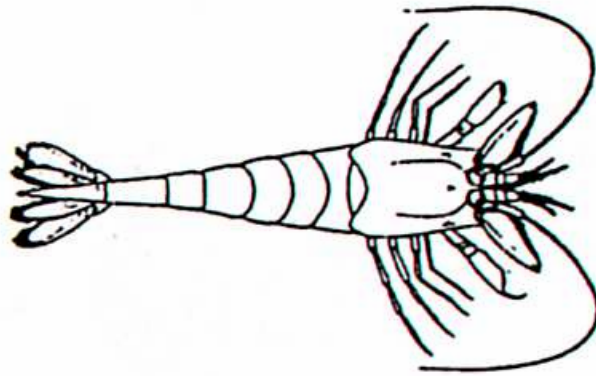


**Enzymatische Nahrungsverwertung der  
Nordseegarnelen  
*Crangon crangon* und *Crangon allmani*  
(Dekapoda, Caridea):  
Zusammensetzung, Eigenschaften und  
katalytisches Potential von Endopeptidasen**



**Diplomarbeit**

Vorgelegt von

**Mathias Teschke**

**Helgoland im Mai 2003**

Referentin: Prof. Dr. A. Brandt  
Korreferent: Prof. Dr. F. Buchholz  
Externer Betreuer: Dr. R. Saborowski

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Tiermaterial und Probennahme</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Probenaufbereitung</b> .....	<b>6</b>
2.2.1 Gewebepräparation .....	6
2.2.2 Proteinextraktion .....	7
<b>A. Enzymatisch – analytische Untersuchungen</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3 Quantifizierung der Enzymaktivität</b> .....	<b>7</b>
2.3.1 Gesamtproteinase .....	7
2.3.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	9
2.3.1.2 Ermittlung spezifischer Eigenschaften der Gesamtproteinase .....	11
2.3.2 Trypsin .....	13
<b>2.4 Charakterisierung des Enzymspektrums</b> .....	<b>15</b>
2.4.1 Anionenaustauschchromatographie .....	15
2.4.1.1 Semi-quantitative Aktivitätstests .....	17
2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	20
2.4.2 Affinitätschromatographie .....	21
2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	22
<b>B. Experimentell – vergleichende Untersuchungen</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Quantifizierung der Enzymaktivität</b> .....	<b>29</b>
3.1.1 Gesamtproteinase .....	29
3.1.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	29
3.1.1.2 Ermittlung spezifischer Eigenschaften der Gesamtproteinase .....	32
3.1.1.3 Spezifische Aktivität .....	35
3.1.2 Trypsin .....	36
3.1.2.1 Spezifische Aktivität .....	36
3.1.2.2 Trypsin / Gesamtproteinase Verhältnis .....	37
3.1.2.3 Häufigkeitsverteilung .....	38
3.1.2.4 Trypsin / Gesamtproteinase Beziehung .....	39
3.1.3 Allometrische Beziehung .....	40
<b>3.2 Charakterisierung des Enzymspektrums</b> .....	<b>41</b>
3.2.1 Anionenaustauschchromatographie .....	41
3.2.1.1 Gesamtproteinase .....	41
3.2.1.2 Einfluss spezifischer Inhibitoren .....	43
3.2.1.3 Identifikation einzelner Proteinase und Peptidasen .....	44
3.2.2 Affinitätschromatographie .....	53
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	55
3.2.3.1 Identifikation einzelner Proteinase .....	55
3.2.3.2 Identifikation trypsinähnlicher Serinproteinase .....	63

<b>3.3 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Gesamtproteinase .....	66
3.3.1.1 Spezifische Aktivität.....	66
3.3.1.2 Anteil der Mitteldarmdrüse am Gesamtgewicht.....	67
3.3.2 Trypsin.....	68
3.3.2.1 Spezifische Aktivität.....	68
3.3.2.2 Häufigkeitsverteilung .....	69
3.3.2.3 Trypsin /Gesamtproteinase Beziehung.....	71
3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	72
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1 Quantifizierung der Gesamtproteinase-Aktivität.....	75
4.2 Quantifizierung der Trypsin-Aktivität .....	80
4.3 Chromatographie.....	83
4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	87
4.5 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum.....	91
4.6 Schlußbetrachtung und Ausblick.....	94
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>99</b>

## **Anhang**

## 1. Einleitung

Die Nordseegarnele *Crangon crangon* (Linnaeus 1758) lebt bevorzugt auf sandigen oder schlickigen Substraten seichter, küstennaher Gewässer von der Ostsee über das Mittelmeer bis zum Schwarzen Meer. Besonders häufig ist die Art jedoch in der Nordsee vertreten, wo sie mit einer durchschnittlichen Anlandung von ca. 20000 Tonnen pro Jahr einer der wirtschaftlich bedeutendsten Crustaceenarten ist und vor allem im Wattenmeer eine zentrale ökologische Rolle einnimmt (Tiews 1970). Als wichtiger benthischer, vorwiegend karnivorer Räuber nimmt diese Garnele mit einer Körperlänge bis zu 90 mm dabei Einfluß auf die Struktur und Funktion der In- und Epifauna (Reise 1978, Beukema 1992, van der Veer 1998), während die Art selbst gleichzeitig eine wichtige Nahrungsgrundlage vieler Fischarten ist. Am Tage ist *C. crangon* in der Regel bis zu den Augen und den Antennen im Sediment eingegraben, während die Nacht zur Nahrungssuche genutzt wird. Die Reproduktion von *C. crangon* ist durch protandrischen Hermaphroditismus gekennzeichnet, wobei die Fortpflanzung ein- oder zweimal im Sommer und einmal im Winter stattfindet. Die geschlüpften Larven durchlaufen alle Larvalstadien im Plankton und wandern erst als ca. 5 mm lange Jungtiere in das Watt ein.

Nach *C. crangon* ist die nahverwandte Garnele *Crangon allmani* (Kinahan 1857) die zweithäufigste Art der Gattung in der Nordsee. *C. allmani* läßt sich morphologisch deutlich durch eine tiefe longitudinale Rinne und zwei parallele Carinae auf dem sechsten Abdominalsegment von *C. crangon* abgrenzen. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind die geringere Größe der Tiere mit durchschnittlich bis zu 75 mm und eine bräunlich-rötlichere Färbung mit dunkleren Chromatophoren. Im Gegensatz zu *C. crangon* ist nur sehr wenig über die Biologie von *C. allmani* bekannt. Die ausführlichste Beschreibung über Morphologie und Verbreitung erfolgte durch die Arbeit von Allen (1960) in den Gewässern um die Küste Northumberlands. Es folgten einige weitere Arbeiten über andere Gebiete der Nordsee sowie über die Larvalentwicklung. Anders als bei *C. crangon* findet man *C. allmani* nur im Winter zwischen Oktober und April in höherer Abundanz in küstennahen, seichten Gewässern, während die Tiere im Sommer offensichtlich tiefere und kältere Gewässerbereiche bevorzugen. So zeigte eine Populationsstudie über *C. allmani* in der Deutschen Bucht, daß die einzige sich reproduzierende Population der Art in der Helgoländer Tiefen Rinne zu finden war, während in seichteren küstennahen Gewässern nur während des Frühlings bei kälteren Wassertemperaturen eine höhere Abundanz der Tiere zu verzeichnen war (Blahudka & Turkey 2002). Die Tiefe Rinne repräsentiert ein isoliertes, relativ tiefes (59 m) Gebiet in der Deutschen Bucht mit anderen hydrographischen Bedingungen und einem sekundären Hartsubstrat aus Muschelschalen.

Obwohl die Nordseegarnele *C. crangon* aufgrund ihrer wichtigen ökologischen und kommerziellen Bedeutung Gegenstand zahlreicher und diverser wissenschaftlicher Untersuchungen war (Redant 1984), insbesondere im Zusammenhang mit populations-, reproduktions- und ernährungsbiologischen Fragestellungen, existieren jedoch keine spezifischen Erkenntnisse über die Zusammensetzung und Eigenschaften von Verdauungsenzymen der Art. Dies gilt um so mehr für die nahverwandte Nordseegarnele *C. allmani*. Beide Arten sind in der Lage, sich auf der Grundlage eines breiten Nahrungsspektrums an unterschiedliche Zusammensetzungen der benthischen Gemeinschaft und an wechselnde Ernährungsbedingungen anzupassen (Pihl & Rosenberg 1984, Allen 1960). Gerade in diesem Zusammenhang ist eine nähere Untersuchung der Verdauungsenzyme jedoch von Interesse.

Entsprechend der häufigsten Nahrungsbestandteile findet man bei Crustaceen vorwiegend Proteasen, Glucanasen und Lipasen, die biogene Makromoleküle wie Proteine, Chitin, Cellulose und Fette spalten.

Unter diesen Enzymen sind die Proteasen in der Regel durch ein weites Spektrum verschiedener Enzyme vertreten (Ceccaldi 1998). Proteasen haben die Eigenschaft, die Hydrolyse von Peptidbindungen (Amidbindungen) zu katalysieren, so daß man auch von Peptidhydrolasen spricht. Alle Proteasen zeigen dabei einen ähnlichen Mechanismus. Ein nukleophiler Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom einer Peptidbindung spaltet die kovalente Bindung. Hinsichtlich der Position der gespaltenen Peptidbindung in der Polypeptidkette des Proteins lassen sich die Proteasen in verschiedene Unterklassen aufteilen. Grundsätzlich unterscheidet man Peptidasen (Exopeptidasen) von Proteinasen (Endopeptidasen). Peptidasen hydrolysieren Peptidbindungen neben dem Amino- oder dem Carboxy-terminalen Ende des Proteins, so daß wiederum Aminopeptidasen von Carboxypeptidasen unterschieden werden können. Proteinase hingegen hydrolysieren Peptidbindungen innerhalb eines Proteins. Je nach Aufbau des aktiven Zentrums unterscheidet man Serin-, Cystein- und Aspartat-Endopeptidasen. Eine vierte Gruppe bilden die Metallo-Endopeptidasen, die für die Katalyse ein bivalentes Metallion als Cofaktor benötigen. Insbesondere die Proteinase sind bei Crustaceen sehr vielfältig und besitzen in der Regel eine hohe Aktivität (Gibson & Barker 1979, Honjo et al. 1990, García-Carreño 1992). So konnten zum Beispiel die Serin-Proteinase Trypsin und Chymotrypsin aus der Mitteldarmdrüse von *Penaeus vannamei* isoliert und charakterisiert werden (Van Wormhoudt 1992). Ebenfalls an *P. vannamei* gelang der Aktivitätsnachweis einer Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteinase (Le Boulay et al. 1996). In verschiedenen Crustaceen wurde die Metallo-Proteinase Astacin nachgewiesen, die zuerst bei *Astacus astacus* gefunden wurde (Zwilling et al. 1969).

Trypsin ist die Hauptproteinase, die in Crustaceen gefunden wird, und insgesamt eines der häufigsten proteolytischen Verdauungsenzyme im Tierreich. Aufgrund verschiedener funktionaler Unterschiede im Vergleich zum Trypsin der Säugetiere spricht man bei den Crustaceen jedoch einschränkend von Trypsin-ähnlichen Proteinase (Dittrich 1992). Als Endopeptidase spaltet Trypsin bevorzugt Peptidbindungen, die die Carboxylgruppe basischer Aminosäuren (Arginin, Lysin) enthalten. Das aktive Zentrum des Enzyms wird von den Aminosäuren Serin (s.o.), Histidin und Aspartat gebildet, einer sogenannten katalytischen Triade. Das Enzym wird bei Crustaceen in der Regel in großen Mengen synthetisiert und kann bis zu einem Drittel des löslichen Proteins der Mitteldarmdrüse stellen (Ceccaldi 1998). In verschiedenen Arbeiten wurden die i.a. sehr hohen Trypsinaktivitäten bei verschiedenen Crustaceen aufgezeigt (Murthy & Saxena 1979, García-Carreño et al. 1994, García-Carreño et al. 1997, Hernandez-Cortes et al. 1997, Le Moullac et al. 1997) sowie mehrere Isoformen des Enzyms beschrieben (Osnes & Mohr 1985).

Vorläufige Untersuchungen an der Nordseegarnele *C. crangon* und *C. allmani* ergaben jedoch ungewöhnlich geringe Trypsin-Aktivitäten, obwohl gleichzeitig eine relativ hohe Gesamtproteinase-Aktivität festgestellt werden konnte (Saborowski, pers. Mitteilung). Die Gründe für die geringen Trypsin-Aktivitäten bei *C. crangon* und *C. allmani* sind bisher nicht bekannt und es wurden bisher keine vertieften Untersuchungen über die Zusammensetzung und Eigenschaften von Verdauungsenzymen bei den Nordseegarnelen durchgeführt (s.o.). Es stellen sich also folgende grundlegenden Fragen:

- Lassen sich die bisher festgestellten geringen Trypsin-Aktivitäten bei gleichzeitig hohen Aktivitäten der Gesamtproteinase verifizieren ?
- Welche anderen Endopeptidasen sind für die Gesamtproteinase-Aktivität verantwortlich und ersetzen bzw. kompensieren ggf. Trypsin ?
- Stehen die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten in einem kausalen Zusammenhang mit einer Anpassung der Nordseegarnelen an spezifische Ernährungsbedingungen ?

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative und qualitative Untersuchung proteolytischer Verdauungsenzyme an Mitteldarmdrüsenextrakten der dekapoden Nordseegarnelen *C. crangon* und *C. allmani*. Erstmalig sollen die Zusammensetzung, Eigenschaften und das katalytische Potential von Endopeptidasen dieser Arten näher beschrieben werden. In enzymatisch-analytischen Untersuchungen sollen zunächst die Reaktionsbedingungen des Gesamtproteinase-Assays optimiert werden. Anschließend wird die Aktivität der Gesamtproteinase in Rohextrakten von Mitteldarmdrüsen der Nordseegarnelen quantifiziert. Weiterhin sollen spezifische Eigenschaften der Gesamtproteinase untersucht werden. Insbesondere soll in diesem Zusammenhang durch die Verwendung spezifischer Proteinaseinhibitoren der quantitative Anteil einzelner Proteinaseklassen an der Gesamtproteinase-

Aktivität bestimmt werden. Neben der Gesamtproteinase wird die Aktivität des proteolytischen Enzyms Trypsin quantifiziert. Die spezifischen Enzymaktivitäten sowie die sich daraus ergebenden Trypsin/Gesamtproteinase Verhältnisse sollen vergleichend anderen Crustaceen gegenüber gestellt werden.

Im Rahmen qualitativer Untersuchungen werden im folgenden einzelne Proteinase über flüssigchromatographische Verfahren sowie durch gelelektrophoretische Methoden isoliert bzw. partiell charakterisiert.

