Abb. 3.31: Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der Aminopeptidase von *A. leptodactylus*. Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. (MW \pm Stabw., n = 3)

3.3.9 Bestimmung des Temperatur-Optimums und der Aktivierungsenergie

3.3.9.1 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Es wurde das Temperatur-Optimum der Enzymaktivität im Bereich von 6 °C und 72 °C bestimmt (siehe 2.2.11). Die Enzymaktivität stieg von 6°C bis 38°C fast linear an und erreichte bei 40 °C ihr Maximum. Bis 51°C war die Enzymaktivität noch sehr hoch, nahm mit steigender Temperatur jedoch rapide ab. Bei 72°C war immer noch eine Aktivität von 20 % der Maximalaktivität vorhanden (Abb. 3.32).

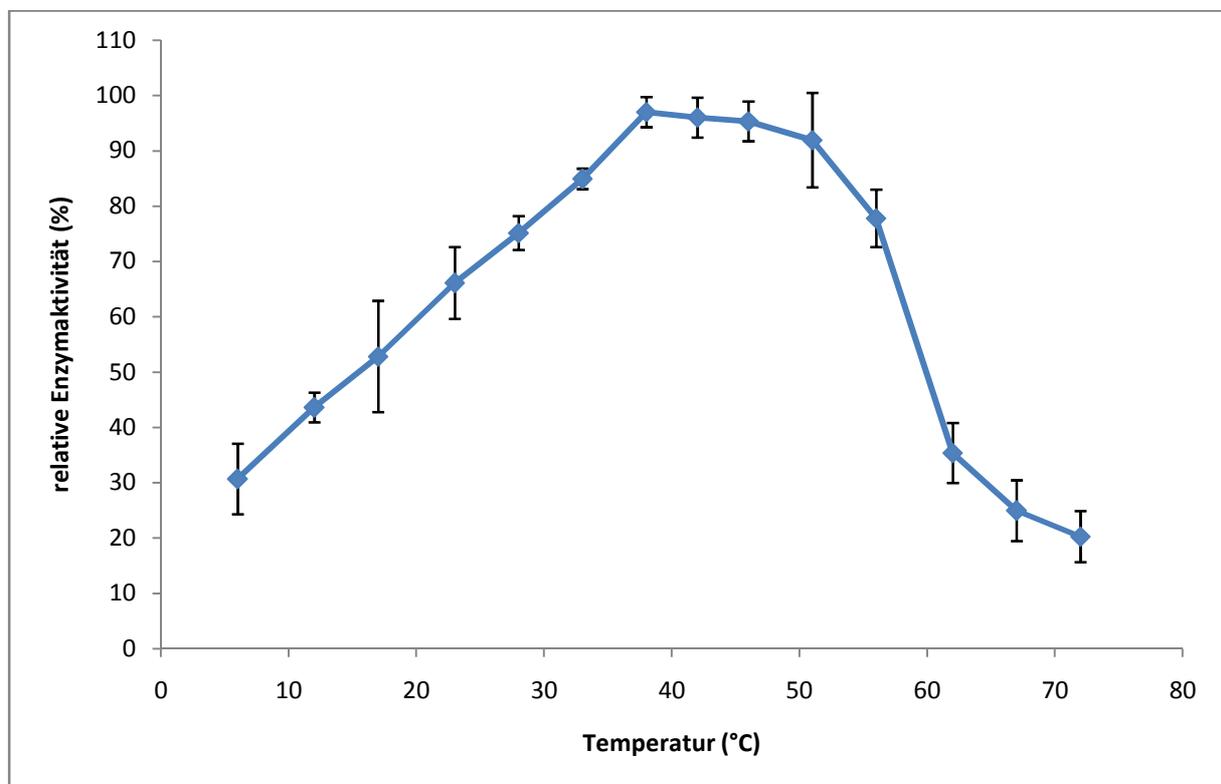


Abb. 3.32: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* bei verschiedenen Temperaturen, (MW \pm Stabw., n = 3)

3.3.9.2 Bestimmung der Aktivierungsenergie

Aus dem ansteigenden Bereich des Temperaturprofils (siehe 3.3.9.1) ließ sich ein Arrhenius-Diagramm erstellen (Abb. 3.33).

3 ERGEBNISSE

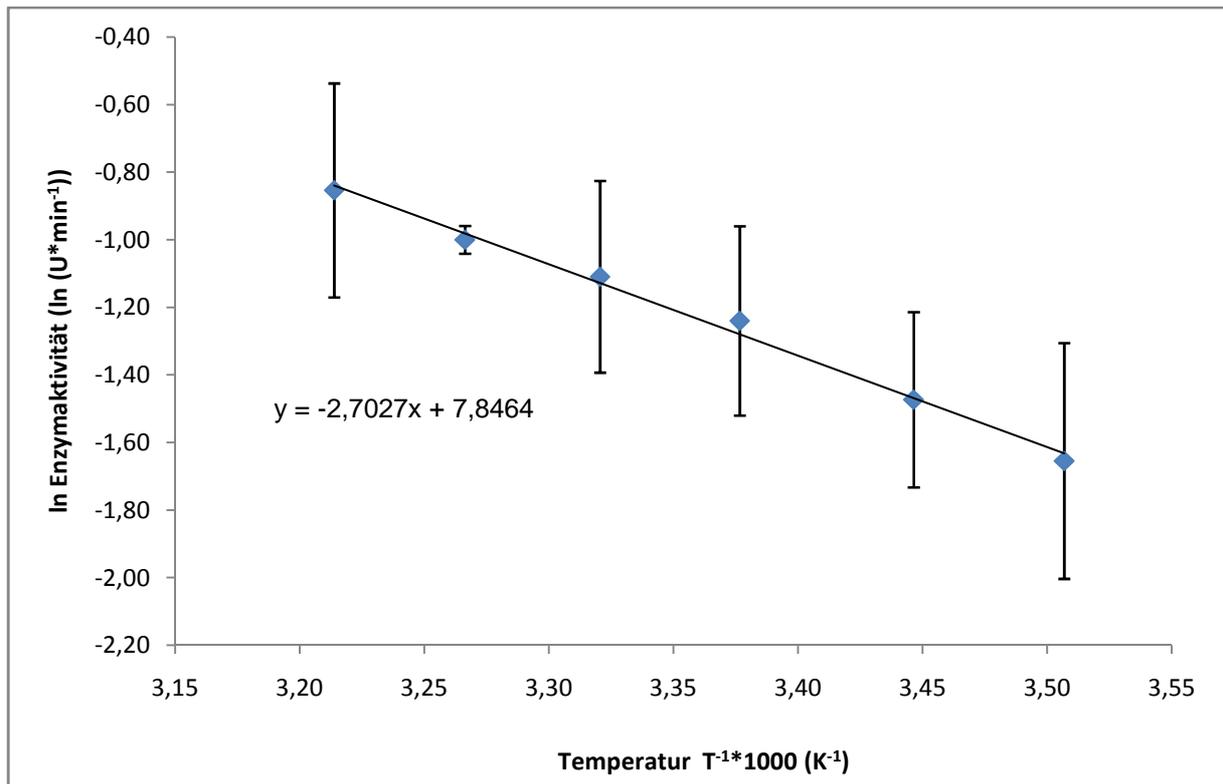


Abb. 3.33: Arrhenius-Diagramm, (MW ± Stabw., n = 3)

Mit Hilfe der Steigung m der Geraden konnte die Aktivierungsenergie dieser Reaktion bestimmt werden (siehe Formel 1).

$$E_A = -m * R$$

$$E_A = -2,702 \text{ K} \times 1000 \times 8,314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \times \text{K}} = 22464 \frac{\text{J}}{\text{mol}} = 22,464 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Die Aktivierungsenergie dieser Reaktion betrug 22,5 kJ/mol.

3.3.10 Bestimmung des pH-Optimums

Es wurde die Enzymaktivität in der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus* bei verschiedenen pH-Werten bestimmt (siehe 2.2.12). Aus Vorversuchen konnte der pH-Bereich des Maximums abgeschätzt werden (siehe 2.1.2). Es wurde daher der Bereich von pH 7,4 bis pH 8,4 gewählt. Als Substrat wurde Alanin-NA eingesetzt. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,8, also im leicht alkalischen Bereich (Abb. 3.34).

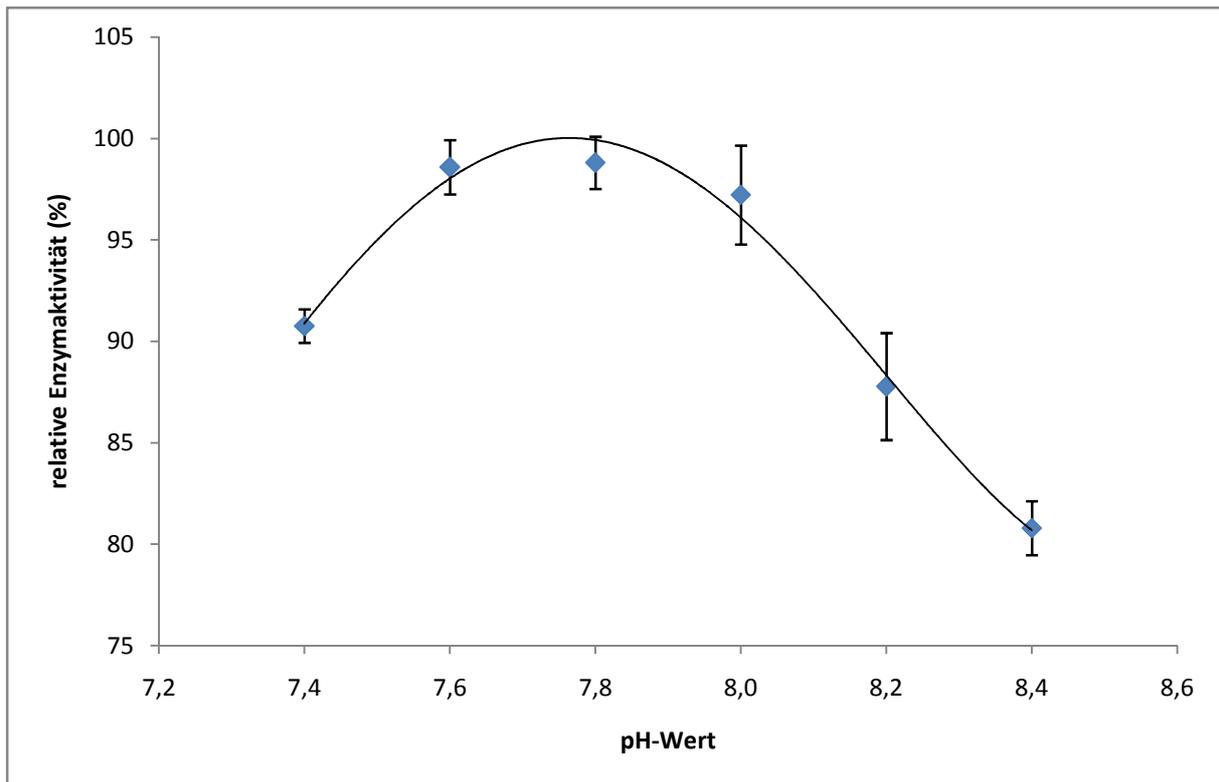


Abb. 3.34: Bestimmung der Enzymaktivität mit dem Substrat Alanin-NA in der Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus* bei verschiedenen pH-Werten, (MW \pm Stabw., n = 3)

3.3.11 Isoelektrische Fokussierung

Mittels Probenapplikator wurde jeweils 1 μ l eines IEF-Standards sowie 1 μ l einer verdünnten (1:4 mit A. dem.) Magenflüssigkeit-Probe von *Astacus leptodactylus* aufgetragen (siehe 2.2.13; Abb. 3.35).

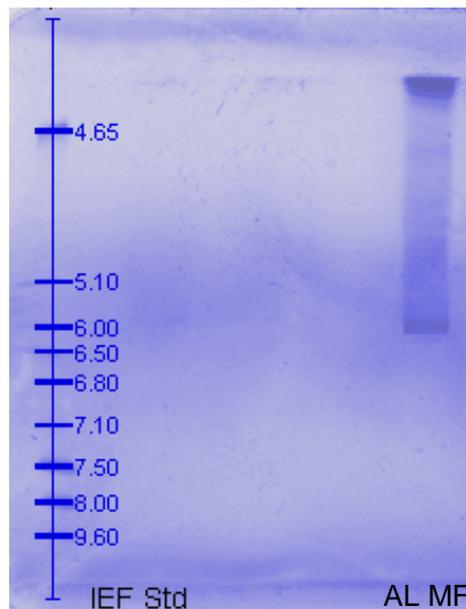


Abb. 3.35: Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung. Auf der linken Seite ist der Standard mit den zugeordneten pI-Werten aufgetragen und rechts die Magenflüssigkeit von *A. leptodactylus*

Die Banden des Standards ließen sich eindeutig zuordnen. Die Proteine der Magenflüssigkeit wurden nicht deutlich aufgetrennt. Somit war auch keine eindeutige Zuordnung der pI-Werte möglich. Es zeigte sich jedoch, dass sich alle Proteinbanden im sauren Bereich ($pI < 6,50$) befanden.