Abschließend wird anhand experimentell-vergleichender Versuche der Einfluss des Nahrungsangebotes auf die Expression bzw. auf die Zusammensetzung des proteolytischen Enzymspektrums von *C. crangon* untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Nahrung und der Intensität der Trypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität aufzuzeigen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiermaterial und Probennahme

Für diese Arbeit wurden neben den beiden im Mittelpunkt der Untersuchungen stehenden Arten *C. crangon* und *C. allmani* folgende weitere Crustaceen zu vergleichenden Untersuchungen herangezogen: *Euphausia superba* (Euphausiacea), *Penaeus californiensis* (Dekapoda, Penaeidea), *Pandalus montagui* (Dekapoda, Caridea), *Pagurus bernhardus* (Dekapoda, Anomura), *Cancer pagurus* (Dekapoda, Brachyura).

Die Probennahme von *C. crangon*, *C. allmani* und *P. montagui* erfolgte mit Hilfe einer Krabbenkurre von Bord des Forschungskutters „Uthörn“ an drei verschiedenen Stationen in der Deutschen Bucht. *C. crangon* wurde nordöstlich der Insel Helgoland sowie in der Elbemündung, *C. allmani* und *P. montagui* in der Tiefen Rinne bei Helgoland gefangen.

*P. bernhardus* sowie *C. pagurus* wurden ebenfalls in der tiefen Rinne bei Helgoland mit einer Dredge von Bord der „Uthörn“ gefangen.

Tabelle 1: Fanggebiete der in der Deutschen Bucht gefangenen Arten

Art	Fanggebiet	Position	Fanggerät	Tiefe (m)	Zeit (min)	Datum
<i>C. crangon</i>	Helgoland	54° 16' 50" N, 07° 56' 20" E	Krabbenkurre	20	20	07.08.02
						05.02.03
	Elbemündung	54° 02' 54" N, 08° 27' 20" E	Krabbenkurre	12	12	16.10.02
<i>C. allmani</i>	Tiefe Rinne	54° 08' 20" N, 07° 54' 31" E	Krabbenkurre	48	15	07.08.02
<i>P. montagui</i>	Tiefe Rinne	54° 08' 20" N, 07° 54' 31" E	Krabbenkurre	48	15	07.08.02
<i>P. bernhardus</i>	Tiefe Rinne	54° 08' 20" N, 07° 54' 31" E	Dredge	42	5	07.08.02
<i>C. pagurus</i>	Tiefe Rinne	54° 08' 20" N, 07° 54' 31" E	Dredge	42	5	07.08.02

Unmittelbar nach dem Fang wurden die Tiere vorsichtig aus dem Netz in große Hälterungsbecken (100 l) überführt und bis zur Rückkehr an Land im Durchfluss gehalten, wobei geschädigte Tiere regelmäßig aussortiert wurden. Nach Ankunft an Land wurden die Versuchstiere in die Durchflussbecken des BAH-Ökolabors (Biologische Anstalt Helgoland) überführt. Für die anschließende Probenaufbereitung (s. 2.2) wurden nur adulte, unverletzte und agile Tiere verwendet, die sich im Zwischenhäutungsstadium befanden.

*E. superba* wurde im Rahmen einer im Vorfeld durchgeführten Antarktis Expedition nahe der Antarktischen Halbinsel gefangen. Einige der bei – 80 °C gelagert Tiere konnten für diese Arbeit verwendet werden.

Für *P. californiensis* wurden bereits lyophilisierte Mitteldarmdrüsen der Tiere eingesetzt, die von der BAH für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

## 2.2 Probenaufbereitung

Die quantitative und qualitative Charakterisierung ausgewählter Verdauungsenzyme wurde an Rohextrakten der Mitteldarmdrüse durchgeführt. Die Herstellung dieser Extrakte erfolgte für alle untersuchten Arten nach folgendem Schema:

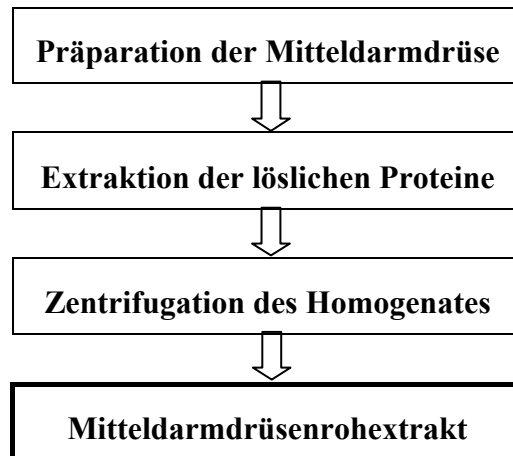


Abb. 1: Genereller Arbeitsablauf für die Herstellung eines Mitteldarmdrüsenrohextraktes

### 2.2.1 Gewebepräparation

Für die Herstellung der Rohextrakte wurden möglichst vollständige Mitteldarmdrüsen verwendet. Die Präparation erfolgte an den frisch gefangenen Tieren unter einem Binokular (Wild). Bei *C. crangon* und *C. allmani* wurde zuvor das Frischgewicht, die Gesamtlänge, die Carapaxlänge und das Geschlecht der Tiere bestimmt. Nach Dekapitation und Entfernung des Carapax wurde die Mitteldarmdrüse entnommen und in zuvor gewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Bedingt durch die große Masse der Mitteldarmdrüse bei *C. pagurus* und *E. bernhardus* wurden Unterproben des Gewebes entnommen. Andere Gewebebestandteile wie Magen, Darm, und Bindegewebe wurden von der Mitteldarmdrüse so weit wie möglich getrennt.

Durch erneute Wägung der Reaktionsgefäße wurde die Gewebeeinwaage festgestellt. Die Proben wurden danach bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt.

Bei *E. superba* erfolgte die Präparation unter dem Binokular wie zuvor beschrieben, jedoch an gefrorenen Tieren.

## 2.2.2 Proteinextraktion

Die Mitteldarmdrüsen wurden mechanisch aufgeschlossen. Dazu wurde das Mitteldarmdrüsenengewebe zunächst mit 1 ml kaltem demineralisiertem Wasser (A. dem.) versetzt. Der Probenaufschluß erfolgte mit Hilfe eines Ultraschallstabes. Bei dieser Methode wird die Energie eines Ultraschallgenerators (Sonifier Cell Disruptor B 15, Branson) über eine Titanspitze in die Probenlösung abgeleitet, wodurch dort durch starke Druckänderungen Scherkräfte auftreten, die zum Zellaufschluß führen. Um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden, erfolgte die Beschallung in kurzen Intervallen von ca. 3 x 5 s unter permanenter Kühlung in einem Eisbad. Von den lyophilisierten Mitteldarmdrüsen von *P. californiensis* wurden Unterproben entnommen und direkt in 1 ml A. dem. aufgenommen.

Die so gewonnenen Mitteldarmdrüsenhomogenate wurden anschließend zur Entfernung aller Zelltrümmer und unlöslicher Probenbestandteile bei 13.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert (Biofuge 13 R, Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde vorsichtig in neue Reaktionsgefäße überführt und für die weitere Verarbeitung auf Eis gelagert oder bei -80 °C aufbewahrt.

Anhand der Gewebeeinwaage  $G$  ( $g_{fw}$ ) und dem eingesetzten Probenvolumen  $V$  (ml) ergab sich die Gewebekonzentration  $C$  in den Rohextrakten aus folgender Formel:

$$C_{\text{Gewebe}} = G \times V^{-1} \quad (g \times ml^{-1})$$

$V = \text{Probenvolumen (1,0 ml)}$

Für *P. californiensis* konnte aufgrund der nicht bekannten Gewebeeinwaage der Mitteldarmdrüsen keine Gewebekonzentration in den Rohextrakten berechnet werden.

## A. Enzymatisch – analytische Untersuchungen

### 2.3 Quantifizierung der Enzymaktivität

#### 2.3.1 Gesamtproteinase

Die Enzymaktivität der Gesamtheit der Proteinase wurde in den Mitteldarmdrüsenextrakten mit Hilfe des künstlichen Substrates Azocasein ermittelt (nach García-Carreño 1992).

Azocasein ist eine chemisch modifizierte Form des natürlich vorkommenden Milcheiweißes, das als Substrat für die quantitative Erfassung der Proteinaseaktivität entwickelt wurde. Phenyl- bzw. Tryptophanreste der Aminosäurekette des Caseins werden durch chemische Addition von chromophoren Sulfanilamidgruppen diazotiert. Die durch konjugierte Doppelbindungen orangefarbenen Sulfanilamidgruppen sind dabei kovalent an die Peptiduntereinheiten gebunden.

Aufgrund dieser chemischen Konfiguration bietet Azocasein als künstliches Substrat einer breiten Palette von Proteinase eine hydrolytische Angriffsfläche und ermöglicht gleichzeitig eine relativ unkomplizierte Quantifizierung der Gesamtproteinase-Aktivität.

Im enzymatischen Testverfahren wird das Substrat Azocasein durch die zu quantifizierenden Proteinase hydrolytisch gespalten. Der Reaktionsverlauf wird durch die Zugabe von Trichloressigsäure gestoppt. Durch die Spaltung entstehen diazotierte und damit chromophore Peptide, die in der Trichloressigsäure in Lösung bleiben, während nicht angegriffenes Azocasein durch die Säure präzipitiert wird. Nach Entfernung der Präzipitate kann die Extinktion der Lösung photometrisch bestimmt werden. Die Intensität der Färbung bzw. der Lichtabsorption steht dabei in einem proportionalen Verhältnis zur Konzentration der gelösten Peptide und damit zur Spaltungsaktivität der Proteinase.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Gesamtproteinase wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Der Aktivitätstest erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit jeweils drei Reaktionsansätzen und zwei Kontrollansätzen für jeden zu testenden Extrakt.

Pro Ansatz wurden 20 µl der Enzymprobe mit 200 µl vorgelegtem Reaktionspuffer der Wahl (0,1 M, pH 5-8) vermischt. Die Vorinkubation von 5 min wie auch die Enzymreaktion erfolgte unter ständigem Schütteln in einem Thermomixer (5437, Eppendorf) bei 30 °C. Durch Zugabe von 50 µl Azocaseinlösung (1 % in A. dem.) wurde die Reaktion gestartet und nach 30 min durch Zugabe von 500 µl Trichloressigsäure (8 %) gestoppt.

Die Abtrennung der unlöslichen Proteinbestandteile erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 g und 4 °C.

Der Überstand wurde in Halbmikro-Küvetten (Brand) überführt und die Extinktion mit einem Spectrophotometer (Lambda 12, Perkin Elmer) bei 366 nm gegen Luft gemessen.

Tabelle 2: Schema des Gesamtproteinasetests

		<b>Testansatz x 3</b>	<b>Kontrolle x 2</b>
	Reaktionspuffer 0,1 M, pH 5-8	200 µl	200 µl
	Enzymprobe	20 µl	/
<b>VORINKUBATION</b>	5 min, 30 °C		
<b>REAKTIONSTART</b>	Azocaseinlösung, 1 % in A. dem.	50 µl	50 µl
<b>INKUBATION</b>	30 min, 30 °C		
<b>REAKTIONSTOP</b>	Trichloressigsäure, 8 %	500 µl	500 µl
	Enzymprobe	/	20 µl
<b>ZENTRIFUGATION</b>	15 min, 13.000 g, 4 °C		
<b>MESSUNG</b>	Überstand bei 366 nm gegen Luft		

Die Aktivität der Gesamtproteinase wurde dann aus den Extinktionswerten der Reaktionsansätze und Kontrollen als Extinktionsänderung ( $dE_{366}$ ) pro Zeiteinheit (min) berechnet:

$$dE_{366} = E_{366} \text{ Test} - E_{366} \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Aktivität} = \frac{dE_{366}}{\text{min}} \left( dE_{366} \times \text{min}^{-1} \right)$$

Die spezifische Aktivität der Gesamtproteinase wurde in Relation zur Gewebekonzentration C und dem Probenvolumen V berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{dE_{366}}{\text{min}} \times C^{-1}_{\text{Gewebe}} \times V^{-1}_{\text{Probe}} \left( dE_{366} \times \text{min}^{-1} \times g_{\text{fw}}^{-1} \right)$$

Dieser Enzymtest wurde für alle in dieser Arbeit folgenden und im Zusammenhang mit unterschiedlichen Fragestellungen z.T. modifizierten Gesamtproteinasebestimmungen verwendet.

### 2.3.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde der Einfluss verschiedener Reaktionspuffer, von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität der Gesamtproteinase untersucht.

#### Einfluss verschiedener Puffer

Um den Einfluss des Reaktionspuffers auf die Aktivität der Gesamtproteinase zu ermitteln, wurde der oben beschriebene Azocaseintest mit folgenden Puffern durchgeführt:

Tabelle 3: Eingesetzte Reaktionspuffer

Reaktionspuffer	Molarität (M)	pH-Wert
Citrat-Phosphat	0,1	7
Phosphat	0,1	7
Tris-HCl	0,1	7
Imidazol	0,1	7

### Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$

$\text{Ca}^{2+}$  spielt als Cofaktor bei vielen Enzymen und Enzymsystemen eine wichtige Rolle. Um den möglichen Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Enzymaktivität zu ermitteln, wurden der Tris-HCl- sowie der Imidazolpuffer aus der Reihe der oben aufgeführten Reaktionspuffer mit unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen im Gesamtproteinasetest verglichen. Mit den übrigen beiden Puffern war dieser Ansatz nicht möglich, da aufgrund des Phosphatgehaltes der Puffer Calcium-Phosphatpräzipitate entstehen würden.

Folgende  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen wurden getestet:

Tabelle 4: Eingesetzte Puffer mit unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen

Reaktionspuffer	Molarität (M)	$\text{CaCl}_2$ -Konzentration (mM)	pH-Wert
Tris-HCl	0,1	10	7
Imidazol	0,1	10	7
Tris-HCl	0,1	20	7
Imidazol	0,1	20	7

Insgesamt wurden somit acht verschiedene Reaktionspuffer eingesetzt. Je ein untersuchter Mitteldarmdrüsenextrakt wurde dabei mit allen acht Puffern im Vergleich getestet.

### Einfluss des pH-Wertes

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Gesamtproteinase bzw. um das pH-Optimum festzustellen, wurde der Gesamtproteinasetest mit Reaktionspuffern unterschiedlicher pH-Werte in einem Bereich von pH 5.0 – pH 8.0 durchgeführt.

Folgende Puffer wurden eingesetzt:

Tabelle 5: Verwendete Puffer unterschiedlicher pH-Werte

Tris-HCl 0,1 M + 10 mM $\text{CaCl}_2$	Imidazol 0,1 M + 10 mM $\text{CaCl}_2$
pH 5,0	pH 5,0
pH 5,5	pH 5,5
pH 6,0	pH 6,0
pH 6,5	pH 6,5
pH 7,0	pH 7,0
pH 8,0	pH 8,0

### 2.3.1.2 Ermittlung spezifischer Eigenschaften der Gesamtproteinase

Die Aktivität der Gesamtproteinase wurde bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten bestimmt. Desweiteren wurde der Einfluß spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität der Gesamtproteinase untersucht.