3.3.12 ICP-MS

Die Analyse der isolierten Aminopeptidase (siehe 2.2.14) ergab folgende Zusammensetzung der gemessenen Metalle (Tabelle 3.3):

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der mittels ICP-MS gemessenen Metalle

| Metall | Konzentration (µg/L) | % |
|-----------|----------------------|-------|
| Zink | 20,230 | 63,91 |
| Nickel | 3,832 | 12,11 |
| Kupfer | 2,524 | 7,97 |
| Chrom | 2,109 | 6,66 |
| Blei | 1,453 | 4,59 |
| Strontium | 0,720 | 2,27 |
| Vanadium | 0,313 | <1,0 |
| Arsen | 0,306 | <1,0 |
| Mangan | 0,073 | <1,0 |
| Cadmium | 0,062 | <1,0 |
| Silber | 0,020 | <1,0 |
| Cobalt | 0,011 | <1,0 |
| Eisen | 0,001 | <1,0 |

Zink dominiert mit einem Anteil von fast 64 %, gefolgt von Nickel mit 12,1 % und Kupfer mit 8 % (Abb. 3.36). Die Anteile von Chrom, Blei und Strontium betragen 6,7 %, 4,6 % und 2,3 %. Alle anderen Metallionen (vgl. Tabelle 3.3) hatten einen Anteil von weniger als 1 %.

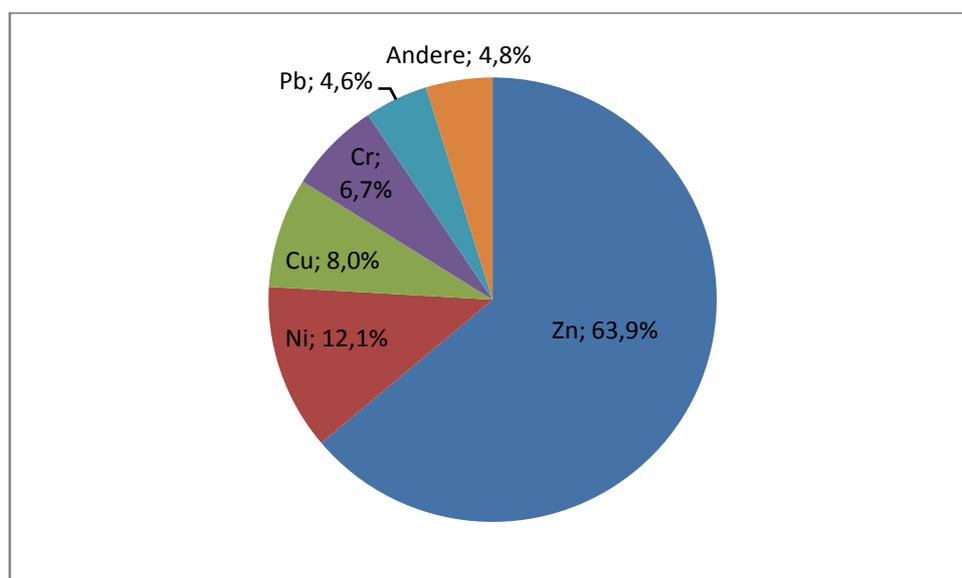


Abb. 3.36: Anteile der mittels ICP-MS gemessenen Metalle in einer aufgereinigten Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *Astacus leptodactylus*.

3.3.13 Lagerstabilität

3.3.13.1 Lagerung im Kühlschrank

Die untersuchte Probe (siehe 2.2.15) wies nach der Lagerung im Kühlschrank über Nacht eine gleichbleibende Enzymaktivität auf.

3.3.13.2 Lagerung bei -20 °C

Die untersuchte Probe (siehe 2.2.15) zeigte auch nach mehreren Auftauzyklen eine hohe Enzymaktivität. Die Restaktivität betrug immer mehr als 80 % der Kontrolle (Abb. 3.37).

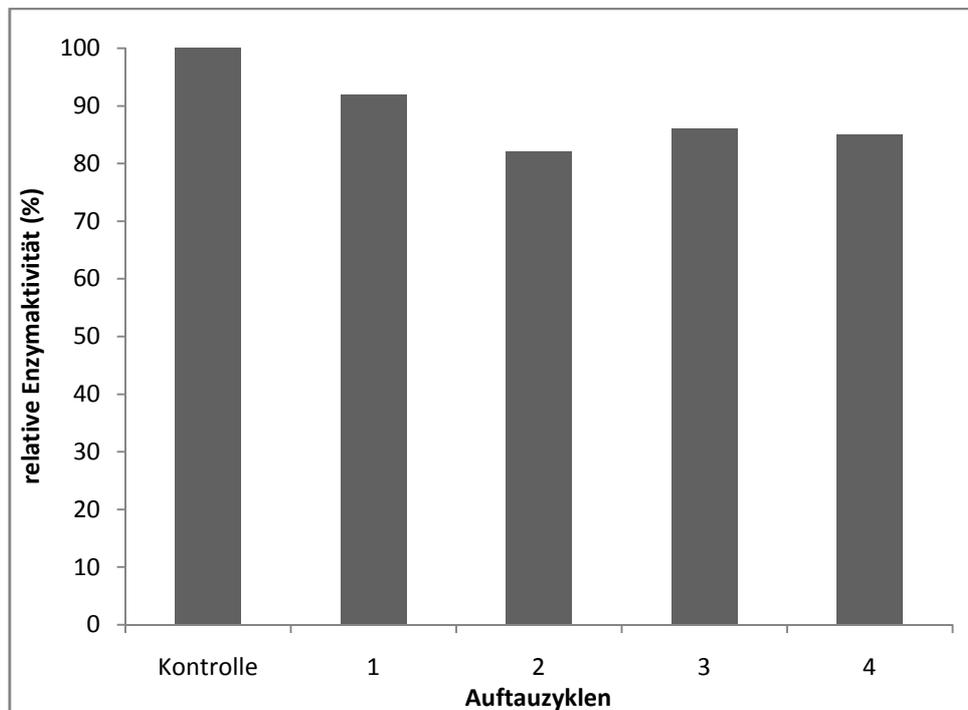


Abb. 3.37: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität nach Auftauen der Probe (-20 °C)

3.3.13.3 Lagerung bei -80 °C

Auch die Probe, die bei -80 °C gelagert wurde (siehe 2.2.15), zeigte nach mehreren Auftauzyklen immer noch eine recht hohe Enzymaktivität. Die Restaktivität betrug etwa 80 % (Abb. 3.38).

3 ERGEBNISSE

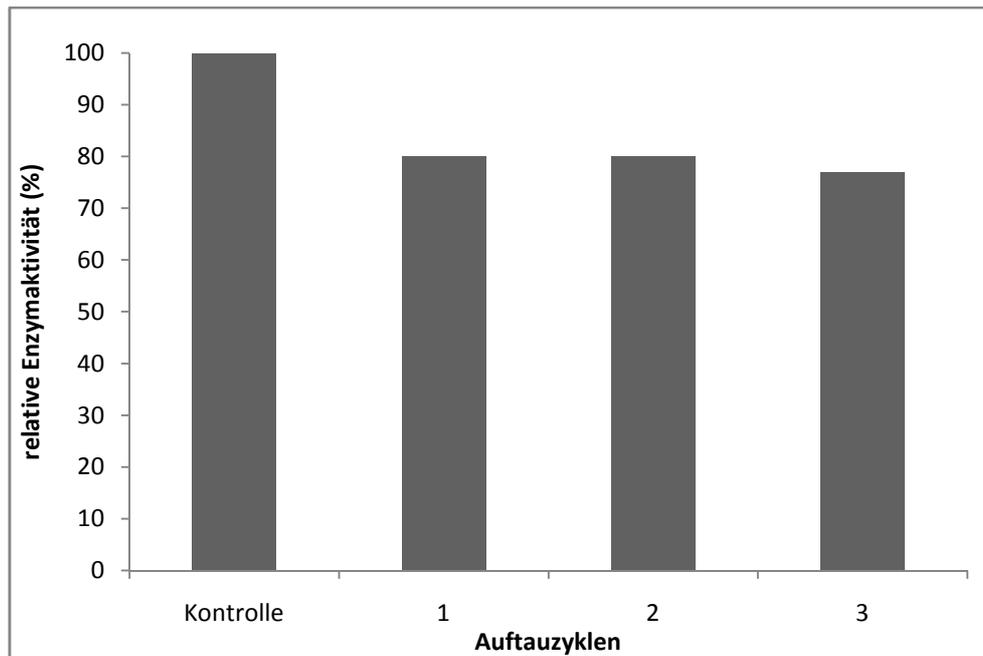


Abb. 3.38: Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität nach Auftauen der Probe (-80 °C)

3.3.13.4 Gefriergetrocknete Probe

Die lyophilisierte Probe zeigte nach Wiederauflösung in A. dem keine Enzymaktivität.

3.3.14 N-terminale Sequenzierung

Die beauftragte Firma Proteome Factory AG (siehe 2.3.4) konnte leider keine Ergebnisse liefern, da eine Blockierung des N-Terminus vorlag. Bei etwa 50 % der Proteine ist der N-Terminus durch N-Acetylaminosäuren, glykolisierte Aminosäuren, Pyrrolidongruppen oder anderes blockiert. Diese Blockade verhindert den Edman-Abbau (Rehm und Letzel 2009).

Es konnten daher keine weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die drei Krebsarten *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus* und *Homarus americanus* auf ihre Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit und in Extrakten der Mitteldarmdrüse untersucht. Die Enzyme der drei Arten unterschieden sich sowohl in ihren Substratspezifitäten, den pH-Optima und den spezifischen Aktivitäten. Aufgereinigt und näher charakterisiert wurde schließlich eine extrazelluläre Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit des Flusskrebsses *Astacus leptodactylus*. Die Aufreinigung des Enzyms wurde mittels Ionenaustauschchromatographie über zwei starke Anionenaustauschersäulen vollzogen. Bei der isolierten Aminopeptidase handelte es sich um ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 78 kDa (SDS-PAGE) bzw. 92 kDa (Gelfiltration). Das Enzym besteht wahrscheinlich aus vier Untereinheiten. Die Ergebnisse der ICP-Massenspektrometrie ließen zudem den Schluss zu, dass Zink ein Co-Faktor des Enzyms ist. Außerdem wurde der Einfluss zweiwertiger Kationen und spezifischer Aminopeptidase-Inhibitoren untersucht. Zink-Ionen und Mangan-Ionen sowie der spezifische Inhibitor Bestatin zeigten die stärkste inhibitorische Wirkung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die isolierte Aminopeptidase nicht zur Gruppe der „Puromycin-sensitiven Aminopeptidasen“ gehört. Das pH-Optimum lag im alkalischen Bereich bei pH 7,8 und das Temperatur-Optimum zwischen 40 und 50 °C. Die Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Aminopeptidase wurden mit Literaturangaben und Datenbankeinträgen anderer Aminopeptidasen verglichen. Schließlich wurden technologische Anwendungen für aquatische Naturstoffe diskutiert und Möglichkeiten zur Verwertung von Reststoffen aus der Fisch- und Meeresfrüchte-Industrie sowie Applikationen von Verdauungsenzymen in der Lebensmittelindustrie aufgezeigt.

4.1 Das Verdauungssystem dekapoder Crustaceen

Der Verdauungstrakt dekapoder Krebse besteht aus dem Vorder-, dem Mittel- und dem Enddarm. Der Vorderdarm beginnt mit der Mundöffnung und einem kurzen Ösophagus (Möhrlen 2002). Auf diesen folgt der zweiteilige Magen. Im vorderen, geräumigen Kaumagen (Cardia) befinden sich an beiden Seiten (lateral) zwei starke, gezähnte Cuticulaleisten und an der Magendecke (dorsal) eine weitere. Diese dienen zusammen mit der hochentwickelten Spezialmuskulatur zum Zerkleinern und

Durchkneten der Nahrung. Außerdem wird die Nahrung im Kaumagen mit den aus der Mitteldarmdrüse eingeleiteten Verdauungsenzymen vermischt und aufgeschlossen. Der zweite Teil des Magens, der Filtermagen (Pylorus), weist komplizierte Falten, Reusen und Filter auf, die dazu dienen, den verdaubaren Nahrungsbrei vom unverdaulichen Rest zu trennen. Nur feinste Partikel gelangen zur Endverdauung durch die pylorischen Filter in die Mitteldarmdrüse, während größere Stücke direkt über den Mitteldarm (Abb. 4.1) in den Enddarm befördert und ausgeschieden werden (Storch und Welsch 2009).