#### Thermostabilität

Für die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Enzymaktivität der Gesamtproteinase wurden Mitteldarmdrüsenextrakte in einem Wasserbad (M 20 S, Lauda) bei verschiedenen Temperaturen von 20-60 °C für jeweils eine Stunde inkubiert. Die Temperatur des Wasserbades wurde über einen Thermoregler ( M S/2, Lauda) konstant gehalten. Alle 15 min wurde aus den Extrakten eine Unterprobe entnommen und mit dem oben beschriebenen Enzymtest die Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt. Eine vor der Inkubation entnommene Unterprobe diente jeweils als Referenz.

Die Inkubation erfolgte bei 20, 30, 40, 50 und 60 °C.

#### Zeitstabilität

Um die Veränderung der Aktivität über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden Mitteldarmdrüsenextrakte der zu untersuchenden Arten bei Raumtemperatur (25 °C) und unter Kühlung (5 °C) über einen Zeitraum von 96 Stunden aufbewahrt. Unmittelbar nach dem Start des Versuches und dann alle 24 Stunden wurde den Extrakten Unterproben entnommen und die Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt.

#### Einfluss spezifischer Inhibitoren

Um erste Hinweise auf die Zusammensetzung der Proteinase und ihre Zugehörigkeit zu den einzelnen Enzymklassen zu erhalten, wurde der Einfluss von spezifischen Proteinaseinhibitoren auf die Aktivität der Enzymextrakte untersucht.

Hierfür wurden folgende Inhibitoren verwendet:

Tabelle 6: Eingesetzte Inhibitoren

Proteinaseklasse	Inhibitor	Konzentration der Stammlösung
Serin (EC 3.4.21)	4-(2-Aminoethyl) Benzenesulfonylfluorid Hydrochlorid ( <b>AEBSF</b> )	1 mM in A. dem.
Cystein (EC 3.4.22)	Trans-Epoxy succinyl-L-Leucyl-amido-(4-Guanidino) Butan ( <b>E64</b> )	1 mM in A. dem.

AEBSF ist ein spezifischer Inhibitor für Serinproteinasen (s. Abb. 2). Der Inhibierungsmechanismus basiert, wie auch bei ähnlich aufgebauten Inhibitoren dieser Klasse (z.B. PMSF), auf der Sulfonierung eines Serinrestes im Aktiven Zentrum des Enzyms. Es konnte gezeigt werden, daß AEBSF Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin inhibiert (Markwardt et al. 1974).

Im Vergleich zu PMSF besitzt AEBSF den Vorteil geringerer Toxizität und höherer Stabilität insbesondere in wässrigen Lösungen.

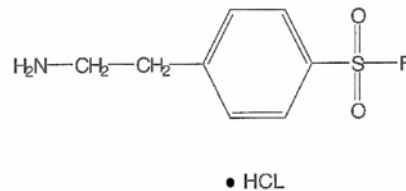


Abb. 2: Strukturformel des Serinproteinaseninhibitors AEBSF. (Quelle: Produktinformation Sigma prod.No. A8456).

E 64 ist ein hoch selektiver und irreversibler Inhibitor für Cysteinproteinasen (s. Abb. 3). Dabei bindet die trans-Epoxy succinylgruppe von E64 an eine aktive Thiolgruppe vieler Cysteinproteinasen und bildet eine Thioetherbrücke aus, durch die das Aktive Zentrum des Enzyms blockiert wird.

Dies konnte z.B für Papain, Actinidase, und Cathepsin B, H und L gezeigt werden (Katunuma & Kominami 1995, Sreedharan et al. 1996).

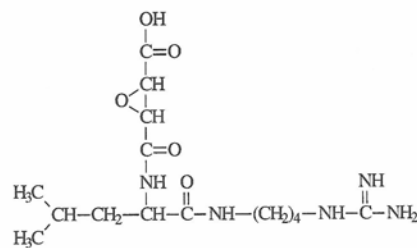


Abb. 3: Strukturformel des Cysteinproteinaseninhibitors E 64. (Quelle: <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/F/45/45370>).

Für den Aktivitätstest wurden je 20 µl der Inhibitorstammlösung separat mit 20 µl Enzymextrakt gemischt und für 60 min bei 25 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Inhibitor/Enzymgemisch mit 180 µl Reaktionspuffer versetzt und der Gesamtproteinasetest wie oben beschrieben durchgeführt. Parallel wurde zur Kontrolle von jedem Enzymextrakt ein Ansatz nur mit dem Inhibitorlösungsmittel inkubiert (s. Tab. 7).



Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Aktivität der Gesamtproteinase und den Einfluss von Inhibitoren

		Aktivität	Kontrolle	Inhibitor	Kontrolle
		3 x	2 x	3 x	2 x
	Inhibitorlösung	/	/	20 µl	20 µl
	Inhibitor Lösungsmittel	20 µl	20 µl	/	/
	Enzymprobe	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
<b>INKUBATION</b>	60 min, 25 °C				
	Enzym/Inhibitorgemisch	40 µl	/	40 µl	/
	Reaktionspuffer				
	Tris-HCl 0,1 M+10 mM CaCl <sub>2</sub>	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl
	pH 6,0				
<b>VORINKUBATION</b>	5 min, 30 °C				
<b>REAKTIONSSSTART</b>	Azocaseinlösung, 1 % in A. dem.	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>INKUBATION</b>	30 min, 30 °C				
<b>REAKTIONSSSTOP</b>	Trichloressigsäure, 8 %	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
	Enzym/Inhibitorgemisch	/	40 µl	/	40 µl
<b>ZENTRIFUGATION</b>	15 min, 13.000 g, 4 °C				
<b>MESSUNG</b>	Überstand bei 366 nm gegen Luft				

### 2.3.2 Trypsin

Die Quantifizierung der Trypsin-Aktivität in den Mitteldarmdrüsenextrakten erfolgte mit Hilfe des künstlichen Substrates N<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (L-BAPA) (nach Geiger & Fritz 1988). Die Molekülstruktur dieses chromogenen synthetischen Substrates läßt sich exemplarisch für viele Substrate dieses Types in drei funktionelle Untereinheiten aufteilen (s. Abb. 4): (1) Eine für das Enzym spezifische Aminosäure, (2) eine Blockierungsgruppe auf der Aminoseite der Aminosäure, und (3) eine Reportergruppe, die für die Hydrolyse durch das Enzym eine virtuelle Peptidbindung bildet.

Die Blockierungsgruppe soll die Polypeptidkette des natürlichen Proteins imitieren, während die Reportergruppe chromogene Eigenschaften besitzt.

Bei der hydrolytischen Spaltung von L-BAPA erkennt das Trypsin die spezifische Aminosäure in der Nachbarschaft der Peptidbindung. Bedingt durch die Positionierung der Blockierungsgruppe kann die Spaltung nur an dieser Bindung erfolgen, so daß als Reaktionsprodukte Blockierungsgruppe und spezifische Aminosäure (N<sup>α</sup>-Benzoyl-L-Arginin) auf der einen und der chromogene Reporter (4-Nitroanilin) auf der anderen Seite entstehen.

Die Anilinform des Reporters nach der Hydrolyse hat einen höheren Extinktionkoeffizienten als L-BAPA, so daß als Maß der Trypsin-Aktivität die Freisetzung des chromogenen Reporters und damit die Veränderung der Extinktion photometrisch bestimmt werden kann.

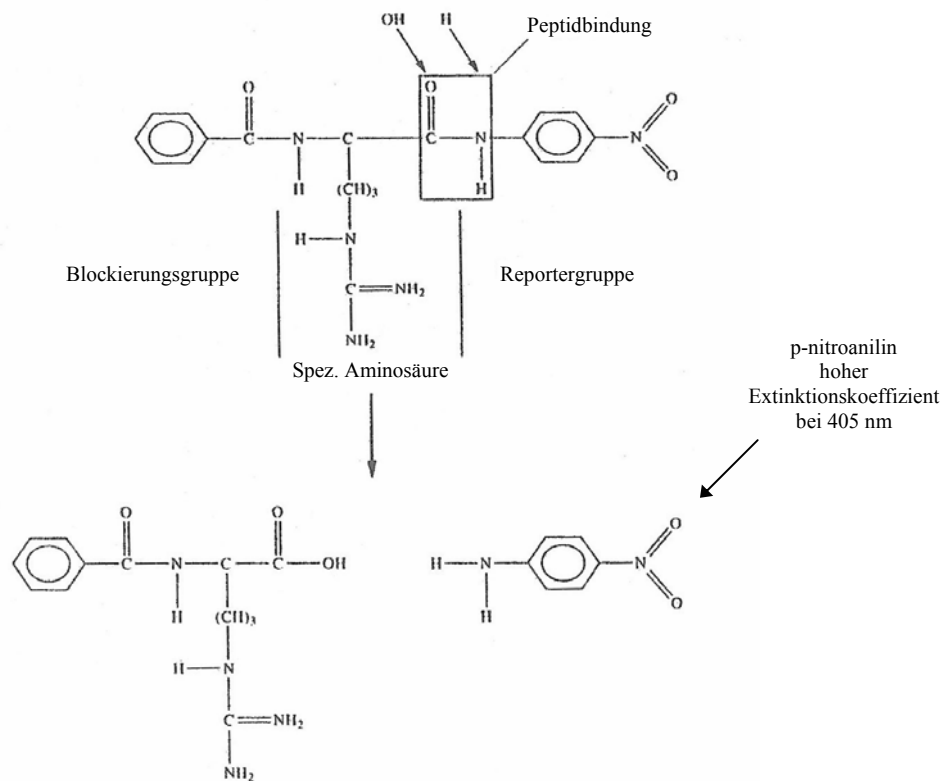


Abb. 4: Strukturformel des synthetischen Substrates L-BAPA und die Produkte der hydrolytischen Spaltung. Die Anilinform des Reporters hat bei 405 nm einen höheren Extinktionskoeffizienten als das ungespaltene Substrat. (Quelle: Garcia-Carreño, 1997)

Die Bestimmung der Trypsin-Aktivität wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Der Reaktionsansatz erfolgte in Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas mit der Schichtdicke von 1 cm (Hellma). 50 µl Enzymextrakt wurden in den Küvetten mit 930 µl Reaktionspuffer (0,1 M Tris-HCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) gründlich vermischt und im Küvettenhalter bei 30 °C für 5 min inkubiert. Die Temperatur des Küvettenhalters wurde über ein steuerbares Peltier-Element (PTP-6) konstant gehalten. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl L-BAPA (50 mM in DMSO) gestartet und die Änderung der Absorption bei 405 nm kontinuierlich über 180 s gegen Luft gemessen.

Tabelle 8: Schema des Trypsintests

	Testansatz x 2
Reaktionspuffer Tris-HCl 0,1 M	930 µl
+10 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8	
Enzymprobe	50 µl
<b>VORINKUBATION</b>	5 min, 30 °C
<b>REAKTIONSTART</b>	L-BAPA 50 mM in DMSO 20 µl
<b>MESSUNG</b>	Kontinuierlich über 180 s Bei 405 nm gegen Luft, 30 °C

Die Trypsin-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{dE_{405}}{\text{min}} \times \frac{TV}{\epsilon_{405} \times d \times SV} = \frac{dE_{405}}{\text{min}} \times F \quad (U \times \text{ml}^{-1})$$

**TV = Gesamtvolumen (1,0 ml)**

**$\epsilon_{405}$  = molarer Extinktionskoeffizient von 4-Nitroanilin ( $10,21 \times \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )**

**d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)**

**SV = Probenvolumen (0,050 ml)**

**$\Rightarrow F = 1,961$**

Wobei definitionsgemäß gilt: 1 Unit entspricht dem Umsatz von einem  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute ( $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ )

Die spezifische Trypsin-Aktivität wurde in Relation zur Gewebekonzentration C bestimmt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{dE_{405}}{\text{min}} \times F \times C^{-1} \quad (U \times \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$$

## 2.4 Charakterisierung des Enzymspektrums

Für die Isolierung und Identifizierung einzelner Proteinaseen speziell Trypsin wurden die Mitteldarmdrüsenextrakte mit chromatographischen Arbeitsverfahren (Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie sowie Affinitätschromatographie) und gelelektrophoretischen Methoden aufgetrennt und analysiert.

### 2.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Biomoleküle, insbesondere Proteine, weisen in Abhängigkeit vom pH-Wert eine positive oder negative Ladung auf. Deshalb eignet sich die Ionenaustauschchromatographie sehr gut für die Reindarstellung solcher Makromoleküle. Sie ist als flüssigkeitschromatographisches Trennverfahren ein wesentlicher Bestandteil von Aufreinigungsverfahren. Es basiert auf der Interaktion von gelösten geladenen Teilchen mit einer entgegengesetzt geladenen festen Trägermatrix. Dabei konkurriert ein geladenes Probenmolekül mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf der Ionenaustauschermatrix.

Bei der Anionenaustauschchromatographie besteht die stationäre Phase aus einer Trägermatrix (z.B. Silicamaterial, Sepharose u.a.), durch die über Verbindungen mit endständigen quartären Ammoniumverbindungen positive Ladungen fixiert werden. Das negativ geladene Gegenion ist häufig Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ).

Beim „Beladen“ der Ionenaustauschersäule mit den Probenmolekülen werden zunächst die Gegenionen der Säulenmatrix durch negativ geladene Probenmoleküle ersetzt.

Entgegengesetzt oder schwach geladene Probenmoleküle passieren die Säulenmatrix und werden von den übrigen Komponenten abgetrennt. Dadurch findet eine erste Fraktionierung des zu trennenden Substanzgemisches in bindende und nicht-bindende Moleküle statt. Für das Ablösen der gebundenen Probenmoleküle wird die elektrostatische Bindung an die Säulenmatrix durch Zugabe des ursprünglichen Gegenions geschwächt. In der Regel wird dazu die Konzentration des zugegebenen Salzes kontinuierlich erhöht. Als Folge eluieren die Probenmoleküle in der Reihenfolge ihrer Bindungsstärke an die Matrix. Diese kontinuierliche Eluierung stellt somit den Hauptfraktionierungsschritt dieses Verfahrens dar und ermöglicht es im Idealfall, bei geeigneter Wahl des Fraktionsvolumens die zu untersuchenden Substanzen voneinander zu trennen.

Die Aufreinigung der Mitteldarmdrüsenextrakte erfolgte über Anionenaustauschchromatographie an einer FPLC-Arbeitsstation (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia Biotech) über eine UNO™ Q1-R Säule (1 ml, Bio-Rad, Hercules). Vor der Beladung der Anionentauscher-Säule wurden die Extrakte über NAP™-10 Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25 Medium, 1 ml, Pharmacia Biotech) entsalzt und in Elutionspuffer A (Imidazol 10 mM, pH 6,8) umgepuffert. Zudem wurden somit letzte kleine Zelltrümmer und Partikel aus den Extrakten entfernt. 1 ml Extrakt wurde hierfür auf die Säule aufgebracht und nach dem vollständigen Eindringen in das Gelbett mit 1,5 ml Puffer A in auf Eis bereitstehende Reaktionsgefäße eluiert.