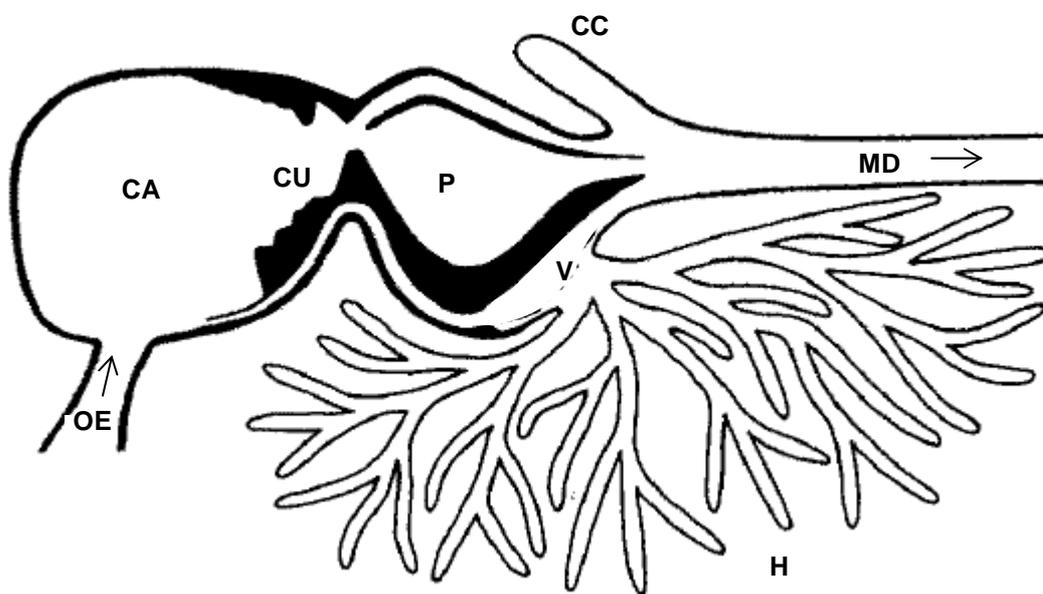


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes dekapoder Krebse (nach Vogt 1996). CA: Cardia (Kaumagen); CC: Caecum ;CU: Cuticula; H: Hepatopankreas (Mitteldarmdrüse); MD: Mitteldarm; OE: Ösophagus; P: Pylorus (Filtermagen); V: Vorkammer.

Die Mitteldarmdrüse der Crustacea, auch als Hepatopankreas bezeichnet, weist die verschiedenen Funktionen von Leber, Bauchspeicheldrüse und Dünndarm vertebrater Organismen auf. Sie speichert eine Vielzahl von Metaboliten und Mineralstoffen, sondert Verdauungssäfte ab und ist für die Nährstoffresorption zuständig (Jewell und Winston 1988). Die Mitteldarmdrüse ist mit Abstand das voluminöseste Organ des Verdauungstraktes. Sie besteht aus mehreren hundert blind endender Tubuli, die über Sammelkanäle mit dem Vorraum des Pylorus verbunden sind. Diese Vorkammer hat luminale Durchgänge zu Pylorus und Mitteldarmdrüse. Jeder Tubulus ist mit einem einschichtigen Epithelium ausgestattet, welches sich aus vier verschiedenen Zelltypen zusammensetzt: Embryonalzellen (E-

Zellen) an der Spitze und F-, B- und R-Zellen entlang der Tubuli (Vogt 1996). Die letztgenannten Zellen heißen Fibrillenzellen (F-Zellen), Blaszellen (B-Zellen) und Restzellen, die als R-Zellen abgekürzt werden (Hirsch und Jacobs 1928). Sie zählen zu den ausgereiften Zellen und haben direkten Kontakt sowohl zum Lumen der Tubuli als auch zur Hämolymphe (Vogt 1996). Die apikalen E-Zellen sind undifferenziert. Sie entwickeln sich mittels Mitose zu R-, F- und B-Zellen. Die R-Zellen kommen dabei am häufigsten vor. Sie sind ein Speicherort für Lipide und Glykogen und können Vakuolen enthalten, in denen Nährstoffe wie Kupfer, Zink, Schwefel und Phosphor gespeichert werden (Brunet et al. 1994). Im apikalen Bürstensaum dieser Zellen wurden zudem verschiedene Phosphatasen nachgewiesen (Barker und Gibson 1977). Die F-Zellen sind wahrscheinlich die Vorläufer der B-Zellen (Dall und Moriarty 1983). Sie weisen ein granulares Zytoplasma auf und beinhalten eine oder mehrere Vakuolen, die als supranuklear bezeichnet werden. F-Zellen besitzen apikal einen Bürstensaum (Verri et al. 2001). Sie weisen ein großflächiges raues endoplasmatisches Retikulum und einen Golgi-Apparat auf, was typisch ist für Zellen, in denen Stoffe synthetisiert werden (Loizzi 1971). In den B-Zellen findet die Synthese der Verdauungsenzyme statt. Außerdem vereinen sich in den B-Zellen die Vakuolen der F-Zellen zu einer großen Vakuole, die 90 % des intrazellulären Raumes einnimmt. Der Bürstensaum dieser Zellen ist gut entwickelt und mit einer dünnen Zellschicht bedeckt. Wahrscheinlich werden über diese Zellen Nährstoffe aus den Tubulilumen aufgenommen (Verri et al. 2001). Die Entwicklung von F- zu B-Zellen wurde bisher allerdings nicht überzeugend belegt (Vogt 1994), wird aber heutzutage in der Wissenschaft im Allgemeinen akzeptiert (Verri et al. 2001). Vogt (1994) vertritt den Standpunkt, dass sich die R-, F- und B-Zellen jeweils aus separaten E-Zellen entwickeln und dass es sich bereits in der Anlage um völlig unterschiedliche Zelltypen handelt.

Eine wichtige Unterscheidung gibt es noch bei der Art der Sekretion der Enzyme. Merokrine Exkretion liegt vor, wenn kleine Sekretröpfchen mittels Exozytose ausgeschleust werden. Die Zelle bleibt dabei erhalten. Werden Teile der Zelle mit abgeschnürt, so spricht man von apokriner Sekretion. Geht die Zelle während der Sekretbildung zugrunde und wird mit dem Sekret abgestoßen, so nennt man dies holokrine Sekretion. Die Zellen werden durch nachrückende neugebildete Zellen ersetzt. Bei dekapoden Krebsen verläuft die Sekretion bei kontinuierlicher Aufnahme kleiner Nahrungsportionen apokrin bzw. merokrin. Nach Stimulation durch die

Nahrungsaufnahme nach einer Hungerphase wird jedoch die holokrine Sekretion der Verdauungsenzyme induziert und die anderen Sekretionsarten treten in den Hintergrund (Gibson und Barker 1979). Das Verdauungssystem ist bei Crustaceen keinesfalls einheitlich. So verläuft die Sekretion bei Langusten wie *Panulirus argus* apokrin (Travis 1955). In Asseln (Isopoda) werden nur zwei Zelltypen unterschieden. Diese haben Speicherfunktionen und sekretorische Aufgaben. In den Flohkrebse (Amphipoda) und in Schwebegarnelen wie *Mysis stenolepis* finden sich wie in dekapoden Krebsen vier Zelltypen im Verdauungstrakt. Das Verdauungssystem ist dem des Flusskrebse *Astacus* sehr ähnlich. Bei niederen Krebsen (Entomostraca) wie den Wasserflöhen (Cladocera) gibt es nur einen Zelltypen im Epithelium. Die Sekretion erfolgt holokrin. Bei calanoiden Ruderfußkrebse (Copepoda) wie *Calanus helgolandicus* findet sich ein ähnliches Verdauungssystem mit vier verschiedenen Zelltypen wie bei dekapoden Krebsen (Brunet et al. 1994). Einige Insekten, die wie die Crustaceen zum Stamm der Arthropoda gehören, weisen ähnliche Verdauungssysteme wie die Decapoda auf. So wird in Tieren der Ordnung der Orthoptera (Geradflügler) bei kontinuierlicher Aufnahme kleiner Nahrungsportionen eine merokrine Sekretion beobachtet. Bei Nahrungsaufnahme nach einer Hungerphase wird die holokrine Exkretion bevorzugt (Wigglesworth 1972).

Der genaue Ablauf der Verdauung dekapoder Krebse wurde von Vogt (1994, 1996) für den Edelkrebs *Astacus astacus* beschrieben. Seiner Ansicht nach gelangen die Verdauungsenzyme aus den F-Zellen über die Tubulilumen in den Kaumagen, wo sie extrazellulär gespeichert werden, bis sie benötigt werden. Nach der Nahrungsaufnahme wird der Nahrungsbrei (Chymus) nach etwa zwei Stunden in die Mitteldarmdrüse zurückgeführt, wo die Nährstoffverwertung stattfindet. Er geht davon aus, dass Nährstoffe in den R-Zellen gespeichert werden. Nicht verwertbare Stoffe und überschüssige Nährstoffe gelangen in die B-Zellen, werden sekretiert und dann entsorgt. Nach etwa vier Stunden ist der Kaumagen wieder mit Magenflüssigkeit gefüllt und der Verdauungsvorgang somit abgeschlossen. Barker und Gibson (1977, Gibson und Barker 1979) beschrieben diesen Verdauungsvorgang für den europäischen Hummer *Homarus gammarus*. Nach Stimulation durch Nahrungsaufnahme nach einer Hungerzeit wird in bestimmten Schüben eine holokrine Sekretion der Verdauungsenzyme initiiert. Die Sekretion erfolgt nach 0 bis 15 min, 60 bis 120 min nach Nahrungsaufnahme und nach 3,5 bis 5 Stunden. Der

gesamte Verdauungszyklus dauert etwa 12 Stunden. Die Autoren beschrieben zudem eine Phase intrazellulärer Verdauung in dekapoden Krebsen, die im untersuchten Hummer nach 7 bis 9 Stunden in den R-Zellen durch Arylamidasen und Esterasen bewerkstelligt wird.

Die Aminopeptidasen der drei untersuchten Arten *Astacus leptodactylus*, *Homarus americanus* und *Cancer pagurus* zeigten deutliche Unterschiede in Bezug auf Substratumsatz, pH-Optimum und spezifische Aktivität:

Der Flusskrebs *Astacus leptodactylus* wies sowohl in der Magenflüssigkeit als auch in den Extrakten der Mitteldarmdrüse die mit Abstand höchsten spezifischen Aktivitäten auf. Außerdem wurden alle vier verwendeten Nitroanilid-Substrate umgesetzt. Die pH-Optima lagen jeweils bei pH 8. Die Hydrolyse der Substrate Leu-NA, Pro-NA und Val-NA war in der Magenflüssigkeit höher als in Extrakten der Mitteldarmdrüse. Lediglich das Substrate Ala-NA wurde von den Extrakten der Mitteldarmdrüse schneller abgebaut als von der Magenflüssigkeit. Die Verdauungsenzyme des amerikanischen Hummers *H. americanus* setzten nur die Substrate Ala-NA und Leu-NA um. Die stärkste Hydrolyse von Ala-NA erfolgte in einem pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 6. Die spezifische Aktivität war jeweils in den Extrakten der Mitteldarmdrüse höher als in der Magenflüssigkeit. Beim Taschenkrebs *Cancer pagurus* wurden ebenfalls nur die Substrate Ala-NA und Leu-NA umgesetzt. Das pH-Optimum lag in der Magenflüssigkeit bei pH 6 und in den Extrakten der Mitteldarmdrüse bei pH 5. Auch hier war die spezifische Aktivität in Extrakten der Mitteldarmdrüse höher als in der Magenflüssigkeit.

Die unterschiedliche Substratspezifität und unterschiedlich hohe spezifische Aktivität könnte auf eine unterschiedliche Strategie der Nahrungsverwertung zurückzuführen sein. Obwohl das Verständnis über die Ernährung von Crustaceen über die letzten Jahrzehnte gewachsen ist, sind noch viele Aspekte in diesem Bereich unerforscht (Verri et al. 2001). Ein wichtiger Unterschied in der Ernährung von Säugetieren und von dekapoden Krebsen besteht darin, dass Crustaceen effizient Proteine als primäre Energiequelle verwerten können. Säugetiere verwerten vorwiegend Kohlenhydrate und Fette für die Energiegewinnung (New 1976). Die verschiedenen Crustaceen-Arten weisen eine große Breite an unterschiedlichen Verdauungs-

enzymen auf, was auf ihre unterschiedlichen Ernährungsweisen und Nahrungsquellen hinweisen kann (Ceccaldi 1997).

Die höhere spezifische Aktivität der Aminopeptidasen in Extrakten der Mitteldarmdrüse beim Taschenkrebs und beim amerikanischen Hummer könnte dadurch zustande kommen, dass diese Arten diese Enzyme selten für die Nahrungsverwertung benötigen. Die Enzyme könnten in den Zellen der Mitteldarmdrüse gespeichert werden und bei einem veränderten Nahrungsangebot könnten diese Arten durch holokrine Sekretion dieser Aminopeptidasen reagieren. Beim Flusskrebs war nur der Umsatz des Substrates Ala-NA in der Mitteldarmdrüse höher als in der Magenflüssigkeit. Die Hydrolasen der anderen Substrate Leu-NA, Pro-NA und Val-NA lagen hauptsächlich extrazellulär in der Magenflüssigkeit vor. Diese unterschiedliche Verteilung der Exopeptidasen könnte als Anpassung an unterschiedliche Ernährung betrachtet werden. Es scheint zudem möglich, dass die intrazelluläre Verdauung von Proteinen und Peptiden bei Taschenkrebsen und Hummern eine wichtigere Rolle einnimmt als bisher vermutet. Zunächst werden in der Magenflüssigkeit langkettige Proteine durch die extrazellulären Endopeptidasen in Peptide gespalten. Die Peptide gelangen mit dem Nahrungsbrei in die Mitteldarmdrüse, wo sie anschließend intrazellulär durch die Aminopeptidasen verwertet werden.

Die pH-Optima der Aminopeptidasen von *C. pagurus* und *H. americanus* spiegeln die leicht sauren pH-Werte in den Magenflüssigkeiten wider. In den meisten Crustaceen liegt der pH-Wert der Magenflüssigkeit zwischen pH 5 und pH 7 (Dall und Moriarty 1983). Wie der schwach saure pH-Wert zustande kommt ist nicht bekannt (Barker und Gibson 1979). Eventuell spielen dabei Phosphatverbindungen eine entscheidende Rolle (Krüger und Graetz 1928). Die Magenflüssigkeit von *Cancer pagurus* wies einen pH-Wert von etwa 6, die von *Homarus americanus* ein pH-Wert von 5 auf. In *Astacus astacus* wurde während einer Hungerphase ein pH-Wert von etwa 5 gemessen. Nach dem Füttern erhöhte sich der pH-Wert in der Magenflüssigkeit auf pH 5,8 und pH 6,6 (Vonk und Western 1984). Gibson und Barker (1979) beschrieben ähnliche Werte für andere Flusskrebs-Arten wie beispielsweise *Astacus fluviatilis*. Das pH-Optimum der Aminopeptidase befindet sich jedoch nicht in diesem pH-Bereich. Dall und Moriarty (1983) vermuten, dass es pH-Wert-Unterschiede bei der Zirkulation der Fluide zwischen Magen und

Mitteldarmdrüse gibt. Diese Schwankungen könnten zyklisch sein oder in kurzen Zeitintervallen erfolgen. Außerdem vermuten die Autoren, dass der pH-Wert nach dem Füttern um den Neutralpunkt schwankt und somit alle Verdauungsenzyme aktiv genug sind um die Verdauung zu vollziehen.

4.2 Charakterisierung und Vergleich der Aminopeptidase

Die Glykoprotein-Färbung bestätigte, dass es sich bei der isolierten Aminopeptidase um ein Glykoprotein handelte. Proteine sind glykosiliert zum Zwecke des Transports nach außen, zum Schutz vor proteolytischem Abbau nach Sekretion, zum Zwecke der Verteilung auf verschiedene intrazelluläre Kompartimente oder um die Adhäsion an Zelloberflächen zu ermöglichen. Die Glykosilierungen können über Serin- oder Threoninreste (O-gebundene Glykosilierung) oder über Asparaginreste (N-gebundene Glykosilierung) erfolgen. In Einzelfällen können bis zu 80 % des Glykoproteins aus Kohlenhydraten bestehen. Die Strukturen von Glykoproteinen können ist aufgrund der Beteiligung verschiedener Zucker sehr vielfältig sein (Pingoud und Urbanke 1997). Glykoproteine sind charakteristische Moleküle der äußeren Plasmamembranen, während intrazelluläre Membrantypen Glykoproteine selten aufweisen. Die Kohlenhydratketten an der Plasmamembran sind stets nach außen orientiert, was auf ihre Rolle bei der interzellulären Kommunikation hinweist. Außerdem beeinflussen diese Kohlenhydrate die Proteinfaltung und die Stabilität der Proteine gegenüber Proteolyse (Rehner und Daniel 2010). Der letztgenannte Punkt könnte eine Erklärung für die Glykosilierung der hier isolierten Aminopeptidase liefern: Durch die Glykosilierung ist die Aminopeptidase nach der Sekretion aus den Zellen der Mitteldarmdrüse in den Magen vor dem Abbau durch andere proteolytische Enzyme in der Magenflüssigkeit geschützt.

Bisher wurden erst wenige Aminopeptidasen aus Crustaceen isoliert und charakterisiert. Die Eigenschaften der aus *Astacus leptodactylus* isolierten Aminopeptidase wurden daher zunächst mit Aminopeptidasen aus anderen Organismen verglichen. Die Daten entstammen der Datenbank BRENDA (Braunschweig Enzyme Database). Aufgrund der Ergebnisse der Glykoprotein-Färbung wurde dort nach membrangebundenen Alanylaminopeptidasen (EC 3.4.11.2) gesucht. Die Arten mit einer solchen Aminopeptidase sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Organismen mit membrangebundenen Alanyl-Aminopeptidasen. Quelle: Datenbank BRENDA. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.11.2 (25.4.2011)

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| Arthropoda | |
| <i>Aedes aegypti</i> | Gelbfiebermücke |
| <i>Anopheles gambiae</i> | Gambische Malaria-Mücke |
| <i>Bombyx mori</i> | Seidenspinner |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Fruchtfliege |
| <i>Epiphyas postvittana</i> | Apfelmotte |
| <i>Helicoverpa armigera</i> | Baumwolleule |
| <i>Helicoverpa punctigera</i> | Australian bollworm |
| <i>Heliothis virescens</i> | Tobacco budworm |
| <i>Lymantria dispar</i> | Schwammspinner |
| <i>Manduca sexta</i> | Tabakschwärmer |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Regenbogenforelle |
| <i>Plutella xylostella</i> | Kohlmotte |
| <i>Sparus aurata</i> | Goldbrasse |
| <i>Spodoptera litura</i> | Eulenfalter |
| <i>Tenebrio molitor</i> | Mehlkäfer |
| <i>Trichoplusia ni</i> | Aschgraue Höckereule |
| Chordata | |
| <i>Bos taurus</i> | Husrind |
| <i>Capra hircus</i> | Wildziege |
| <i>Cavia porcellus</i> | Hausmeerschweinchen |
| <i>Felis catus</i> | Hauskatze |
| <i>Gallus gallus</i> | Haushuhn |
| <i>Homo sapiens</i> | Mensch |
| <i>Mus musculus</i> | Hausmaus |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | Wildkaninchen |
| <i>Ovis aries</i> | Hauschaf |
| <i>Rattus norvegicus</i> | Wanderratte |
| <i>Sus scrofa</i> | Wildschwein |
| <i>Torpedo marmorata</i> | Marmor-Zitterrochen |
| Mollusca | |
| <i>Mizuhopecten yessoensis</i> | Japanese scallop |
| Nematoda | |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | Fadenwurm |
| <i>Heterodera glycines</i> | Fadenwurm |

Tabelle 4.2: Bacteria und Eukaryota mit membrangebundenen Alanyl-Aminopeptidasen. Quelle: Datenbank BRENDA. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.11.2 (1.5.2011)

| Bacteria |
|-----------------------------------|
| <i>Brucella melitensis</i> |
| <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> |
| <i>Lactobacillus lactis</i> |
| <i>Novosphingobium capsulatum</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>Streptococcus salivarius</i> |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| <i>Streptomyces lividans</i> |
| Eukaryota |
| <i>Eimeria tenella</i> |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

In der Datenbank wurden ebenfalls einige Aminopeptidasen als Glykoprotein beschrieben. Dazu zählten Aminopeptidasen aus *Anopheles gambiae*, *Bombyx mori*, dem Menschen, *Lymantria dispar*, *Manduca sexta*, *Oryctolagus cuniculus*, *Plutella xylostella*, *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sus scrofa*, *Tenebrio molitor*, *Torpedo marmorata*, *Trichoplusia ni* sowie *Spodoptera litura*.

4.2.1 Molmasse

Bei der Molmassenbestimmung mittels SDS-PAGE wiesen die nativen Proben mehrere Banden auf. Die mittels Aktivitätsfärbung lokalisierten Aminopeptidase-Banden hatten eine apparente Molmasse von 75 bis 78 kDa befanden. Bei den denaturierten Proben fehlte jene Bande, was zeigt, dass die Struktur und dadurch die Aktivität des Enzyms durch die Behandlung mit Mercaptoethanol unter kurzem Aufkochen vollständig zerstört wurden.

Bei der Molmassenbestimmung mittels Gelfiltration traten zwei Maxima auf, die Molmassen von 22,3 kDa bzw. 92 kDa entsprachen. Die beiden Fraktionen wurden auf Aminopeptidase-Aktivität untersucht: Die 92 kDa-Fraktionen hatten deutliche Aktivität während die 22,3 kDa-Fraktionen kaum Aktivität aufwiesen.

Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen aus der Datenbank BRENDA verglichen. Die Molmassen wurden entweder mittels SDS-PAGE oder mittels

Gelfiltration bestimmt. Ähnliche Molmassen traten bei Amino-peptidasen aus *E. coli* mit 80 kDa, *Lactobacillus lactis* und *Streptomyces lividans* mit 95 kDa, *Brucella melitensis* und *Streptococcus salivarius* mit 98 kDa und *Bombyx mori* mit 100 kDa auf. Allerdings gab die Datenbank keine Informationen darüber, ob es sich um glykosilierte Proteine handelte. Dieser Nachweis wurde lediglich für die Amino-peptidase aus *Tenebrio molitor* mit einer Molmasse von 90 kDa und *Anopheles gambiae* mit 106 kDa erbracht.