Die so vorbereiteten Eluate wurden anschließend mit Puffer A auf 2 ml aufgefüllt (Volumen der FPLC-Probenschleife) und auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die nicht bindenden Probenbestandteile wurden mit 5 ml Elutionspuffer A ausgewaschen und anschließend die gebundenen Substanzen über einen linearen Salzgradienten aus Elutionspuffer A und B (Imidazol 10 mM, 1M NaCl, pH 6,8) von 0 – 1 M bei einer Flußrate von 1 ml/min mit insgesamt 30 ml eluiert. Die eluierten Probenbestandteile wurden in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Während des gesamten Eluierungsprozesses wurden die aus der Säule austretenden Probenbestandteile über einen UV-Detektor (280 nm) und einen Leitfähigkeitsdetektor analysiert und die Signale analog aufgezeichnet.

Die Schreiberaufzeichnung vermittelt einen Eindruck über das Elutionsmuster aller in der Probe vorhandenen Proteine, aber nicht über die Verteilung einzelner Enzyme in den Fraktionen. Um diese Verteilung festzustellen, wurden die gewonnenen Fraktionen im weiteren Verlauf durch verschiedene Aktivitätstests genauer analysiert. Hierbei erfolgte keine Quantifizierung einzelner Enzymaktivitäten, sondern nur eine semi-quantitative Enzymdetektion über alle aufgefangenen Fraktionen hinweg. Zum einen wurde mit dem oben beschriebenen Azocaseintest (s. 2.3.1) in modifizierter Form die Verteilung der Gesamtproteinase in den Fraktionen untersucht. Desweiteren wurde durch den Einsatz spezifischer Proteinaseinhibitoren die Identität und Verteilung einzelner Proteinaseklassen in den Fraktionen bestimmt. Zusätzlich wurde das Elutionsmuster einzelner Proteinasen (Endopeptidasen) und z.T. auch Peptidasen (Exopeptidasen) in den Fraktionen bestimmt.

### 2.4.1.1 Semi-quantitative Aktivitätstests

#### Gesamtproteinase

Die Bestimmung der Gesamtproteinaseverteilung erfolgte nach folgendem Schema: Aus den gewonnenen Fraktionen wurden 50 µl Probe entnommen und mit 170 µl Reaktionspuffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vermischt. Als Reaktionspuffer wurde der Elutionspuffer A (Imidazol 10 mM, pH 6,8) verwendet, um die Fraktionen nicht erneut umpuffern zu müssen. Bei der hier durchgeführten semi-quantitativen Gesamtproteinasebestimmung wurden keine Kontrollansätze durchgeführt, so daß für jede zu testende Fraktion ein einziger Reaktionsansatz hergestellt wurde.

Zu Beginn dieses Versuchsabschnittes wurde von allen erhaltenen Fraktionen zunächst zur Übersicht nur jede zweite Fraktion auf Gesamtproteinase getestet. Durch die Untersuchung zahlreicher Mitteldarmdrüsenextrakte ergaben sich jedoch im weiteren Verlauf reproduzierbare Verteilungsmuster der Gesamtproteinase, so daß fortan innerhalb spezifischer Bereiche des Elutionsprofils im Sinne einer höheren Auflösung jede Fraktion getestet wurde. Im weiteren Verlauf entsprach das Verfahren dem unter (2.3.1) beschriebenen Reaktionsablauf.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für den Gesamtproteinasetest nach FPLC

		Ansatz je Fraktion
	Reaktionspuffer Imidazol 10 mM, pH 6,8	170 µl
	Fraktionsprobe	50 µl
<b>VORINKUBATION</b>	5 min, 30 °C	
<b>REAKTIONSSTART</b>	Azocaseinlösung, 1 % in A. dem.	50 µl
<b>INKUBATION</b>	30 min, 30 °C	
<b>REAKTIONSSTOP</b>	Trichloressigsäure, 8 %	500 µl
<b>ZENTRIFUGATION</b>	15 min, 13.000 g, 4 °C	
<b>MESSUNG</b>	Überstand bei 366 nm gegen Luft	

#### Einfluss spezifischer Inhibitoren

Um die Anteile einzelner Proteinaseklassen in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen, wurde der semi-quantitative Gesamtproteinasetest unter dem Einfluss spezifischer Proteinaseinhibitoren durchgeführt. Dazu wurde auf die bereits unter (2.3.1.2) aufgeführten Inhibitoren zurückgegriffen (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Reaktionsansatz für den Einfluss von Inhibitoren nach FPLC

		<b>Aktivität</b>	<b>Inhibitor</b>
		<b>1 x</b>	<b>1 x</b>
	Inhibitorlösung	/	50 µl
	Fraktionsprobe	/	50 µl
<b>INKUBATION</b>	60 min, 25 °C		
	Fraktion/Inhibitor Cocktail	/	100 µl
	Reaktionspuffer Imidazol 10 mM, pH 6,8	170 µl	120 µl
	Fraktionsprobe	50 µl	/
<b>VORINKUBATION</b>	5 min, 30 °C		
<b>REAKTIONSSTART</b>	Azocaseinlösung, 1 % in A. dem.	50 µl	50 µl
<b>INKUBATION</b>	30 min, 30 °C		
<b>REAKTIONSSTOP</b>	Trichloressigsäure, 8 %	500 µl	500 µl
<b>ZENTRIFUGATION</b>	15 min, 13.000 g, 4 °C		
<b>MESSUNG</b>	Überstand bei 366 nm gegen Luft		

### Identifikation einzelner Proteinasen und Peptidasen

Die Identifikation einzelner Proteinasen und Peptidasen in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie erfolgte ebenfalls mit einer semi-quantitativen Mikromethode. Dieses Testverfahren basiert, wie schon für die Quantifizierung der Trypsin-Aktivität beschrieben (s. 2.3.2), auf der Anwendung von spezifischen synthetischen chromogenen Substraten. Ergänzend wurde an dieser Stelle zur Identifikation der Proteinase Cathepsin L ein fluorogenes Substrat verwendet.

Folgende synthetischen Substrate wurden eingesetzt:

Tabelle 11: Verwendete Substrate und Konzentrationen. In Klammern die internationalen Nomenklaturnummern

<b>Substrat</b>	<b>Enzym</b>	<b>Konzentration der Stammlösung</b>
N <sup>α</sup> -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid- hydrochlorid ( <b>L-BAPA</b> )	Trypsin (EC 3.4.21.4)	50 mM in DMSO
N-Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L- prolyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid	Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)	50 mM in DMSO
L-leucin-p-nitroanilid-hydrochlorid	Leucin Aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	50 mM in DMSO
L-alanin-4-nitroanilid-hydrochlorid	Aminosäure Arylamidase (EC 3.4.11.2)	50 mM in DMSO
Z-Phe-Arg-7-amido-4- methylcoumarin-hydrochlorid	Cathepsin L (EC 3.4.22.15)	1 mM in DMSO

Die verwendeten chromogenen Substrate zeigen prinzipiell den schon unter (2.3.2) beschriebenen funktionellen Aufbau.

Das Substrat für Chymotrypsin besitzt im Vergleich zu L-BAPA eine andere Blockierungsgruppe (N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl) sowie die entsprechende spezifische Aminosäure für Chymotrypsin (L-phenylalanin).

Die Enzyme Leucin-Amino-peptidase und Aminosäure-Arylamidase gehören zur Gruppe der Amino-peptidasen und spalten einzelne Aminosäuren vom N-terminalen Ende der Peptidkette ab. Vor diesem Hintergrund erklärt sich die Molekülstruktur dieser synthetischen Substrate, die im Vergleich zu den Substraten für die Endopeptidasen Trypsin und Chymotrypsin keine Blockierungsgruppe mehr aufweisen muß. Durch den endständigen hydrolytischen Angriff auf die Aminosäure wird der chromogene Reporter direkt freigesetzt.

Die semi-quantitative Mikromethode wurde für die chromogenen Substrate nach folgendem Schema durchgeführt:

Aus den erhaltenen Fraktionen wurden je 50 µl Probe in die Wells einer 96-well Mikrotiterplatte überführt. Die Reaktion wurde dann durch schnelle Zugabe von je 250 µl Puffer/Substrat Reagenz (245 µl Elutionspuffer A + 5 µl Substratstammlösung der Wahl) gestartet. Nach einigen Minuten, abhängig von der jeweiligen Aktivität des Enzyms, wurde die optische Dichte der Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenphotometer (MR 7000, Dynatech) bei 405 nm gegen Luft gemessen.

Tabelle 12: Genereller Reaktionsansatz für den semi-quantitativen Aktivitätstest in Mikrotiterplatten nach FPLC

		<b>Testansatz</b>
	Fraktionsprobe	50 µl
	Puffer/Substrat Reagenz	250 µl
<b>INKUBATION</b>	Einige min, je nach Aktivität	
<b>MESSUNG</b>	Mikrotiterplatte bei 405 nm gegen Luft	

Das für die Identifikation von Cathepsin L eingesetzte fluorogene Substrat besitzt prinzipiell den gleichen funktionellen Aufbau wie die beschriebenen chromogenen Substrate für den Nachweis von Proteinase. Im Gegensatz zur Freisetzung einer chromogenen Reportergruppe wird hier jedoch bei der Hydrolyse des Substrates das stark fluoreszierende 7-amido-4-methylcoumarin (AMC) freigesetzt. In einem Spectrofluorometer kann das freigesetzte AMC anschließend quantifiziert werden.

Die semi-quantitative Mikromethode wurde für das fluorogene Substrat nach folgendem Schema durchgeführt:

Aus den gewonnenen Fraktionen wurden je 20 µl Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 180 µl Reaktionspuffer (340 mM Natriumacetat, 60 mM Essigsäure, 4 mM EDTA, pH 5,5) vermengt. Nach kurzer Inkubation von 1 min bei 30 °C erfolgte der Start der Enzymreaktion durch die Zugabe von 200 µl Substratlösung (Stammlösung 1 : 50 mit A. dem.

verdünnt). Nach 10 min Inkubation bei 30 °C unter ständigem Schütteln wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl Stopplösung (100 mM Natriummonochloracetat, 70 mM Essigsäure, 30 mM Natriumacetat, pH 4,3) unterbrochen. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes in einem Spectrofluorometer (SFM 25, Kontron Instruments) bei einer Excitationswellenlänge von 370 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen.

Tabelle 13: Genereller Reaktionsansatz für den semi-quantitativen Aktivitätstest von Cathepsin L nach FPLC

		Testansatz
	Fraktionsprobe	20 µl
	Reaktionspuffer	180 µl
<b>VORINKUBATION</b>	1 min, 30 °C	
<b>REAKTIONSTART</b>	Substratlösung	200 µl
<b>INKUBATION</b>	10 min, 30 °C	
<b>MESSUNG</b>	Spectrofluorometer bei 370/460 nm	

Die weitere Analyse ausgesuchter Fraktionen, die in den semi-quantitativen Enzymtests hohe Aktivitätswerte aufzeigten, erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden (s. 2.4.3).

#### 2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch die Extinktionsmessung bei 280 nm der von der Anionenaustauschersäule eluierten Probenbestandteile wurde bereits ein Proteinelutionsprofil der einzelnen Fraktionen aufgenommen. Es erfolgte jedoch über die UV-Detektion keine Proteinkonzentrationsbestimmung, da für die Berechnung der Konzentration für jedes eluierte Protein der jeweilige Extinktionskoeffizient bekannt gewesen sein müßte, zum anderen war nicht sichergestellt, daß keine anderen UV- absorbierenden Substanzen in den Mitteldarmdrüsenextrakten enthalten waren. Aus diesem Grund erfolgte eine zusätzliche Proteinkonzentrationsbestimmung in den einzelnen Fraktionen durch den Proteintest nach Bradford (Bradford 1976). Der Test basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes nach Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Lösung (Rehm 2002).

Der Bradford-Test erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten. Hierfür wurden je 10 – 50 µl Probe aus den erhaltenen Fraktionen in die Wells der Platte vorgelegt. Das Endprobenvolumen betrug immer 50 µl, so daß mit A. dem. auf 50 µl aufgefüllt wurde. Für die Farbreaktion wurden die Proben anschließend mit 250 µl Farbreagenz (Bio Rad, 1:5 verdünnt mit A. dem.) versetzt. Nach 15 min erfolgte die Bestimmung der Extinktion in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 595 nm (s. Tab 14).



Mittels Rinderserumalbumin (BSA) (0,1 mg/ml in A. dem.) als Proteinstandard wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die ermittelten Extinktionswerte in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden konnten. Für die Eichgerade wurde der beschriebene Reaktionsansatz mit 0, 10, 20, 30, 40 und 50  $\mu\text{l}$  BSA (Endvolumen 50  $\mu\text{l}$  mit A. dem.) durchgeführt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für den Bradford-Test

	Standard x 2	Testansatz x 1
Standard	0 – 50 $\mu\text{l}$	/
Fraktionsprobe	/	10 – 50 $\mu\text{l}$
A. dem.	ad. 50 $\mu\text{l}$	ad. 50 $\mu\text{l}$
Farbreagenz	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$
<b>INKUBATION</b>	15 min bei 25 °C	
<b>MESSUNG</b>	Mikrotiterplatte bei 595 nm gegen Luft	

## 2.4.2 Affinitätschromatographie

Mit der Affinitätschromatographie können Trypsin und trypsinähnliche Serinproteinasen aus den Rohextrakten in einem Arbeitsschritt isoliert werden. Für die Affinitätschromatographie wurden ausgewählte Mitteldarmdrüsenextrakte verwendet, die nach Quantifizierung der Trypsin-Aktivität (s. 2.3.2) hohe Aktivitäten aufwiesen. Für diese Aufreinigung wurden spezielle Affinitätssäulen verwendet (Hi Trap Benzamidine FF (high sub) 1 ml, Amersham Biosciences). Die Säulen enthalten ein für Trypsin und trypsinähnliche Serinproteinasen hoch selektives Affinitätsmedium auf der Basis von p-Aminobenzamidin. P-Aminobenzamidin ist ein synthetischer Inhibitor für die genannten Proteinasen und fungiert innerhalb des Säulenmediums als hoch spezifischer Ligand. Über eine lange Kohlenwasserstoffkette (Spacer) ist p-Aminobenzamidin dabei mit einer hoch vernetzten Agarosematrix (4%) verknüpft.