4.2.2 Aufbau des Moleküls und Co-Faktoren

Die Ergebnisse der ICP-Massenspektrometrie lassen aufgrund des hohen Zinkanteils den Schluss zu, dass Zink als Co-Faktor des Enzyms dient. Um auszuschließen, dass es sich bei der 22,3 kDa-Fraktion um die Endopeptidase Astacin handelt, die ebenfalls zur Familie der Zink-Metalloproteasen (Abb. 4.2) gehört und eine ähnliche Molmasse aufweist, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

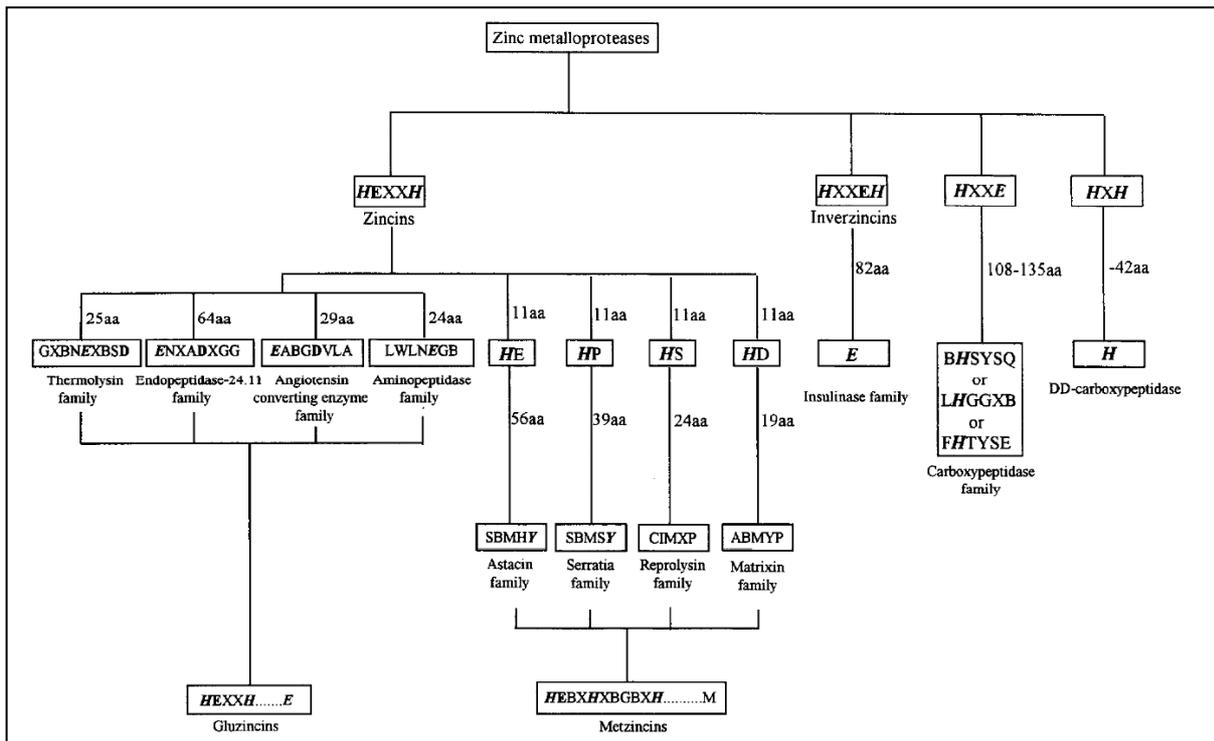


Abb. 4.2: Familie der Zink-Metalloproteasen. Kursive Buchstaben repräsentieren positiv identifizierte Zink-Liganden; fett gedruckte Buchstaben repräsentieren Reste, die an der Katalyse beteiligt sind; B steht für voluminöse, apolare Reste; X steht für irgendeine Aminosäure (aa); die Zahlen stehen für die Entfernung zwischen dem Liganden und dem ersten Histidinmolekül im kurzen zinkbindenden Motiv (Hooper 1994).

Die Unterscheidung der Zink-Metalloproteasen wurde von Hooper (1994) anhand der Zink-Motive vorgenommen. Näher eingegangen werden soll an dieser Stelle auf die Familie der Astacine und der Aminopeptidasen. Das aus 200 Aminosäuren bestehende aktive Verdauungsenzym Astacin hat ein Molekulargewicht von 22614 Dalton (Titani et al. 1987). Im Unterschied zu anderen Metalloproteasen, deren zentrales Zinkion im Grundzustand tetraedisch koordiniert vorliegt, besitzt das Zinkion im Astacin fünf Liganden. Die Astacin-Familie kann strukturell eindeutig von anderen Metalloproteasen unterschieden werden. Astacin lässt sich mit verwandten Proteinfamilien zur Superfamilie der Metzinkine zusammenfassen (Möhrlen 2002). Die Aminopeptidasen gehören hingegen zur Superfamilie der Gluzinkine. Charakteristisch für diese Superfamilie ist das kurze zinkbindende Motiv **HEXXH**. Die Aminopeptidase-Familie unterscheidet sich strukturell von anderen Familien, dadurch ergibt sich wahrscheinlich eine andere Form des aktiven Zentrums (Hooper 1994).

Zur Bestimmung von Astacin wurde das von Stöcker und Zwilling (1995) beschriebene Substrat STANA eingesetzt. Da keine der Fraktionen Aktivität aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um diese Endopeptidase handelte. Es wurde daher angenommen, dass sich das Aminopeptidase-Molekül mit einer Molmasse von 92 kDa aufgrund der Größenverhältnisse aus vier Untereinheiten à 23 kDa zusammensetzte. Isolierte Untereinheiten wiesen nur noch eine geringe Restaktivität von etwa 10 % auf.

Die Funktion von Zink als Co-Faktor der isolierten Aminopeptidase deckte sich mit Angaben aus der Datenbank. Dort wurde immer Zink als Co-Faktor beschrieben, andere Metalle spielen keine Rolle. Es wurden verschiedene Zink-Motive aufgeführt. Das Motiv **HEXXH** wurde für *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Novosphingobium capsulatum*, *Rattus norvegicus* und dem Menschen beschrieben. Bei *Anopheles gambiae* war das Motiv **HEIAH** vorhanden und *Helicoverpa armigera* und *Plutella xylostella* wiesen das Motiv **HEXXHX18E** auf. Eine Zinkabhängigkeit wurde z.B. bei *Sus scrofa* und *Saccaromyces cerevisiae* beschrieben. Bei *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* wurde bei den charakterisierten Aminopeptidasen von Zink-Metalloproteasen gesprochen.

4.2.3 Einfluss von Inhibitoren und zweiwertigen Ionen

Die Empfindlichkeit gegenüber dem wenig spezifischen Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin gehört zur gemeinsamen Charakteristik der Aminopeptidasen (Bukowska 2002). Die Inhibition beruht auf einer kompetitiven Hemmung (Bauvois und Dauzonne 2006, Abb. 4.3).

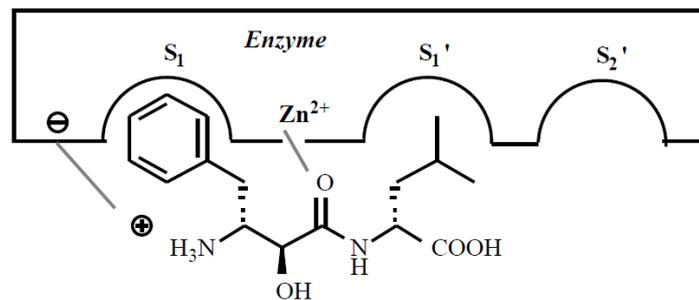


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Interaktion von Bestatin mit Aminopeptidasen (Xu & Li 2005)

4.2.3.1 Bestatin

Bestatin zeigte von allen eingesetzten Inhibitoren die stärkste hemmende Wirkung. Der IC_{50} -Wert betrug nur $0,68 \mu\text{M}$. Beim Einsatz von $5 \mu\text{M}$ des Inhibitors war noch etwa 18 % Restaktivität vorhanden, bei $100 \mu\text{M}$ nur noch etwa 2 % und bei einer Konzentration von 1 mM war gar keine Aktivität mehr vorhanden. Im Vergleich dazu wurde bei *Bombyx mori* ein sehr viel größerer IC_{50} -Wert von $3,25 \text{ mM}$ ermittelt. Bei *Brucella melitensis* wurde bei einer Inhibitor-Konzentration von $250 \mu\text{M}$ eine Restaktivität von 45 % bestimmt. Bei der aus *Astacus* isolierten Aminopeptidase war bei dieser Konzentration nur eine Restaktivität von etwa 1 % vorhanden. Ähnliche Ergebnisse beim Einsatz von $5 \mu\text{M}$ traten beim Menschen mit 27 % Restaktivität auf, sowie bei den Säugetieren *Ovis aries*, *Oryctolagus cuniculus* und *Cavia porcellus* mit 16, 28 bzw 8 %. Bei *Rattus norvegicus* war die Wirkung schwächer, dort trat noch 48 % Restaktivität auf. Ebenfalls einen geringen Einfluss auf die Aktivität hatte Bestatin bei *Streptomyces lividans*. Dort zeigte sich beim Einsatz von $130 \mu\text{M}$ noch eine Restaktivität von 30 %. Bei *Sus scrofa* und *Bos taurus* hatte Bestatin eine starke inhibitorische Wirkung.

4.2.3.2 Puromycin

Puromycin ist ein spezifischer Aminopeptidase-Inhibitor. Zytosolische Aminopeptidasen weisen als gemeinsame Charakteristik eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Puromycin auf, was sie von anderen Aminopeptidasen unterscheidet. Die geläufige Bezeichnung für solche Aminopeptidasen ist „Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA)“. Membranständige Aminopeptidasen, welche IC_{50} -Werte ab $50 \mu\text{M}$ aufweisen, gelten als Puromycin-insensitiv (Bukowska 2002). Der IC_{50} -Wert war mit $349 \mu\text{M}$ so hoch, dass man hier von einer solchen insensitiven Aminopeptidase sprechen würde. Beim Einsatz von $50 \mu\text{M}$ Puromycin war noch 85 % Restaktivität vorhanden, bei $100 \mu\text{M}$ 77 % und bei 1 mM noch 25 %. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Aminopeptidase bei *Bos taurus*, die bei 1 mM noch 26 % Restaktivität aufwies. Bei *Cavia porcellus*, *Oryctolagus cuniculus* und *Rattus norvegicus* waren bei $50 \mu\text{M}$ noch ca. 60 % Restaktivität vorhanden. Bei anderen Säugern wie *Ovis aries*, *Gallus gallus* und dem Menschen wurden stärkere Inhibitionen beobachtet. Bei *Sus scrofa* hatte Puromycin nur einen sehr schwachen Einfluss auf die Aminopeptidase-Aktivität.

4.2.3.3 Zink

Zink hatte einen starken inhibierenden Effekt auf die Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit von *Astacus* (IC_{50} -Wert von $3 \mu\text{M}$). Einen ähnlichen Einfluss hatte Zink auf Aminopeptidasen von *Bos taurus*, *Brucella melitensis* und dem Menschen. Bei *Rattus norvegicus* und *Streptomyces lividans* war der Einfluss von Zink nicht so stark. Bei *Bombyx mori* und *Streptococcus salivarius* waren noch etwa 20 % Restaktivität beim Einsatz von $100 \mu\text{M}$ bzw. $200 \mu\text{M}$ Zink vorhanden.

Es gibt verschiedene Erklärungen für die inhibitorische Wirkung von Zink, das gleichzeitig auch Co-Faktor des Enzyms ist. Bukowska (2002) vermutete, dass die Hemmung auf die Metall-katalysierte Oxidation der freien SH-Gruppen zurückzuführen sein könnte. Hirose et al. (1987) beobachteten bei Carboxypeptidasen, dass ein Überschuss von Zink eine kompetitive Hemmung bewirkte. Dafür fanden die zwei mögliche Erklärungen: 1) Überschüssige Ionen binden am aktiven Zentrum und blockieren somit die Bindungsstelle oder 2) sie binden an anderen Stellen des Enzyms und verändern somit die Konformation des

Enzyms und das Substrat kann somit nicht binden. Dies wurde auch für eine Aminopeptidase aus *Bombyx mori* beschrieben. Dort wirkte eine geringe Zinkkonzentration stimulierend, bei höheren Konzentrationen setzte eine Inhibition ein. Das ließ Hua et al. (1997) vermuten, dass das Enzym zwei zinkbindende Seiten hat, eine mit hoher Affinität und einer mit niedriger Affinität. Sind alle Bindungsstellen mit hoher Affinität belegt, so lagern sich die Zinkionen an Bindungsstellen mit niedriger Affinität an und die Inhibition setzt ein. Für eine Aminopeptidase aus Linsen wurden diese beiden zinkbindenden Orte identifiziert. Das Enzym enthielt einen Bindungsort, an dem Zink relativ stark gebunden war und einen, an den die Zinkionen locker gebunden waren und leicht gegen andere zweiwertige Ionen wie Mangan, Magnesium oder Cobalt ausgetauscht werden konnten (Morty und Morehead 2002).

4.2.3.4 Mangan

Beim Einsatz von 1 mM Mangan waren noch 14 % Restaktivität vorhanden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei *Bos taurus* und dem Menschen mit 5 bzw. 16 % Restaktivität. *E. coli* zeigte bei 1 mM Mangan eine mittlere Inhibition, wogegen *Bombyx mori* (91 %), *Rattus norvegicus* und *Lactobacillus lactis* dadurch kaum beeinflusst wurden. Die Inhibition ist wahrscheinlich auf die Wechselwirkung mit den schon bei Zink beschriebenen zinkbindenden Orten zurückzuführen.

4.2.4 pH-Optimum

Das pH-Optimum der *Astacus*-Aminopeptidase betrug pH 7,8. Viele der isolierten Aminopeptidasen aus der Datenbank zeigten ein Optimum im Bereich von pH 7, wie z.B. Aminopeptidasen aus *Brucella melitensis*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus lactis*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Novosphingobium capsulatum*, *Rattus norvegicus* und dem Menschen. Ein Optimum bei pH 8 zeigten die Enzyme von *Tenebrio molitor*, *Bombyx mori* und *E. coli*. Die charakterisierte Aminopeptidase aus *Gallus gallus* wies die optimale Aktivität im schwach sauren Bereich bei pH 6 auf.