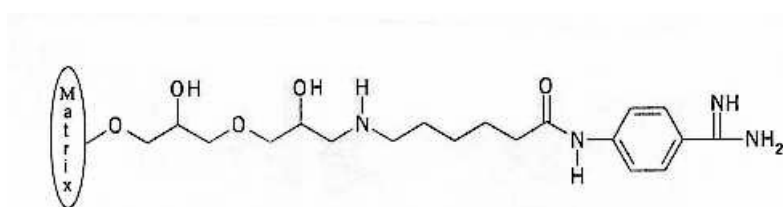


Abb. 5: Partielle Struktur des Affinitätsmediums. Benzamidin ist über eine Amidbindung an den Spacerarm gebunden, der wiederum über eine Etherbrücke mit der Säulenmatrix verbunden ist. (Quelle: data file 18-1139-38 AA, 2000-09. Amersham Biosciences)

Für die Aufreinigung von Trypsin bzw. trypsinähnlichen Serinproteinasen wurden ausgewählte Mitteldarmdrüsenextrakte mit einer Flußrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  unter Verwendung einer Peristaltikpumpe auf eine Affinitätssäule aufgetragen. Diese wurde zuvor mit 5 ml Bindungs-Waschpuffer (0,05 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,4) äquilibriert.

Anschließend wurde die Säule bei einer Flußrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  mit insgesamt 5 ml Bindungs-Waschpuffer gespült, um nichtbindende Probenbestandteile zu entfernen. Je 1 ml Waschfraktion wurde dabei in auf Eis stehende Reaktionsgefäße aufgenommen. Die Elution der Serinproteinasen erfolgte bei einer Flußrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  mit insgesamt 5 ml Elutionspuffer (0,05 M Glycin, pH 3). Auch hier wurde das Eluat in gekühlte Reaktionsgefäße zu je 1 ml fraktioniert. Um zu verhindern, daß die eluierten Proteine bei dem geringen pH-Wert des Elutionspuffers denaturieren, wurden die gewonnenen Fraktionen mit 150  $\mu\text{l}$  Tris-HCl Puffer (1 M, pH 9) versetzt.

Die weitere Analyse der gewonnenen Fraktionen erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden (s. 2.4.3).

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die gelelektrophoretischen Untersuchungen wurden ausgesuchte Fraktionen nach chromatographischer Auftrennung und semi-quantitativer Aktivitätsbestimmung (s. 2.4.1.1) sowie verschiedene Fraktionen nach der Affinitätschromatographie (s. 2.4.2) verwendet. Zusätzlich wurden auch Mitteldarmdrüsenrohextrakte der zu untersuchenden Arten für die Gelelektrophorese verwendet.

Alle Probenlösungen wurden in Abhängigkeit von ihrem Volumen zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese über NAP<sup>TM</sup>-10 Gelfiltrationssäulen (0,5 ml oder 1 ml) entsalzt und in A. dem. umgepuffert. Die so gewonnenen Probenlösungen wurden anschließend gefriergetrocknet. Das gewonnene Lyophilisat wurde dann zur Verwendung für die Elektrophorese erneut in A. dem. gelöst und auf eine Proteinkonzentration der Probenlösung zwischen 10 und 30  $\mu\text{g}$  eingestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte über eine diskontinuierliche Natrium (engl.: Sodium) Dodecylsulphat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (nach Laemmli 1970).

Die Acrylamidkonzentration betrug 12%.

Lösungen:

<b>Sammelgelpuffer:</b>	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
<b>Trenngelpuffer:</b>	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
<b>Monomer:</b>	30 % (w/v) Acrylamid 1,6 % (w/v) Bisacrylamid
<b>Ammoniumpersulphat (APS):</b>	10 % (w/v) in A. dem.
<b>Sodium Dodecylsulphat (SDS):</b>	10 % (w/v) in A. dem.
<b>Elektrophoresepuffer 5 x:</b>	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, pH 8,3 0,1 % SDS
<b>Probenpuffer 2 x:</b>	0,0125 M Tris-HCl, pH 6,8 4 % SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,02 % Bromphenolblau

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden Trenn- und Sammelgel (100 x 80 x 1,5 mm) nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 15: Pipettierschema für die Herstellung von Trenn- und Sammelgel

<b>Lösungen</b>	<b>Trenngel (ml)</b>	<b>Sammelgel (ml)</b>
A. dem.	4,180	2,750
Trenngelpuffer	3,130	0,000
Sammelgelpuffer	0,000	1,120
Monomer	5,000	0,583
SDS (10 %)	0,125	0,045
APS (10%)	0,063	0,022
TEMED	0,006	0,006
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>12,500</b>	<b>4,500</b>

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Probenlösungen 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und direkt auf das Gel aufgebracht. Jede Probenflasche wurde mit 10-20 µl Probenlösung bestückt. Zusätzlich wurde in jedem Gel eine oder mehrere Probenflaschen mit 5 µl Molekulargewichtsmarker (Low molecular Weight Range, Sigma) bestückt (s. Tab. 16).

Tabelle 16: Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers

Proteine	Molekulargewicht KD
Albumin, Rinderserum	66,000
Ovalbumin, Hühnerei	45,000
Glycerinaldehyd-3-pDH, Kaninchenmuskel	36,000
Carboanhydrase, Rindererythrocyten	29,000
Trypsinogen, Rinderpankreas	24,000
Trypsin Inhibitor, Sojabohne	20,000
$\alpha$ -Lactalbumin, Kuhmilch	14,200
Aprotinin, Rinderlunge	6,500

Der Elektrophoreselauf erfolgte in einer temperaturregulierten, vertikalen, dualen Elektrophoresekammer (80 x 100 mm) (Dual Gel Caster Mighty Small, Hoefer) mit konstant 15 mA pro Gel für 120 min bei 1 °C.

Jedes Gel wurde in doppelter Ausführung angefertigt, so daß zwei identische Gele als Ausgangspunkt für zwei unterschiedlich weiterführende Behandlungsmethoden zur Verfügung standen. Jeweils ein Gel wurde zur Detektion aller Proteinbanden unmittelbar nach dem Gellauf fixiert und gefärbt (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie Brillant Blau R-250). Nach ca. 2 h in der Färbelösung wurde das Gel in einer Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) unter mehrfachem Wechsel der Lösung solange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden eine Färbung zeigten. Diese Gele werden im folgenden Proteingele genannt. Das jeweils andere Gel wurde einer speziellen Behandlung zur Ermittlung der Proteinaseaktivität unterzogen (nach Garcia-Carreño et al.1993).

### Substrat-SDS-PAGE

Nach dem Gellauf wurde das Gel für 30 min in einer 3 %igen Caseinlösung (3 % in 50 mM Tris-HCl, pH 8) bei 5 °C inkubiert. Ähnlich wie bei dem künstlichen Substrat Azocasein dient hier Casein als Substrat für zu detektierende Proteinasen. Während dieses ersten Inkubationsschrittes kann das Substrat bei geringer Enzymaktivität (5 °C) langsam in das Gel hineindiffundieren. Anschließend wird in einem zweiten Inkubationsschritt die Temperatur für 60 min auf 25 °C erhöht, um einen beschleunigten Proteinabbau durch aktive Enzymfraktionen zu gewährleisten. Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität nach der Gelelektrophorese ist zum einen die Kühlung während des Laufes, zum anderen die Vermeidung reduzierender Agenzien im Probenpuffer (z.B. Dithiothreitol, DTT) sowie das Erhitzen der Proteinprobe. Die gewählte SDS Konzentration beeinflusst die Proteinaseaktivität in der PAGE nicht wesentlich (Garcia-Carreño et al.1993). Nach der Inkubationsphase wird das Gel gründlich mit A. dem. gespült, für ca. 24 h in der Färbelösung (s.o.) fixiert und anschließend mit dem Entfärber (s.o.) je nach Intensität entfärbt. Diese Gele werden im folgenden Aktivitätsgele genannt.

Nach dieser Behandlung zeigen klare und helle Bandenbereiche vor einem dunklen, blauen Hintergrund die Zonen mit Proteinaseaktivität. Diese Aktivitätsbanden können ebenso wie die Standard-Proteinbanden mit den Molekularmarkerbanden zur Bestimmung des Molekulargewichts verglichen werden. Dieses Verfahren ermöglicht ausschließlich die Detektion von Proteinasen (Endopeptidasen), die beim Abbau des Caseins kurzkettige Polypeptidketten entstehen lassen. Dagegen liefern Peptidasen (Exopeptidasen) keine klaren Zonen auf dem blauen Hintergrund und können somit nicht detektiert werden.

Auch im Rahmen der Gelelektrophorese wurde erneut der Einfluss unterschiedlicher Proteinaseinhibitoren auf die Enzymaktivität untersucht. Neben den bereits unter (2.3.1.2) beschriebenen Inhibitoren AEBSF und E 64 wurde ergänzend der spezifische Trypsininhibitor TLCK (N- $\alpha$ -p-Tosyl-L-Lysin Chloromethyl Keton) eingesetzt (10 mM in 1mM HCl). TLCK ist ein irreversibler Inhibitor der Serinproteinase Trypsin und vieler trypsinähnlicher Serinproteinasen (s. Abb. 6). Der Inhibierungsmechanismus basiert auf der Alkylierung des Histidinrestes (46) im Aktiven Zentrum des Enzyms durch TLCK (Shaw & Glover 1970).

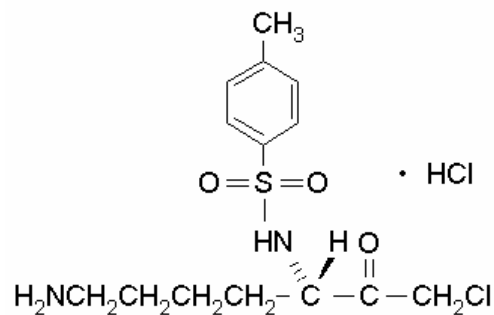


Abb. 6: Strukturformel des Trypsininhibitors TLCK. (Quelle: <http://www.sigmaldrich.com/structureimages/S/72/T7254>)

Für die Inhibitorversuche wurden die ausgesuchten Enzymproben mit den Inhibitorlösungen im Verhältniss 1:2 gemischt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Probenpuffer und die Beladung des Gels wie oben beschrieben.

## B. Experimentell – vergleichende Untersuchungen

### 2.5 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum

Im Rahmen dieses Versuchsabschnittes sollte der Einfluss des Nahrungsangebotes (karnivor, herbivor, Hunger) auf die Expression bzw. auf die Zusammensetzung des Enzymspektrums bei adulten Tieren untersucht werden. Dazu wurden frisch gefangene Exemplare der Nordseegarnele *C. crangon* verwendet. Die Tiere wurden zunächst für 12 h in einem temperaturkonstanten Raum bei 6 °C Wassertemperatur in Hälterungsbecken (100 l) im Durchfluß gehalten. Die Wassertemperatur im Fanggebiet betrug zum Zeitpunkt der Probennahme ca. 3 °C. Nach dieser ersten Akklimatisierungsphase wurden für den Nahrungsversuch insgesamt 30 nicht eiertragende adulte Tiere ausgewählt und zur Einzelhälterung in 500 ml Kristallisierschalen (Schott) überführt. Diese Tiere wurden dann in einen anderen temperaturkonstanten Raum bei 8 °C gehältert. Weiteren 10 Tieren wurde zur Festlegung des natürlich vorkommenden Enzymspektrums sofort die Mitteldarmdrüse entnommen (s. 2.2.1) und bei –80 °C gelagert. Nach weiteren 12 h der Temperaturanpassung wurde mit den Fütterungsexperimenten begonnen. Hierfür wurden 10 Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Mantelgewebe von *Mytilus edulis*, weitere 10 Tiere mit der Blaualge *Spirulina platensis* (getrocknet) ad libitum gefüttert. 10 weitere Tiere erhielten über den Versuchszeitraum keine Nahrung, so daß insgesamt drei Versuchsgruppen zu unterscheiden waren (karnivor/herbivor/Hunger). Die Fütterung erfolgte jeden Tag nach dem Wasserwechsel, für den gefiltertes Seewasser (0.25 µm) verwendet wurde.

Nach Ablauf des Versuchszeitraums wurde allen Tieren wie unter (2.2.1) beschrieben die Mitteldarmdrüse entnommen und einschließlich der zu Versuchsbeginn entnommenen Mitteldarmdrüsen der Kontrollgruppe zur Herstellung von Rohextrakten verwendet (s. 2.2.2).

An diesen Mitteldarmdrüsenrohextrakten wurden anschließend die Aktivität der Gesamtproteinase (s. 2.3.1) sowie die Trypsin-Aktivität (s. 2.3.2) bestimmt.

Desweiteren wurde das Protein- bzw. Enzymspektrum der Rohextrakte durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 2.4.3) dargestellt (s. Abb. 7).

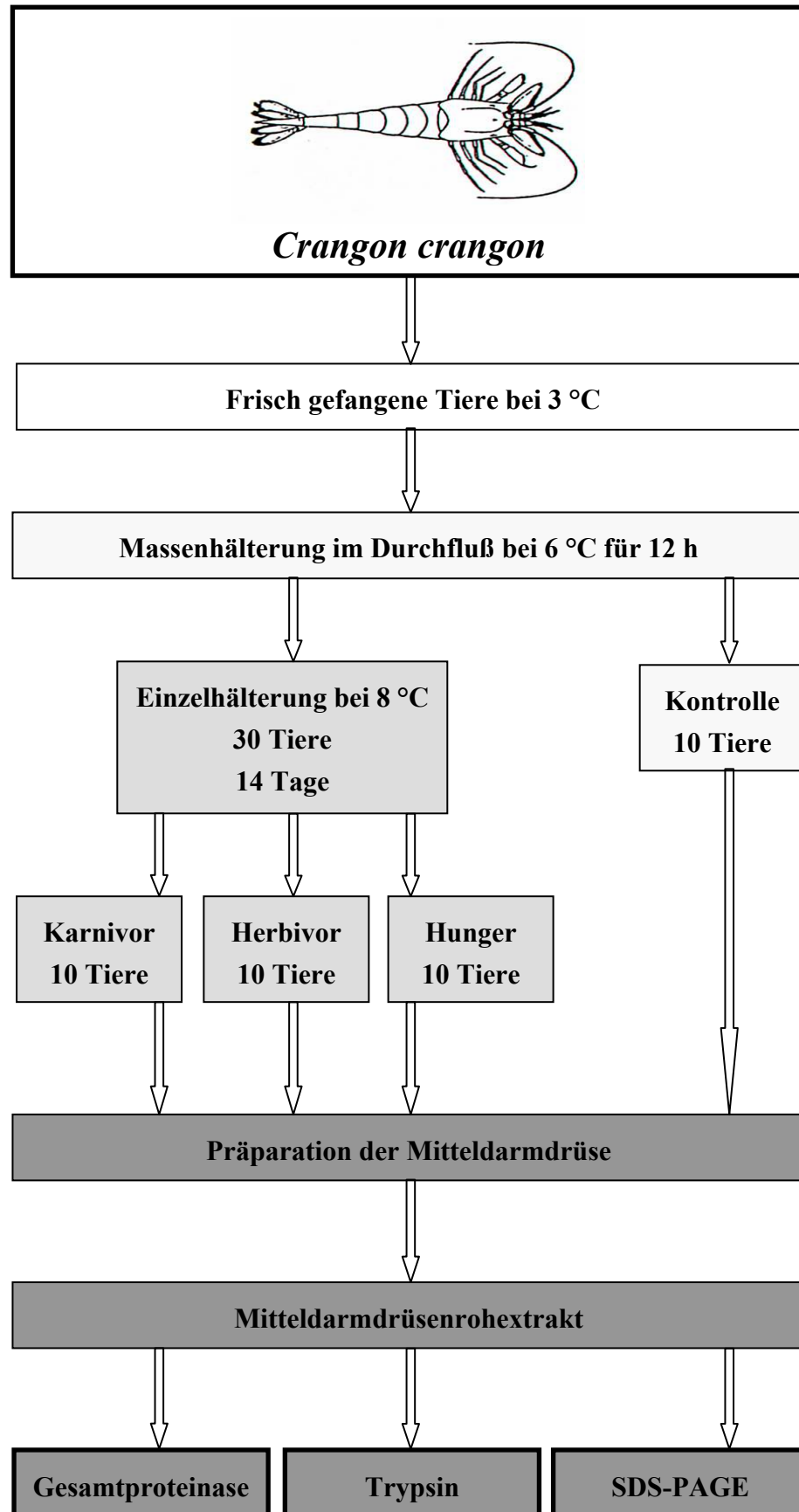


Abb. 7: Schema des Ernährungsversuches an *Crangon crangon*. Die unterschiedlichen Graustufen symbolisieren die einzelnen Versuchsabschnitte.





### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Quantifizierung der Enzymaktivität

##### 3.1.1 Gesamtproteinase

##### 3.1.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

###### Einfluss verschiedener Puffer

Der Einfluss verschiedener Reaktionspuffer auf die Aktivität der Gesamtproteinase wurde durch den Azocaseintest an Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* untersucht (s. Abb. 8).

Bei *C. crangon* war die Gesamtproteinase-Aktivität bei der Verwendung des Citrat-Phosphatpuffers signifikant höher als bei den anderen Puffern und lag 9 % höher als beim Imidazol-, 14 % höher als beim Tris-HCl- und 16 % höher als beim Phosphatpuffer, durch den die niedrigste Aktivität erreicht wurde.

Ähnliche Ergebnisse wurden für *C. allmani* erreicht. Hier führte der Citrat-Phosphat- und Phosphatpuffer zu signifikant höheren Aktivitäten als beim Imidazol und Tris-HCl-Puffer. Beim Citrat-Phosphatpuffer wurde erneut die höchste Aktivität erreicht, die um 23 bzw. 14 % höher lag als beim Imidazolpuffer bzw. Tris-HCl-Puffer. Beim Phosphatpuffer war die Aktivität in diesem Zusammenhang um 21 bzw. 13 % höher. Die niedrigste Aktivität wurde mit dem Imidazolpuffer erreicht. Die Gesamtproteinase-Aktivität zeigte zwischen dem Imidazol und Tris-HCl-Puffer bei beiden Arten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

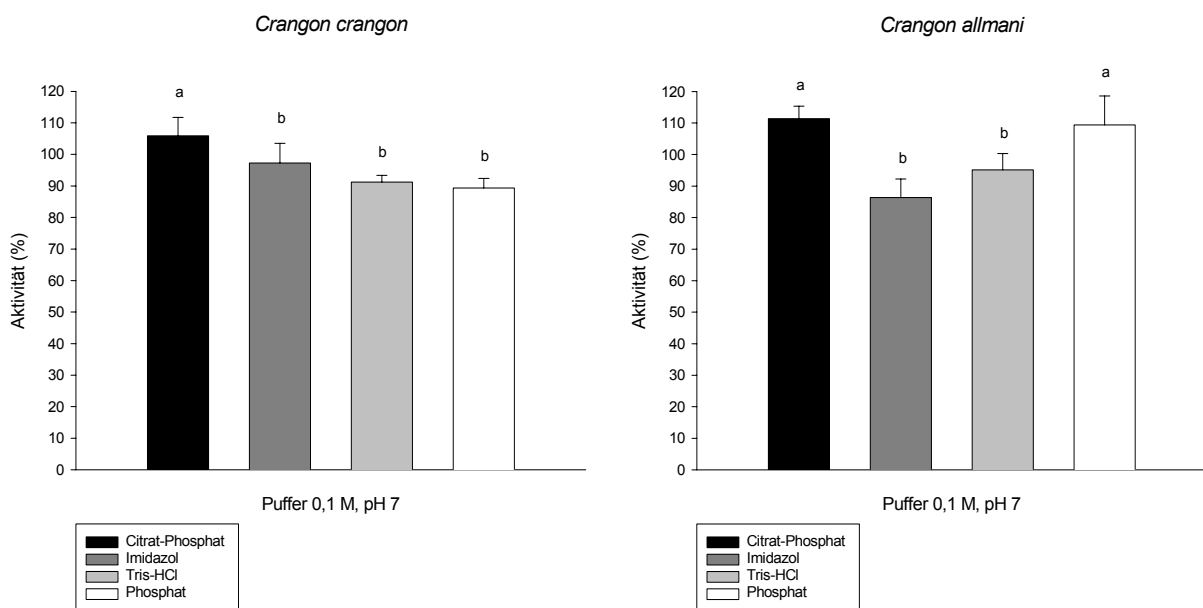


Abb. 8: Einfluss verschiedener Puffer auf die Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani*. Die Aktivität wurde in Relation zum gemeinsamen Mittelwert berechnet. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Tukey Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$  (*C. crangon*),  $n = 6$  (*C. allmani*)).

### Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$

Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Aktivität der Gesamtproteinase wurde bei *C. crangon* und *C. allmani* mit dem Tris-HCl- und dem Imidazolpuffer und unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen (10 mM und 20 mM) untersucht (s. Abb. 9). Mit dem Citrat-Phosphat- und Phosphatpuffer war dieser Ansatz nicht möglich, da aufgrund des Phosphatgehaltes der Puffer Calcium-Phosphatpräzipitate entstehen würden.

Bei *C. crangon* führte  $\text{Ca}^{2+}$  mit beiden eingesetzten Puffern zu einer signifikant höheren Aktivität als bei den jeweiligen Puffern ohne  $\text{Ca}^{2+}$ . Mit dem Tris-HCl-Puffer und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  stieg die Aktivität um 13 %, mit 20 mM  $\text{CaCl}_2$  um 10 %. Mit dem Imidazolpuffer stieg die Aktivität bei den genannten Konzentrationen um 9 bzw. 8 % an. Die unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen führten untereinander sowohl beim Tris-HCl-, als auch beim Imidazolpuffer zu keinen signifikanten Unterschieden ( $p > 0,05$ ).

Bei *C. allmani* führte  $\text{Ca}^{2+}$  ebenfalls bei beiden Puffern zu einer Erhöhung der Gesamtproteinase-Aktivität, die jedoch, mit Ausnahme des Tris-HCl-Puffers (20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), statistisch nicht signifikant war. Im Vergleich zum Tris-HCl-Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  stieg die Aktivität bei 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  um 9 %. Auch bei *C. allmani* führten die unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen untereinander bei beiden Puffern zu keinen signifikanten Unterschieden ( $p > 0,05$ ).

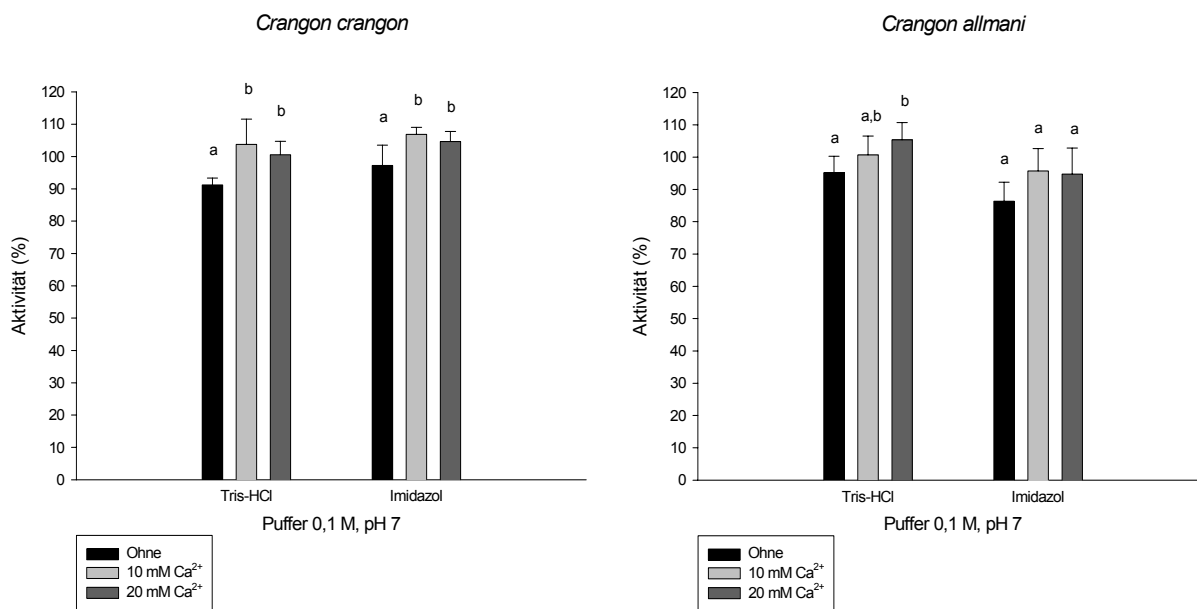


Abb. 9: Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani*. Die Aktivität wurde in Relation zum gemeinsamen Mittelwert berechnet. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Tukey Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$  (*C. crangon*),  $n = 6$  (*C. allmani*)).

### Einfluss des pH-Wertes

Die pH-Abhängigkeit der Gesamtproteinase wurde für *C. crangon* und *C. allmani* mit dem Tris-HCl- und dem Imidazolpuffer (0,1 M + 10 mM CaCl<sub>2</sub>) im Bereich von pH 5,0 – pH 8,0 durchgeführt (s. Abb. 10). Bei *C. crangon* lag die maximale Aktivität der Gesamtproteinase für beide verwendeten Puffer zwischen pH 5,5 und pH 6,0. Während bei *C. allmani* die maximale Aktivität der Gesamtproteinase für beide Puffer bei pH 5,0 lag. Bei beiden Arten nahm die Aktivität zum neutralen und alkalischen Bereich hin kontinuierlich ab und fiel bei pH 8,0 auf unter 65 % der maximalen Aktivität.

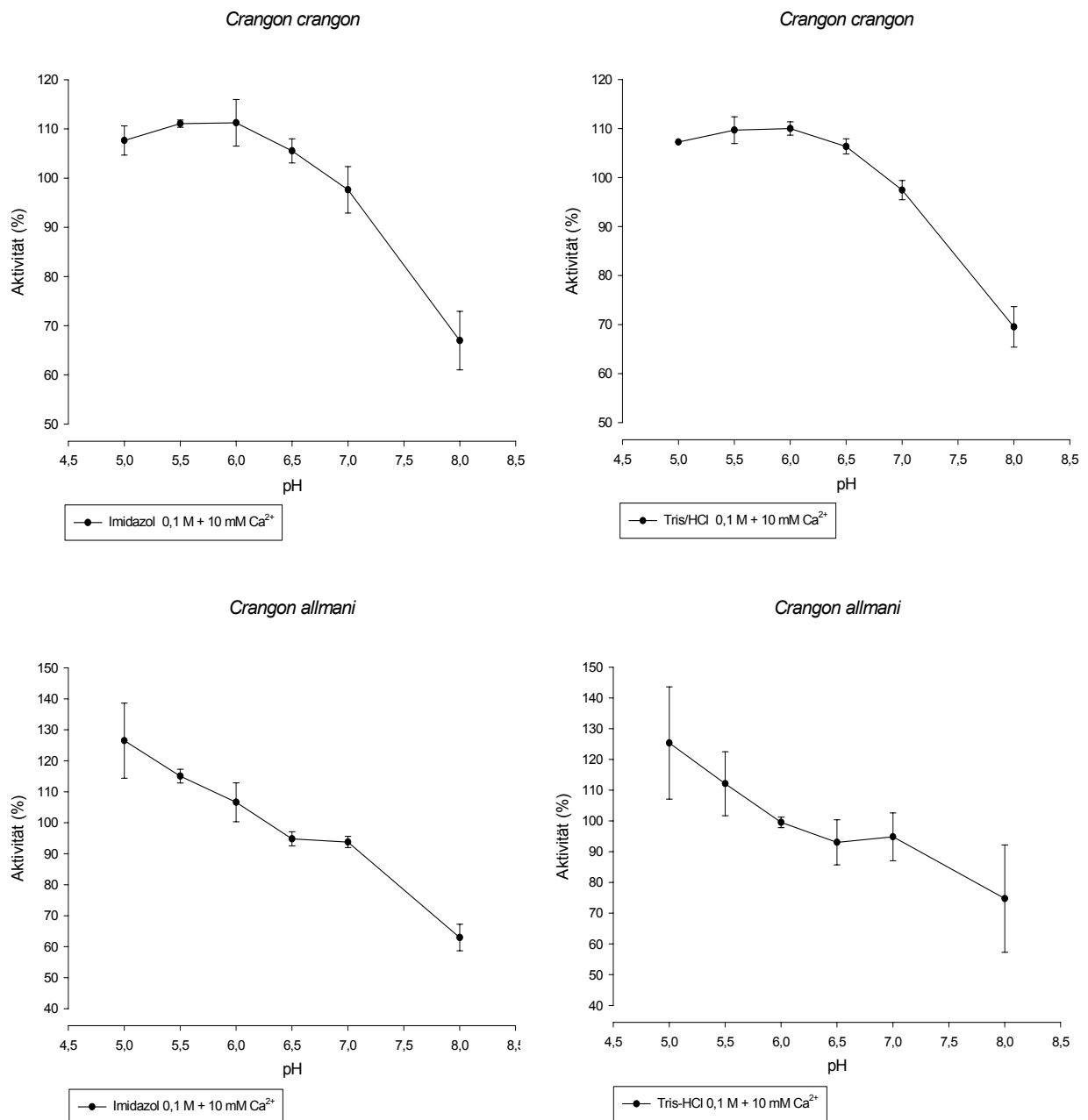


Abb. 10: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani*. Die Aktivität wurde in Relation zum gemeinsamen Mittelwert berechnet (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3).

Für alle folgenden Untersuchungen an Proteinasen der Nordseegarnelen wurden auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse der Tris-HCl- oder Imidazolpuffer mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration von 10 mM und einem pH-Wert von 6,0 als Reaktionspuffer verwendet. Für die Trypsinmessungen wurde aufgrund vorhandener Literaturangaben zum pH-Optimum jedoch ein pH-Wert von 8,0 gewählt.