4.2.5 Temperatur-Optimum und Aktivierungsenergie

Für die meisten Enzyme liegt das Temperatur-Optimum oberhalb der jeweiligen physiologisch relevanten Temperatur. Die Lage des Temperatur-Optimums ist von den Konzentrationen der Substrate und Effektoren des jeweiligen Enzyms, aber auch vom pH-Wert des Mediums abhängig (Löffler et al. 2007).

Das Temperatur-Optimum der isolierten Aminopeptidase lag im Bereich zwischen 40 und 50 °C. Die Aminopeptidasen aus der Datenbank zeigten ein ähnliches Verhalten. Eine Aminopeptidase aus *Lactobacillus lactis* hatte ein Optimum zwischen 37 und 40 °C. Isolierte Aminopeptidasen aus *E. coli* und *Brucella melitensis* hatten ein Optimum bei 40 °C. Ebenfalls in diesen Bereich fällt eine Aminopeptidase aus *Novosphingobium capsulatum*. Eine Aminopeptidase aus *Gallus gallus* hat die gleichen Optimalbedingungen wie jene aus *Astacus leptodactylus*.

Die mittels Arrhenius-Diagramm ermittelte Aktivierungsenergie für die Reaktion des isolierten Enzyms mit dem Substrat Ala-NA betrug 22,5 kJ/mol. Die Aktivierungsenergie wird durch das jeweilige Enzym und nicht durch das Substrat oder den Typ der Reaktion bestimmt. Sie liegt in einem Bereich von 20 bis 80 kJ/mol (Christen und Jaussi 2005). Laut Müller-Erlwein (2007) liegen die Werte in einem Bereich zwischen 30 bis 250 kJ/mol. Niedrigere Aktivierungsenergien, wie sie hier gegeben sind, bedingen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten (Silverthorn 2009).

4.2.6 Enzymkinetik

Die Versuche zur Bestimmung der K_M -Werte wurden nicht mit der aufgereinigten Aminopeptidase durchgeführt, sondern mit Magenflüssigkeit. Mit dem Substrat Leu-NA war der K_M -Wert mit etwa 0,2 mM am niedrigsten. Das bedeutet, dass die Affinität zwischen Enzym und Substrat hier am höchsten war. Beim Einsatz von Ala-NA war der K_M -Wert mit etwa 0,6 mM etwas größer. Mit Val-NA als Substrat war der K_M -Wert mit etwa 2 mM am größten, was bedeutet, dass Enzym und dieses Substrat die geringste Affinität zueinander hatten.

In der Datenbank fanden sich einige Aminopeptidasen mit ähnlichen K_M -Werten. Die meisten Daten wurden für die Substrate Ala-NA und Leu-NA gefunden (Tabelle 4.3

und 4.4). Gab es mehrere Werte für einen Organismus, so wurde der kleinste Wert gewählt.

Tabelle 4.3: K_M -Werte von Aminopeptidasen verschiedener Organismen, gemessen mit dem Substrat L-Alanin-4-Nitroanilid

| Organismus | K_M -Wert (mM) |
|---------------------------------|------------------|
| <i>Mizuhopecten yessoensis</i> | 0,0032 |
| <i>Bombyx mori</i> | 0,13 |
| <i>Brucella melitensis</i> | 0,35 |
| <i>E. coli</i> | 0,38 |
| <i>Cavia porcellus</i> | 0,6 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 1,4 |

Tabelle 4.4: K_M -Werte von Aminopeptidasen verschiedener Organismen, gemessen mit dem Substrat L-Leucin-4-Nitroanilid

| Organismus | K_M -Wert (mM) |
|---------------------------------|------------------|
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 0,17 |
| <i>Sus scrofa</i> | 0,20 |
| <i>E. coli</i> | 0,20 |
| <i>Bombyx mori</i> | 0,222 |
| <i>Homo sapiens</i> | 0,25 |
| <i>Spodoptera litura</i> | 1 |

Für den Umsatz des Substrates Val-NA lagen keine Daten vor.

4.2.7 Aminopeptidasen aus Crustaceen

Wie bereits eingangs erwähnt, gibt es nur wenige Daten für Aminopeptidasen aus Crustaceen. Am besten charakterisiert wurde eine Aminopeptidase aus dem Hepatopankreas des Sumpfkrebse *Procambarus clarkii*. Die Molmasse wurde mittels Gelfiltration bestimmt und betrug 74 kDa. Bei der SDS-Gelelektrophorese traten zwei Banden bei 28 kDa und 46 kDa auf, was zu der Einschätzung führte, dass es sich um ein Dimer handelte (De La Ruelle et al. 1992). Die Optima für den pH-Wert und die Temperatur lagen bei pH 8,6 bzw. 55 °C. Beim Einsatz von 1 mM Zinkionen war noch etwa 91 % Restaktivität vorhanden und bei der gleichen Konzentration an Mangan 21 %. Doke und Ninjoor (1987) kamen in Bezug auf die Inhibition auf ähnliche Werte für eine Aminopeptidase aus dem Muskelfleisch der Garnele *Penaeus indica*. Die Autoren untersuchten auch den Einfluss der

Aminopeptidase-Inhibitoren Puromycin und Bestatin in einer Konzentration von 1 mM und ermittelten Restaktivitäten von 19 bzw. 28 %. Die Optima für den pH-Wert und die Temperatur lagen mit pH 6,8 und 40 °C niedriger als die Werte für *Procambarus clarkii*. Eine von Buarque et al. (2009) charakterisierte Aminopeptidase aus der Mitteldarmdrüse der Garnele *Farfantepenaeus subtilis* hatte ihr pH Optimum bei pH 8. Das Temperatur-Optimum lag in einem Bereich zwischen 50 und 55 °C. Die hemmende Wirkung von 1 mM Bestatin war bei dieser Aminopeptidase mit 83 % Restaktivität allerdings eher gering. Glass und Stark (1994) beschrieben eine Aminopeptidase aus dem Hepatopankreas des Europäischen Hummers *Homarus gammarus* mit einem pH-Optimum von pH 7,9. Eine von Figueiredo et al. (2001) charakterisierte Aminopeptidase aus dem Verdauungstrakt des Rotscherenkrebsses *Cherax quadricarinatus* hatte ihr pH Optimum am Neutralpunkt. Die isolierte Aminopeptidase aus *A. leptodactylus* und die gerade beschriebenen Aminopeptidasen zeigten die größten Übereinstimmungen in Bezug auf die Optima für Temperatur und pH-Wert. Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Molmasse und vor allem bei der Wirkung von Inhibitoren und zweiwertigen Ionen.

4.2.8 Verwandtschaft zu Insekten

Beim Vergleich der isolierten Aminopeptidase aus *Astacus leptodactylus* mit Aminopeptidasen aus der Datenbank BRENDA fiel auf, dass Aminopeptidasen aus Insekten, wie beispielsweise aus dem Seidenspinner *Bombyx mori*, oft ähnliche Eigenschaften besaßen wie die der Krebse. Daher werden an dieser Stelle die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Insekten und den Crustaceen näher betrachtet.

Die Position der Crustacea innerhalb der Gruppe der Arthropoda wird permanent diskutiert (Giribet et al. 2005). Nach klassischer Auffassung bilden Myriapoden und Insekten ein Monophylum, das vor allem durch das Fehlen der bei Krebsen auftretenden 2. Antennen am Tritocerebralsegment (Interkalarsegment) gekennzeichnet ist, während die bei den beiden Gruppen vorhandenen Tracheen und Malpighischen Gefäße wahrscheinlich konvergenten Ursprungs sind. Neuere molekulargenetische, aber auch entwicklungsbiologische und morphologische Analysen legen dagegen eine engere Verwandtschaft zwischen Insekten und Krebsen nahe (Abb. 4.4).

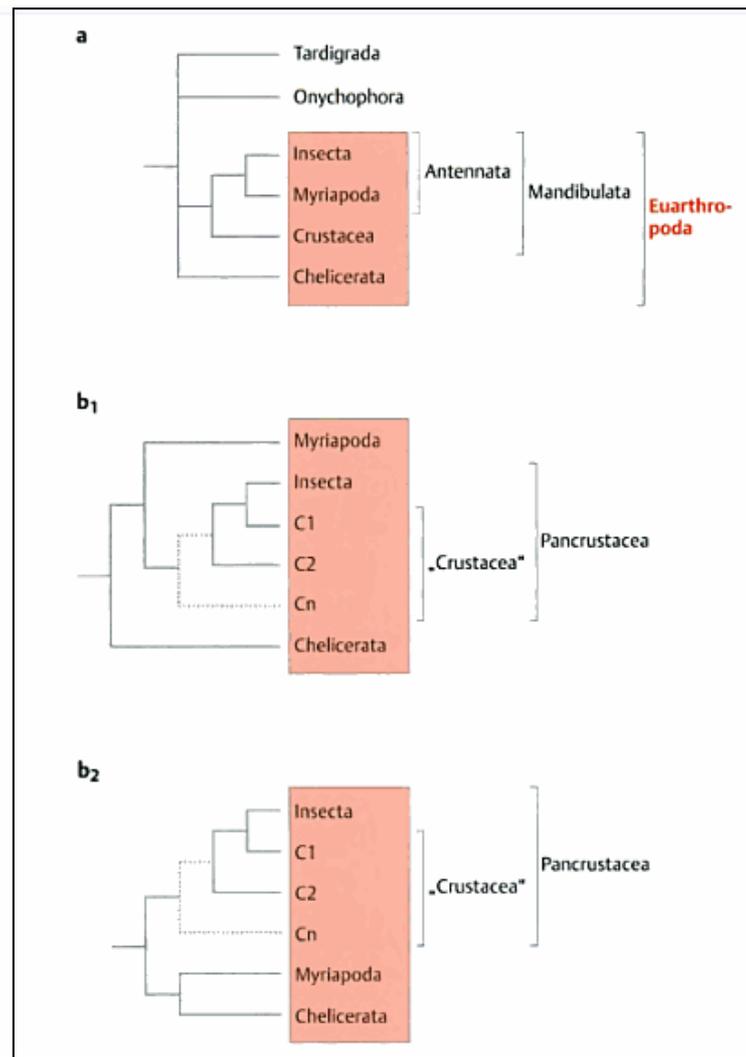


Abb. 4.4: Großgliederung der Arthropoden (Wehner und Gehring 2007). Traditionell (a) werden Mandibulata, bei denen die Extremitäten des 4. Kopfsegments zu Mandibeln differenziert sind und Antennata (= Tracheata = Monantennata), bei denen das 2. Antennenpaar reduziert ist, als Monophyla betrachtet. Molekulare Daten und eine Reihe morphologischer Merkmale sprechen dagegen für eine nähere Verwandtschaft von Insekten und Krebsen (b). Manche Analysen stellen zudem die Myriapoden in die Nähe der Cheliceraten (b₂).

Nach dieser Hypothese stehen die Insekten in einem Schwesterngruppenverhältnis zu einer Crustaceengruppe, bei der es sich möglicherweise um die Malacostracen handelt. Die Crustaceen selbst würden damit zu einem Paraphylum, Krebse und Insekten zusammen zu einem Monophylum. Molekulare Daten begünstigen zudem ein Schwesterngruppenverhältnis von Cheliceraten und Myriapoden (Wehner und Gehring 2007).

4.3 Naturstoffe aus aquatischen Quellen und ihre Anwendungen

Die Meere, Flüsse und Seen beinhalten eine Vielzahl an genetischem Material und besitzen daher ein enormes Potential für die Entdeckung verschiedenster Enzyme (Raa 1990). Die meisten Enzyme aus Fischen und aquatischen vertebraten kommen auch in terrestrischen Organismen vor (Haard 1998). Zwischen diesen beiden Gruppen gibt es jedoch Unterschiede bezüglich der Molmasse, der Aminosäure-Zusammensetzung, des pH-Optimums, des Temperatur-Optimums, der Stabilität, des Einflusses von Inhibitoren und kinetischer Eigenschaften (De-Vecchi und Coppes 1996).