### 3.1.1.2 Ermittlung spezifischer Eigenschaften der Gesamtproteinase

#### Thermostabilität

Zur Untersuchung der Thermostabilität der Gesamtproteinase wurden Mitteldarmdrüsenextrakte der beiden Arten bei Temperaturen von 20-60 °C bis zu einer Stunde vorinkubiert (s. Abb. 11). Bei beiden Arten nahm die Aktivität der Gesamtproteinase mit fortschreitender Inkubation kontinuierlich ab. Bei *C. crangon* verringerte sich die Aktivität bei einer Temperatur von 20 °C nach 60 min auf 70 % der Anfangsaktivität. Bei 30 °C sank die Aktivität nach 60 min bereits unter 50 % der Anfangsaktivität. Die weitere Erhöhung der Temperatur führte zu einer beschleunigten Denaturierung. So sank die Aktivität bei 40 °C bereits nach 45 min auf unter 50 %, bei 50 °C nach 30 min und bei 60 °C nach 16 min auf unter 50 % der Anfangsaktivität. Im Gegensatz dazu sank bei *C. allmani* die Aktivität bei 30 °C bereits nach 30 min unter 50 %, während sie bei 40, 50 und 60 °C bereits nach 15 min unter 50 % der Anfangsaktivität fiel. Bei 60 °C lag die Aktivität nach 15 min dabei nur noch bei 10 % der Anfangsaktivität, während sie bei *C. crangon* nach gleicher Vorinkubationszeit noch 50 % betrug.

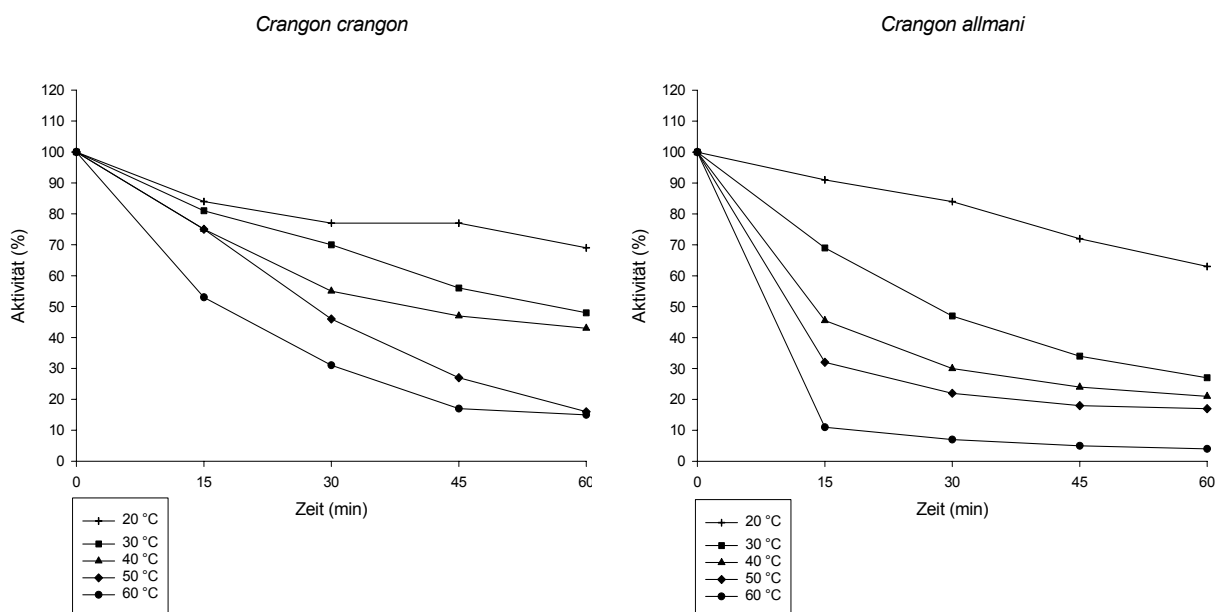


Abb. 11: Thermostabilität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani*. Vor der Durchführung der Aktivitätsbestimmung wurden Mitteldarmdrüsenextrakte bei Temperaturen von 20-60 °C für jeweils eine Stunde vorinkubiert. Alle 15 min wurde eine Unterprobe entnommen. Eine vor der Inkubation entnommene Unterprobe diente jeweils als Referenz.

### Langzeitstabilität

Die Aktivität der Gesamtproteinase wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) und unter Kühlung (5 °C) bestimmt (s. Abb. 12).

Bei *C. crangon* sank bei Raumtemperatur die Aktivität nach 24 Stunden auf 25 % der Anfangsaktivität und fiel über die restlichen 72 Stunden kontinuierlich auf 16 % ab. Unter Kühlung fiel die Aktivität kontinuierlicher ab und lag nach 96 Stunden noch über 25 % der Anfangsaktivität.

Bei *C. allmani* betrug die Aktivität bei Raumtemperatur nach 24 Stunden nur noch 9 % der Anfangsaktivität und sank weiter über den verbleibenden Versuchszeitraum auf 5 % ab. Auch bei Kühlung sank die Aktivität bereits nach 24 Stunden unter 40 % der Anfangsaktivität und verringerte sich kontinuierlich auf unter 30 % nach 96 Stunden.

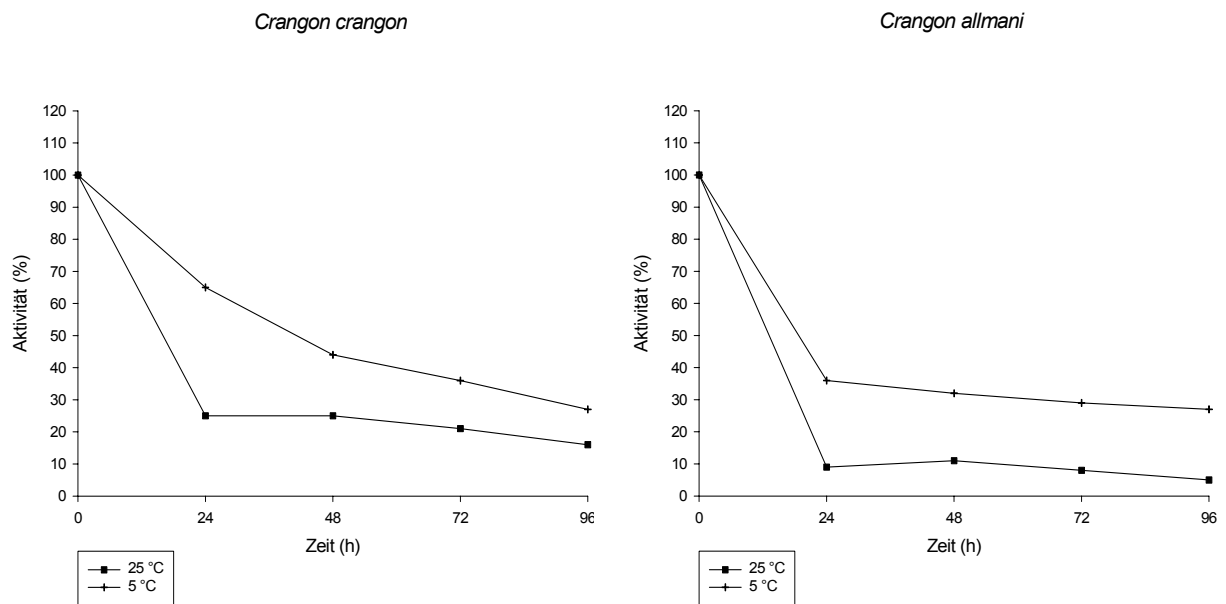


Abb. 12: Veränderung der Gesamtproteinase-Aktivität von *C. crangon* und *C. allmani* über die Zeit bei Raumtemperatur (25 °C) und unter Kühlung (5 °C). Über einen Zeitraum von 96 Stunden wurden jeweils alle 24 Stunden Unterproben entnommen und die Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt.

### Einfluss spezifischer Inhibitoren

Durch die Verwendung spezifischer Proteinaseinhibitoren wurde der quantitative Anteil einzelner Proteinaseklassen bestimmt. Dazu wurden Mitteldarmdrüsenextrakte von *C. crangon* und *C. allmani* vor dem Aktivitätstest mit den Inhibitoren E 64 und AEBSF (s. 2.3.1.2) inkubiert. E 64 ist ein Inhibitor für Cysteinproteinasen, AEBSF für Serinproteinasen. Zum Vergleich wurden für diese Untersuchung zusätzlich Mitteldarmdrüsenextrakte von *P. montagui*, *P. californiensis* und *E. superba* verwendet (s. Abb. 13).

Bei *C. crangon* und *C. allmani* verringerte sich die Aktivität der Gesamtproteinase unter dem Einfluss des Cysteinproteinase-Inhibitors E 64 um über 70 %, während unter dem Einfluss des Serinproteinase-Inhibitors AEBSF die Aktivität um weniger als 9 % sank.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei *P. montagui* erreicht. Hier verringerte sich die Aktivität durch E 64 um 60 %. AEBSF führte dagegen zu einem Aktivitätsverlust von 10 %.

Im Gegensatz dazu kehrten sich die Verhältnisse bei *P. californiensis* und *E. superba* um. Hier wurde die Aktivität der Gesamtproteinase durch E 64 nur um maximal 10 % verringert, während AEBSF zu einem Aktivitätsverlust von mindestens 50 % führte.

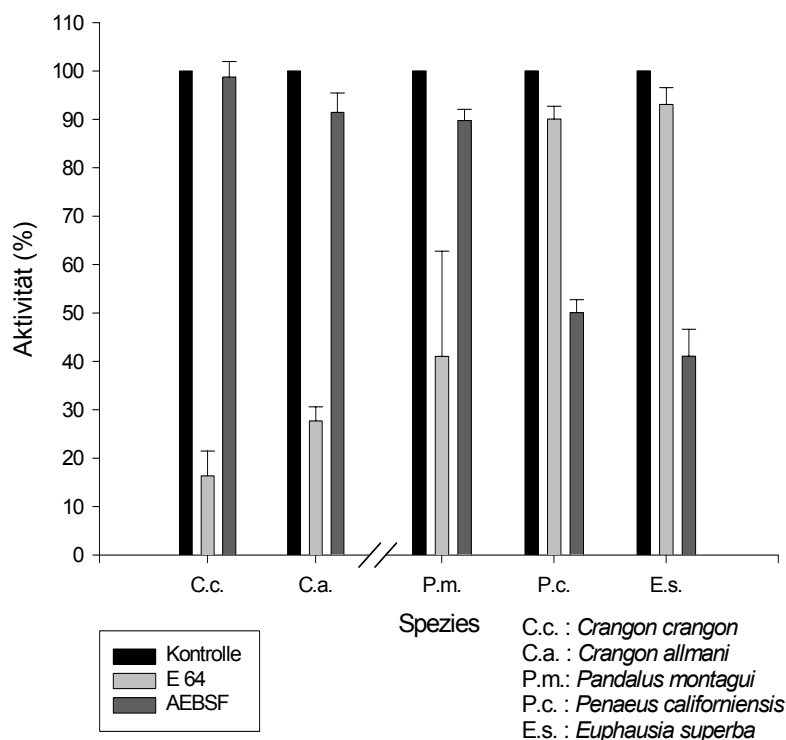


Abb. 13: Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon*, *C. allmani*, *P. montagui*, *P. californiensis* und *E. superba*. Die Aktivität wurde in Relation zur unbehandelten Kontrolle berechnet (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 3.1.1.3 Spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität der Gesamtproteinase wurde in denselben Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* bestimmt, bei denen zuvor der Einfluss der Inhibitoren untersucht wurde. Zusätzlich wurden zum Vergleich erneut *P. montagui* und *E. superba* sowie erstmals *P. bernhardus* und *C. pagurus* herangezogen. *P. californiensis* konnte aufgrund fehlender gewichtsspezifischer Daten nicht für die Aktivitätsbestimmung verwendet werden (s. Abb. 14).

Die gewichtsspezifischen Aktivitäten lagen zwischen 0,2 ( $\text{dE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ) bei *P. montagui* und 0,4 bei *E. superba*. Die Aktivitäten von *C. crangon* und *C. allmani* lagen hierbei mit 0,34 und 0,33 im mittleren Bereich. Insgesamt traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Arten auf ( $p > 0,05$ ).

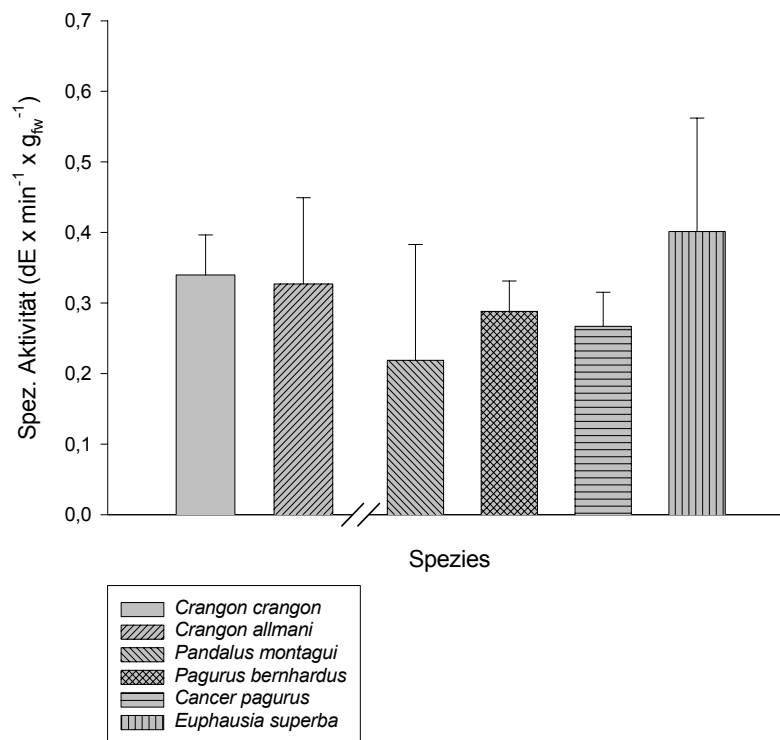


Abb. 14: Gewichtsspezifische Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon*, *C. allmani*, *P. montagui*, *P. bernhardus*, *C. pagurus* und *E. superba* (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Varianzanalyse,  $n = 3$ ).

### 3.1.2 Trypsin

#### 3.1.2.1 Spezifische Aktivität

Zusätzlich zur Gesamtproteinase-Aktivität wurde in denselben Mitteldarmdrüsenextrakten die spezifische Trypsin-Aktivität bestimmt (s. Abb. 15).

Bei den untersuchten Arten traten signifikante Unterschiede in der Höhe der spezifischen Trypsin-Aktivität auf. *E. superba* hatte mit 6,6 ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ) eine signifikant höhere spezifische Aktivität als alle anderen Arten. Eine zweite Gruppe bildeten *C. pagurus* und *P. bernhardus*, die sich mit Werten von 3,3 und 3,4 nicht voneinander unterschieden, aber sich signifikant von *P. montagui*, *C. allmani* und *C. crangon* absetzten, die wiederum untereinander keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zeigten. *C. crangon* und *C. allmani* hatten mit 0,6 bzw. 1,0 die geringsten spezifischen Aktivitäten.