Viele Enzyme lassen sich aus Reststoffen der Industrie gewinnen. Nur etwa 50 bis 60 % aller gefangenen Meerestiere sind für den menschlichen Verzehr bestimmt. Dadurch fallen jedes Jahr etwa 25 bis 30 Millionen Tonnen Fisch und Meeresfrüchte an, die verworfen werden. Viele dieser Abfälle bergen ein Potential für marine Enzyme (Osuna-Ruiz et al. 2010). In vielen Fällen weisen Enzyme aus Meerestieren mehrere Vorteile gegenüber Enzymen aus „klassischen“ Quellen auf. Die katalytischen Funktionen ähneln dabei denen von Enzymen aus Bakterien, Pflanzen und Säugetieren. Marine Enzyme unterscheiden sich zumeist dadurch, dass sie eine höhere Salztoleranz besitzen und ihr Temperaturoptimum niedriger liegt. Daraus ergibt sich im Umkehrschluss, dass sich diese Enzyme schon bei moderaten Temperaturen inaktivieren lassen. Sie sind daher vorteilhaft für Prozesse, bei denen viel Salz vorhanden ist, wie Fermentationen, Silagen und Fischsaucen. Abfälle aus Fisch und Meeresfrüchten könnten besser genutzt werden, um Stoffe wie Chitin, Enzyme, Öle, Vitamine, Farbstoffe und Aromastoffe zu extrahieren. Die Produktion von Chitosan, Gelatine und Fischleder ist ebenfalls denkbar. Die umfangreichst untersuchten Enzyme aus dem marinen Bereich sind Pepsine, Trypsine, Chymotrypsine, Elastasen, Collagenasen und alkalische Phosphatasen aus inneren Organen vom Dorsch *Gadus morhua*, aus dem Polardorsch *Boreogadus saida*, Dornhaien, Lachsen und tropischen Thunfischen (Le Gal 1999, Guérard et al. 2005).

4.3.1 Hydrolysate und Silagen aus Fischereiresten

Die Futtermittelindustrie verwertet viele verschiedene Proteinquellen wie Fleisch- und Knochenmehle, Geflügelmehle und Sojamehle. Alternative Proteinquellen finden sich in Fischnebenprodukten und Fischhydrolysaten. Obwohl die Vorteile von Substraten daraus schon 1990 (Willard) beschrieben wurden, werden diese aufgrund mangelnder Charakterisierung zu wenig ausgenutzt (Folador et al. 2006).

Eine Form der Verwertung ist das Herstellen von Fisch- bzw. Crustaceen-Silage. Fisch-Silage ist ein flüssiges Produkt, hergestellt aus ganzen Fischen oder Fischteilen. Zunächst wird der pH-Wert durch den Einsatz von Mineralsäuren auf Werte unter pH 4,5 gesenkt. Die Verflüssigung wird dann von endogenen Enzymen, die sich natürlich im Fisch befinden, vollzogen. Danach lassen sich Fischöle gut abtrennen. Die Proteine in der wässrigen Phase werden nun durch Trocknung gewonnen. Die Vorteile solcher Silagen sind die Verwertung von Fischereiabfällen, geringe Kosten, gute biologische Wertigkeit und gute Lagerfähigkeit. Großer Nachteil ist, dass der Hydrolysegrad nicht gezielt gesteuert werden kann.

Fisch-Protein-Hydrolysate sind Produkte mit einem hohen Proteingehalt und einer großen Breite an Anwendungsmöglichkeiten. Es gibt verschiedene Verfahren zur Gewinnung. So gibt es Verfahren, bei denen Säuren und Basen zum Einsatz kommen und solche, bei denen endogene Enzyme oder exogene Proteasen eingesetzt werden (Abb. 4.5). Beide Verfahren haben ihre Vor- und Nachteile und diese müssen für spezielle Anwendungsmöglichkeiten abgewogen werden (Guérard et al. 2005).

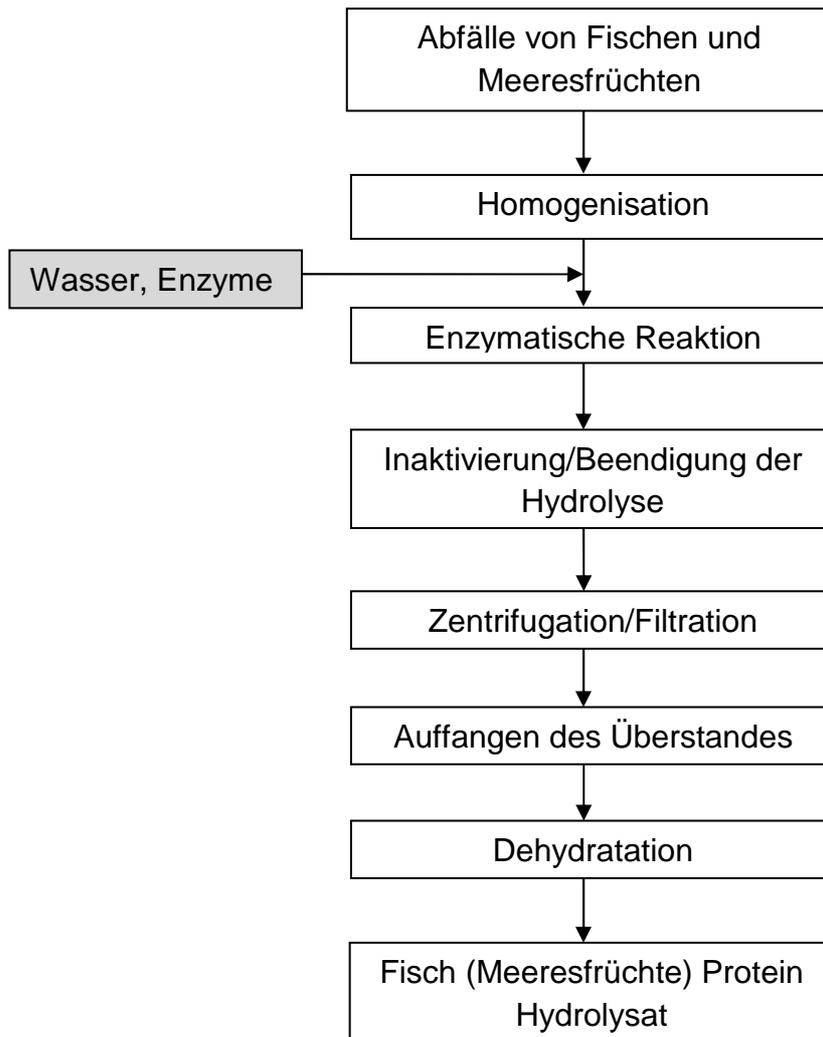


Abb. 4.5: Schema der Proteinhydrolysat-Herstellung aus Abfällen der Fischindustrie (Guérard et al. 2005)

Proteinhydrolysate können in vielen Bereichen der Industrie wie Pharmazie, Lebensmittel, Futtermittel oder Kosmetik eingesetzt werden. Sie sind ebenfalls sinnvoll als Stickstoffquelle in Nährböden für die Mikrobiologie (Quitain et al. 2001, Duarte de Holanda und Netto 2006). Neuerdings werden Proteinhydrolysate aus marinen Abfällen im Bereich Lebensmittelindustrie wegen ihrem hohen Proteingehalt eingesetzt (Córdova-Murueta et al. 2007). Proteinhydrolysate können als Emulgatoren in Salatdressings, Brotaufstriche, Eiscreme, Kaffeeweißer, Würstchen und Frühstücksfleisch eingesetzt werden (Saha und Hayashi 2001).

4.3.2 Anwendungen von Verdauungsenzymen in der Lebensmittelindustrie

Es gibt viele Anwendungsmöglichkeiten für aquatische Enzyme im Bereich der Lebensmittelindustrie. Proteasen, die aus Mitteldarmdrüsen von Tintenfischen gewonnen werden, werden bei der Fermentation getrockneter Tintenfische eingesetzt (Lee et al. 1982). Diese Proteasen können auch verwendet werden, um die Herstellung von Fischsaucen zu beschleunigen (Raksakulthai und Haard 1992). Auch eine Verbesserung des Geschmacks bei Cheddar-Käse konnte beobachtet werden (Raksakulthai et al. 2002). Enzyme werden ebenfalls beim Enthäuten von Meerestieren eingesetzt. Stefánsson und Steingrimsdottir (1990) entwickelten ein Verfahren zum Enthäuten von Rochen. Haut-Collagene werden dabei zunächst partiell gespalten durch schonende Hitzebehandlung und anschließend Einlegen in eine Enzymlösung für mehrere Stunden bei niederen Temperaturen. Es wirken unspezifische Proteasen und Carbohydate. Collagenasen aus der Mitteldarmdrüse von Krebsen werden beim Enthäuten von Tintenfischen und Shrimps eingesetzt, bei der Reifung von Salzfish und bei der Kaviarproduktion. Bei letzterem werden Membranen zerstört und die Eier nicht angegriffen. Es werden kälte-aktive Pepsine aus dem Dorsch *Gadus morhua* und dem Kaiserbarsch *Hoplostetus atlanticus* verwendet. Dadurch wird beim Lachs *Salmo salar* die Ausbeute um 70 bis 90 % gesteigert. Bei der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* wurde durch den Einsatz eines Proteasegemisches eine Steigerung um 50 % erzielt (Le Gal 1999, Guérard et al. 2005).

Aminopeptidasen können eingesetzt werden, um Bitterstoffe aus Proteinhydrolysaten zu entfernen (Saha und Hayashi 2001). Izawa et al. (1997) setzten erfolgreich Aminopeptidasen aus *Aeromonas caviae* T-64 ein um Proteinhydrolysate aus Milch (Casein) und Soja zu entbittern. Watanabe et al. (1990) mischten Caseinhydrolysat *Erwinia ananas* bei und erreichten den gleichen Effekt, da eine Exopeptidase freigesetzt wird, die bei niedrigen Temperaturen wirkt. Enzyme, isoliert aus der Mitteldarmdrüse von *Munida*, wurden erfolgreich beim Entfernen von Bitterstoffen aus Käse eingesetzt (Rossano et al. 2011). Aminopeptidasen können auch verwendet werden, um die Käsereifung zu beschleunigen. El Hofi et al. (2010) setzten der Rohmilch bei der Herstellung einer ägyptischen Käsesorte Aminopeptidasen zu. Dadurch beschleunigte sich die Reifung von 120 Tagen auf 60

Tage ohne sensorische Einbußen bzw. Veränderungen. Es wurden 0,06 U Amino-peptidase pro kg Milch eingesetzt.

5. AUSBLICK

Die Isolierung der Amino-peptidasen aus dem Flusskrebs *Astacus* wäre in Kombination mit der Aquakultur der Tiere denkbar. Die Tiere könnten ohne jeglichen Schaden mehrfach pro Woche beprobt werden und würden somit einen Beitrag zur nachhaltigen Verwertung von Ressourcen beitragen. Leider gibt es momentan kaum Aquakulturen für *Astacus*. Die Hälterung erweist sich als schwierig, denn die Tiere haben eine geringe Fortpflanzungsrate und eine niedrige Wachstumsrate. Ein weiteres Problem ist auftretender Kannibalismus. Aufgrund dieser Eigenschaften darf die Populationsdichte nicht sehr hoch sein, was zu Lasten der Wirtschaftlichkeit geht (Taugbøl und Skurdal 1988, 1990). Da große Bestände von *Astacus* immer wieder durch die vom Pilz *Aphanomyces astaci* hervorgerufene Flusskrebs-Pest zugrunde gehen, gewinnt in Skandinavien die Haltung vom Signalkrebs *Pacifastacus leniusculus* an Bedeutung (Pillay und Kutty 2005).

Die Versorgung mit *Astacus* wird daher mit Wildfängen sichergestellt. Den frisch gefangenen Tieren könnte nach dem Fang Magenflüssigkeit entnommen werden. Vorteil des Enzyms ist es, dass es bei niedrigen Temperaturen von 0 bis 7 °C recht stabil ist und somit keine besonderen Kühlvorrichtungen vonnöten wären. Die Aufreinigung könnte nach der in dieser Arbeit beschriebenen Arbeitsvorschrift vollzogen werden. So könnte durchschnittlich eine etwa 120-fache Aufreinigung mit einer spezifischen Aktivität von etwa 120 U/mg Protein erzielt werden.

In welchen biotechnologischen Prozessen die isolierte Amino-peptidase eine Rolle spielen könnte, müsste in nachfolgenden Untersuchungen eingehender betrachtet werden. Aufgrund der Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau und des pH-Optimums im alkalischen Bereich könnte diese Amino-peptidase eine Rolle bei der Herstellung von Fisch-Protein-Hydrolysat einnehmen, was in Versuchen allerdings noch zu zeigen wäre.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 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
- Bauer W (2002) Klonierung und Charakterisierung der humanen Puromycin-sensitiven Aminopeptidase. Dissertation, Universität Würzburg, pp 2-3
- Bauvois B, Dauzonne D (2006) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 26: 88-130
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brunet M, Arnaud J, Mazza J (1994) Gut structure and digestive cellular processes in marine Crustacea. *Oceanogr Mar Biol: an Annual Review* 32: 335-367
- Buarque DS, Castro PF, Santos FMS, Lemos D, Júnior LBC, Bezerra RS (2009) Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquacult Res* 40: 861-870
- Bukowska A (2002) Isolierung und biochemische Charakterisierung einer zytosolischen Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, pp 81-89
- Ceccaldi HJ (1997) Anatomy and physiology of digestive system. In: D'Abramo LR, Conklin DE, Akiyama DM (Eds.), *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol 6. The World Aquaculture Society, Los Angeles*, pp 261-291
- Christen P, Jaussi R (2005) *Biochemie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, p 56
- Córdova-Murueta JH, Navarrete-del-Toro MA, Garcia-Carreño FL (2007) Concentrates of fish protein from by catch species produced by various drying processes. *Food Chem* 100: 05-711
- Dall W, Moriarty DJW (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp 215-261
- De La Ruelle M, Hajjou M, Van Herp F, Le Gal Y (1992) Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *Biochem System Ecol* 20: 331-337
- De-Vecchi SD, Coppes Z (1996) Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and south-west Atlantic region – a review. *J Food Biochem* 20: 193-214
- Doke SN, Ninjoor V (1987) Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *J Food Sci* 52: 1203-1208
- Dombi GW (1992) Limitations of Augustinsson plot. *CABIOS* 8 (5): 475-479
- Duarte de Holanda H, Netto FM (2006) Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *J Food Sci* 71 (5): 298-303
- Edman P (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptidases. *Arch Biochem* 22: 475-476
- Ellis DA (1961) A new universal buffer system. *Nature* 191: 1099-1100

6 LITERATURVERZEICHNIS

- El Hofi M, Ismail A, Abd Rabo F, El-Dieb S, Ibrahim O (2010). Studies on acceleration of Ras cheese ripening by aminopeptidase enzyme from buffaloes' pancreas. II- Utilization of buffaloes' pancreas aminopeptidase in acceleration of Ras cheese ripening. *New York Science Journal* 3 (9)
- Hirsch GC, Jacobs W (1928) Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. I. Teil: Methodik und Technik. Der Beweis der Periodizität. *Z Vergl Physiol* 8: 102-144
- Jewell CSE, Winston GW (1988) Characterization of the microsomal mixed-function oxygenase system of the hepatopancreas and green gland of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol* 92B, No. 2, pp 329-339
- FAO (2008) Fishery and aquaculture statistics. FAO, Rome. Accessible at <http://www.fao.org/docrep/013/i1890t/i1890t.pdf> (26.4.2011)
- Figueiredo MSRB, Krickler JA, Anderson AJ (2001) Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *J Crust Biol* 21(2): 334-344
- Folador JF, Karr-Lilienthal LK, Parsons CM, Bauer LL, Utterback PL, Schasteen CS, Bechtel PJ, Fahey Jr. GC (2006) Fish meals, fish components, and fish hydrolysates as potential ingredients in pet foods. *J Anim Sci*. 84: 2752-2765
- Gibson R, Barker PL (1979) The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 17: 285-346
- Giribet G, Richter S, Edgecombe GD, Wheeler WC (2005) The position of crustaceans within Arthropoda – evidence from nine molecular loci and morphology. *Crustacean Issues* 16:307-352
- Glass HJ und Stark JR (1994) Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Comp Biochem Physiol* 108B: 225-235
- Guérard F, Sellos D, Le Gal Y (2005) Fish and shellfish upgrading, traceability. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 96: 127-163
- Haard NF (1998) Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technol* 53 (7): 64-67
- Hehemann JH, Redecke L, Murugaiyan J, Von Bergen M, Betzel C, Saborowski R (2008) Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochem Biophys Res Commun* 370: 566-571
- Hirose J, Ando S, Kidani Y (1987) Excess zinc ions are a competitive inhibitor for carboxypeptidase A. *Biochemistry* 26: 6561-6565
- Hooper NM (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* 354: 1-6
- Hua G, Tsukamoto K, Taguchi R, Tomita M, Miyajima S, Ikezawa H (1997) Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1383: 301-310
- Izawa N, Tokuyasu K, Hayashi K (1997) Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J Agric Food Chem* 45: 543-545
- Krüger P, Graetz E (1928) Die Fermente des Flusskrebsmagensaftes. Ein Beitrag zur Chemie der Verdauungsvorgänge bei Wirbellosen. *Zool Jb Abt allg Zool Physiol Tiere* 45: 463-514
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):580-585
- LeBlanc GA (2007) Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16 (1): 61-81
- Lee YZ, Simpson BK, Haard NF (1982) Supplementation of squid fermentation with proteolytic enzymes. *J Food Biochem* 6: 127-134
- Le Gal Y (1999) Enzymatic upgrading of fish and crustacean products. *Qatar Univ Sci J*, 19

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) Biochemie & Pathobiochemie. 8th edn. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp 127-129
- Loizzi RF (1971) Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z Zellforsch*, 113: 420-440
- Merrill DP, Reife RA, Tiersch TR, Austin RS (1985) Histochemical und biochemical studies of the hepatopancreas peroxidase of the freshwater crayfish, *Cambarus robustus*. *J Morphol* 184: 171-182
- Michaelis L, Menten M (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49: 333-369
- Möhrlen F (2002) Analyse der Struktur, Funktion und Evolution der Astacin-Protein-Familie. Dissertation, Universität Heidelberg, pp 3-100
- Morty RE, Morehead J (2002) Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species. *J Biol Chem* 277: 26057-26065
- Müller-Erlwein E (2007) Chemische Reaktionstechnik. 2nd edn. Teubner, Wiesbaden, p 73
- New MB (1976) A review of dietary studies with shrimps and prawns. *Aquaculture* 9: 101-144
- Osuna-Ruiz I, Yepiz-Plascencia G, Rouzaud-Sández O, Ezquerro-Brauer JM (2010) Aminopeptidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas: purification, characterisation, and casein hydrolysis. *Int J Food Sci Technol* 45: 387-394
- Pillay TVR, Kuttu MN (2005) Aquaculture: principles and practices. 2nd edn. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp 510-518
- Pingoud A, Urbanke C (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. De Gruyter, Berlin, pp 164-166
- Quitain AT, Sato N, Daimon H, Fujie K 2001 Production of valuable materials by hydrothermal treatment of shrimp shells. *Ind Eng Chem Res* 40 (25): 5885-5888
- Raa J (1990) Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway. In: Voigt MN, Botta JR (Eds.), *Advances in Fisheries and Biotechnology for Increased Profitability*, Technomic, Lancaster, pp 509-524
- Raksakulthai N, Haard NF (1992) Correlation between the concentration of peptides and amino acids and the flavor of fish sauce. *ASEAN Food Journal* 7: 86-90
- Raksakulthai R, Rosenberg M, Haard NF (2002) Accelerated Cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J Food Sci* 67: 923-929
- Rehm H, Letzel T (2009) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6th edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, p 316
- Rehner G, Daniel H (2010) *Biochemie der Ernährung*. 3rd edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 11-13
- Rossano R, Larocca M, Lamaina A, Viggiani S, Riccio P (2011) The hepatopancreas enzymes of the crustaceans *Munida* and their potential application in cheese biotechnology. *LWT Food Sci Technol* 44: 173-180
- Rustad T (2003) Utilisation of marine by-products. *Electr J Environ Agric Food Chem* 2 (4): 458-463
- Saha BC, Hayashi K (2001) Debitting of protein hydrolyzates. *Biotechnol Adv* 19: 355-370
- Silverthorn DU (2009) *Physiologie*. 4th edn. Pearson Studium, München, pp 139-142
- Stefánsson G, Steingrimsdóttir G (1990) Application of enzymes for fish processing in Iceland – present and future aspects. In: Voigt MN, Botta JR (Eds.), *Advances in Fisheries and Biotechnology for Increased Profitability*, Technomic, Lancaster, pp 237-250
- Stöcker W, Zwilling R (1995) Astacin. *Methods Enzymol* 248: 305-325

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Storch V, Welsch U (2009) Kükenthal Zoologisches Praktikum. 26th edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 213-243
- Taugbøl T, Skurdal J (1990) Effect of density on brood size in noble crayfish, *Astacus astacus* L., subjected to indoor rearing conditions. *Aquacult Fish Manage* 21: 17-23
- Taugbøl T, Skurdal J (1988) Increased proportion of mature females of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in culture conditions. *Aquaculture* 69: 39-42
- Titani K, Torff HJ, Hormel S, Kumar S, Walsh KA, Rodl J, Neurath H, Zwilling R (1987) Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. *Biochem* 26: 222-226
- Travis D (1955) The molting cycle of spiny lobster *Panulirus argus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol Bull* 108 (1): 88-112
- 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 (1994) Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* 114: 83-101
- Vogt G (1996) Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapod crustaceans. *Eur J Physiol* 431:R239-R240
- Vonk HJ, Western JRH (1984) Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion. Academic Press, London, Orlando, pp 200-225
- Walther M (2008) Krebstiere (Crustacea) – Biologie, Vorkommen, Haltung und Erkrankungen, sowie ihre Bedeutung als Zootierobjekte und Lebensmittelressourcen – Literaturstudie. Dissertation. Universität Gießen, pp 23-106
- Watanabe M, Shimizu J, Arai S (1990) Debittering of a tryptic hydrolyzate of casein by incubating with the ice nucleation-active bacterium, *Erwinia ananas*, and its aminopeptidase at low temperature. *Agric Biol Chem* 54: 3351-3
- Wehner R, Gehring W (2007) Zoologie. 24th edn. Thieme, Stuttgart, pp 737-739
- Wigglesworth (1972) The principles of insect physiology. 7th edn. Methuen & Co. Ltd., London, p 264
- Willard T (1990) Utilization of marine by-products in pet foods. In: Keller (ed.), Making Profits out of Seafood Wastes, Alaska Sea Grant Program, Fairbanks, pp 121-125
- Xu W, Li Q (2005) Progress in the development of aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors. *Curr Med Chem – Anti-Cancer Agents* 5: 281-301

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Krebstieren (Crustaceen) wird eine Vielzahl von Naturstoffen gewonnen. Dazu zählen z.B. Chitin und Chitosan, Öle, Enzyme, Aromastoffe und Vitamine. Enzyme aus dem Verdauungstrakt Höherer Krebse (Malacostraca) bergen dabei aufgrund ihrer besonderen katalytischen Eigenschaften ein hohes Potential für technologische Anwendungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Galizische Sumpfkrebs *Astacus leptodactylus*, der Taschenkrebs *Cancer pagurus* und der Amerikanische Hummer *Homarus americanus* auf ihre Aminopeptidase-Aktivität in der Magenflüssigkeit und in Extrakten der Mitteldarmdrüse untersucht. Die Enzyme der drei Arten unterschieden sich sowohl in ihren Substratspezifitäten, den pH-Optima und den spezifischen Aktivitäten. Dies deutete auf unterschiedliche Strategien der Nahrungsverwertung hin. Aufgereinigt und näher charakterisiert wurde schließlich eine extrazelluläre Aminopeptidase aus der Magenflüssigkeit des Flusskrebses *Astacus leptodactylus*. Die Aufreinigung des Enzyms wurde mittels Ionenaustauschchromatographie über zwei starke Anionenaustauschersäulen vollzogen. Bei der isolierten Aminopeptidase handelte es sich um ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 78 kDa (SDS-PAGE) bzw. 92 kDa (Gelfiltration). Das Enzym besteht wahrscheinlich aus vier Unter-einheiten. Die Ergebnisse der ICP-Massenspektrometrie ließen zudem den Schluss zu, dass Zink ein Co-Faktor des Enzyms ist. Außerdem wurde der Einfluss zweiwertiger Kationen und spezifischer Aminopeptidase-Inhibitoren untersucht. Zink-Ionen und Mangan-Ionen sowie der spezifische Inhibitor Bestatin zeigten die stärkste inhibitorische Wirkung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die isolierte Aminopeptidase nicht zur Gruppe der „Puromycin-sensitiven Aminopeptidasen“ gehört. Das pH-Optimum lag im schwach alkalischen Bereich bei pH 7,8 und das Temperatur-Optimum zwischen 40 und 50 °C.

Aufgrund dieser Eigenschaften und ihrer hohen Stabilität besitzt das isolierte Enzym ein großes Potential für den Einsatz in biotechnologischen Prozessen.

In der Lebensmittelindustrie finden Aminopeptidasen hauptsächlich Anwendung bei der Entfernung unerwünschter Bitterstoffe. Weitere spezielle Anwendungen der isolierten Aminopeptidase aus *Astacus leptodactylus* müssten in nachfolgenden Untersuchungen eingehender betrachtet werden.