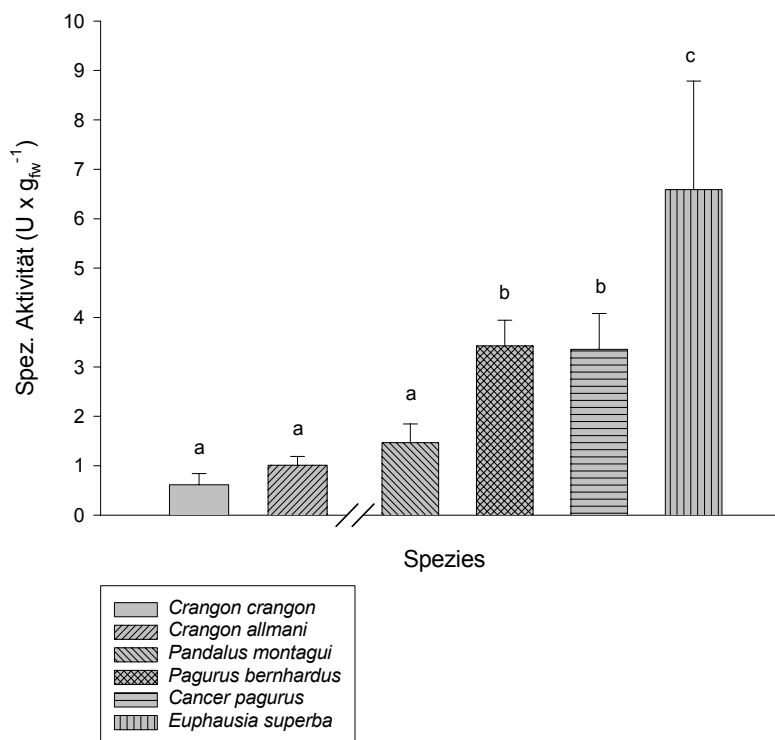


Abb. 15: Gewichtsspezifische Trypsin-Aktivität von *C. crangon*, *C. allmani*, *P. montagui*, *P. bernhardus*, *C. pagurus* und *E. superba*. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Student-Newmann-Keuls Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ,  $n = 4$  (*C. pagurus* und *P. bernhardus*)).



### 3.1.2.2 Trypsin / Gesamtproteinase Verhältnis

Aus der Trypsin-Aktivität und der Aktivität der Gesamtproteinase wurde ein Trypsin / Gesamtproteinase-Verhältnis für die untersuchten Arten berechnet. Es handelt sich dabei um ein rein numerisches Verhältnis aus unterschiedlich berechneten Aktivitätswerten. Es entspricht also nicht dem tatsächlichen Anteil des Trypsins an der Gesamtproteinase, ist dem aber proportional (s. Abb. 16).

Die untersuchten Arten wiesen ausgeprägte Unterschiede im Trypsin / Gesamtproteinase-Verhältnis auf. *C. crangon* und *C. allmani* hatten mit Werten von 0,03 und 0,05 den niedrigsten Trypsinanteil. Bei der verwandte Art *P. montagui* lag der Wert mit 0,1 um den Faktor 3,5 bzw. 2 höher als bei *C. crangon* bzw. *C. allmani*. *P. bernhardus* zeigte eine 6,2-fach bzw. 3,7-fach höheren, *C. pagurus* eine 7,4-fach bzw. 4,5-fach höheren Trypsinanteil als *C. crangon* bzw. *C. allmani*. *E. superba* hatte mit einem Wert von 0,3 den höchsten Trypsinanteil, der um den Faktor 10 höher lag als bei *C. crangon* und um den Faktor 6 höher lag als bei *C. allmani*.

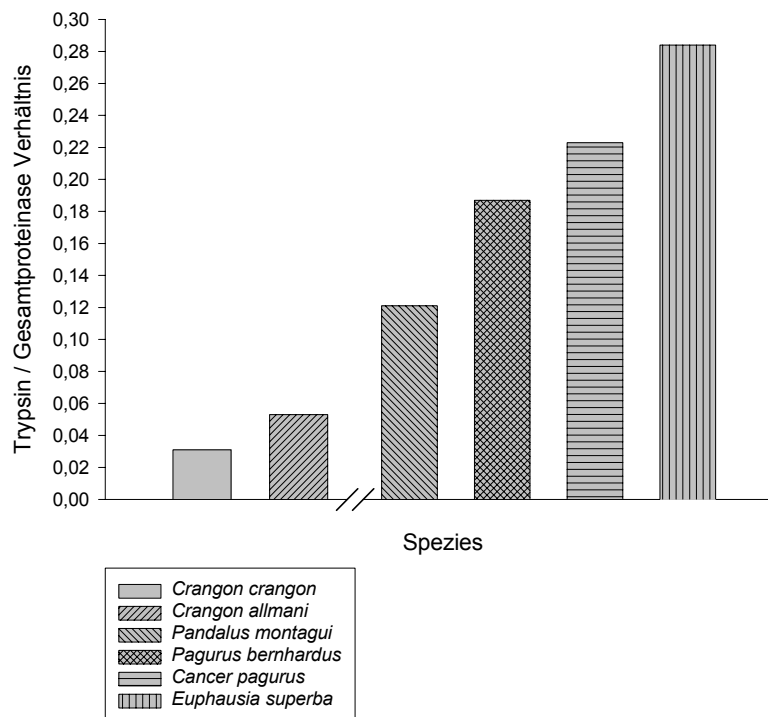


Abb. 16: Trypsin / Gesamtproteinase Verhältnis von *C. crangon*, *C. allmani*, *P. montagui*, *P. bernhardus*, *C. pagurus* und *E. superba*. Das Verhältnis wurde durch den Quotienten aus der Trypsin- und der Gesamtproteinase-Aktivität berechnet ( $n = 3$ ,  $n = 4$  (*C. pagurus* und *P. bernhardus*)).

### 3.1.2.3 Häufigkeitsverteilung

Die Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitätsniveaus wurde bei *C. crangon* und *C. allmani* in Mitteldarmdrüsenextrakten von jeweils 30 Tieren untersucht. Die ermittelten Werte wurden in drei Gruppen unterschiedlich hoher Trypsin-Aktivität eingeteilt ( $< 2,0$ ,  $2,0 - 6,0$ ,  $> 6,0$  ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ )) (s. Abb. 17). Bei *C. crangon* hatten 20 Tiere eine spezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0$ , 6 Tiere hatten eine Aktivität zwischen  $2,0$  und  $6,0$  und nur bei 4 Tieren lag die Aktivität über  $6,0$ . Damit lag bei insgesamt 67 % aller untersuchten Tiere die spezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0$ . Bei *C. allmani* hatten 26 Tiere eine Trypsin-Aktivität unter  $2,0$ . Dies entsprach 87 % aller Tiere. Nur 4 Tiere wiesen Aktivitäten über  $2,0$  auf, von denen nur ein Tier eine Aktivität über  $6,0$  hatte.

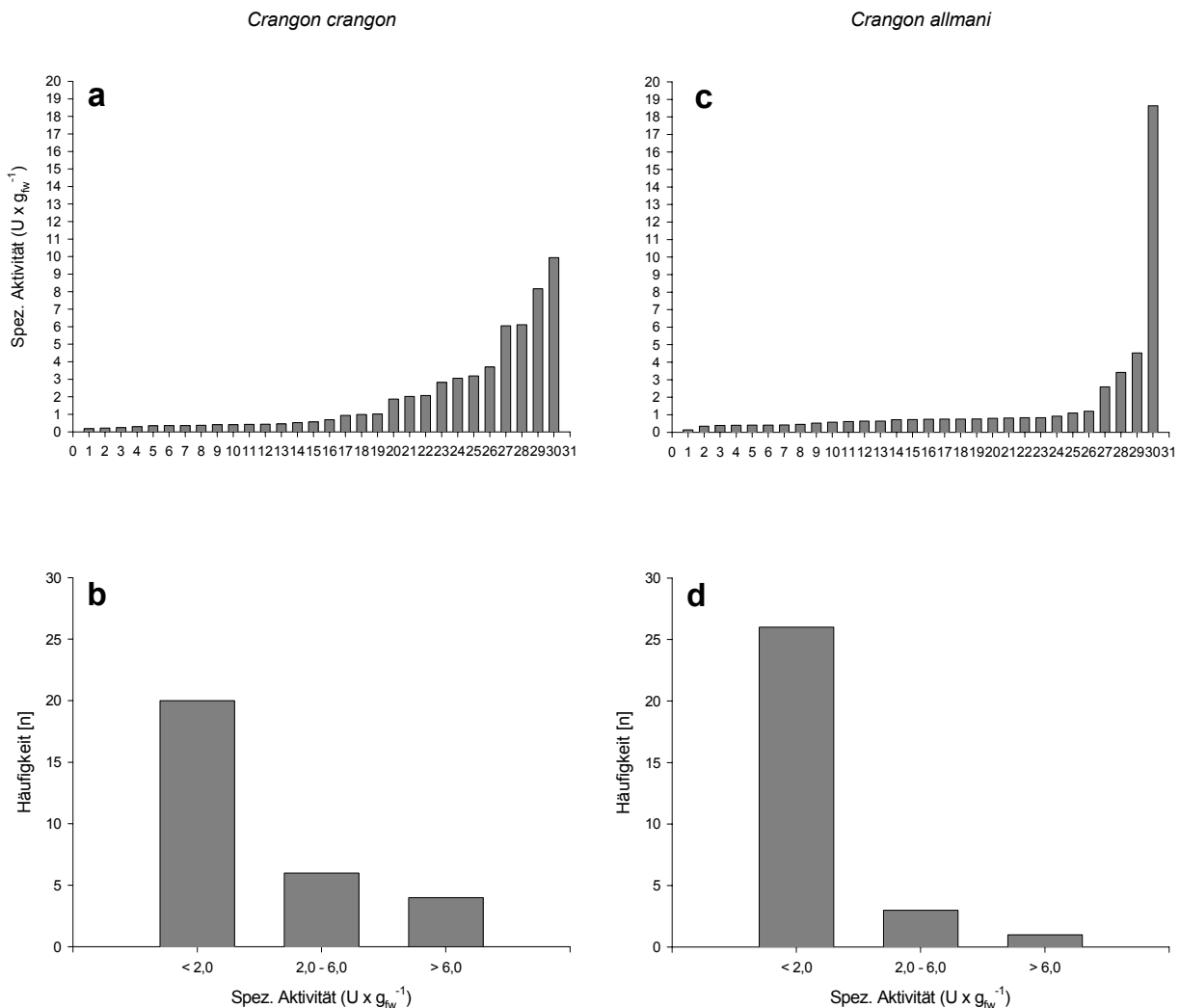


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten bei *C. crangon* (a,b) und *C. allmani* (c,d). Einzeldarstellung (a, c) und Histogramm (b, d), n = 30.

### 3.1.2.4 Trypsin / Gesamtproteinase Beziehung

Für eine Darstellung der Beziehung zwischen Trypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität bei *C. crangon* und *C. allmani* wurden die zuvor ermittelten gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivitäten gegen die gewichtsspezifischen Aktivitäten der Gesamtproteinase aufgetragen (s. Abb. 18).

Weder bei *C. crangon* noch bei *C. allmani* ließ sich eine Korrelation zwischen der gewichtsspezifischen Trypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität feststellen. Diejenigen Tiere, die eine erhöhte spezifische Trypsin-Aktivität aufwiesen, zeigten im Vergleich mit den Tieren niedriger Trypsin-Aktivität keine erhöhten spezifischen Aktivitätswerte der Gesamtproteinase.

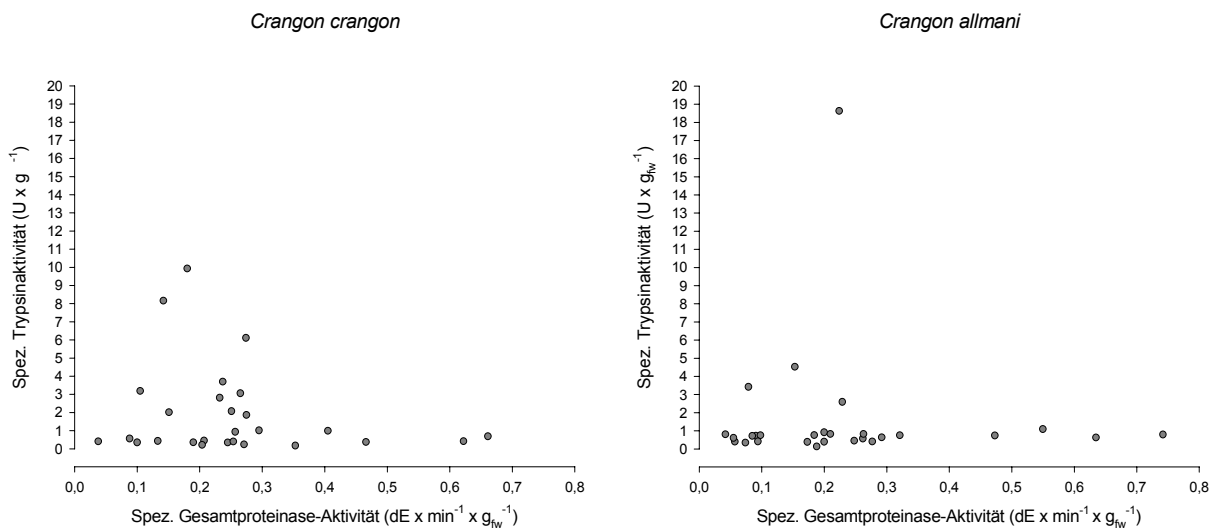


Abb. 18: Beziehung von spezifischer Gesamtproteinase- und Trypsin-Aktivität bei *C. crangon* und *C. allmani*. n = 30.

### 3.1.3 Allometrische Beziehung

Für die Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Gesamtproteinase- bzw. der Trypsin-Aktivität von der Ausprägung der Mitteldarmdrüse (MD) in Relation zum Gesamtgewicht bei *C. crangon* und *C. allmani* wurden die spezifischen Gesamtproteinase- und Trypsin-Aktivitäten gegen den jeweiligen prozentualen Anteil der Mitteldarmdrüse am Gesamtgewicht aufgetragen und die Beziehung durch eine lineare Regression dargestellt (s. Abb. 19). Bei *C. crangon* nahm die gewichtsspezifische Aktivität der Gesamtproteinase mit abnehmenden Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse signifikant zu. Bei *C. allmani* konnte die gleiche Tendenz beobachtet werden, jedoch war die Regression in diesem Fall nicht signifikant. In beiden Fällen zeigte sich eine ausgeprägte Streuung der Werte. Zwischen der gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität und dem Anteil der Mitteldarmdrüse konnte weder bei *C. crangon* noch bei *C. allmani* eine Korrelation festgestellt werden.

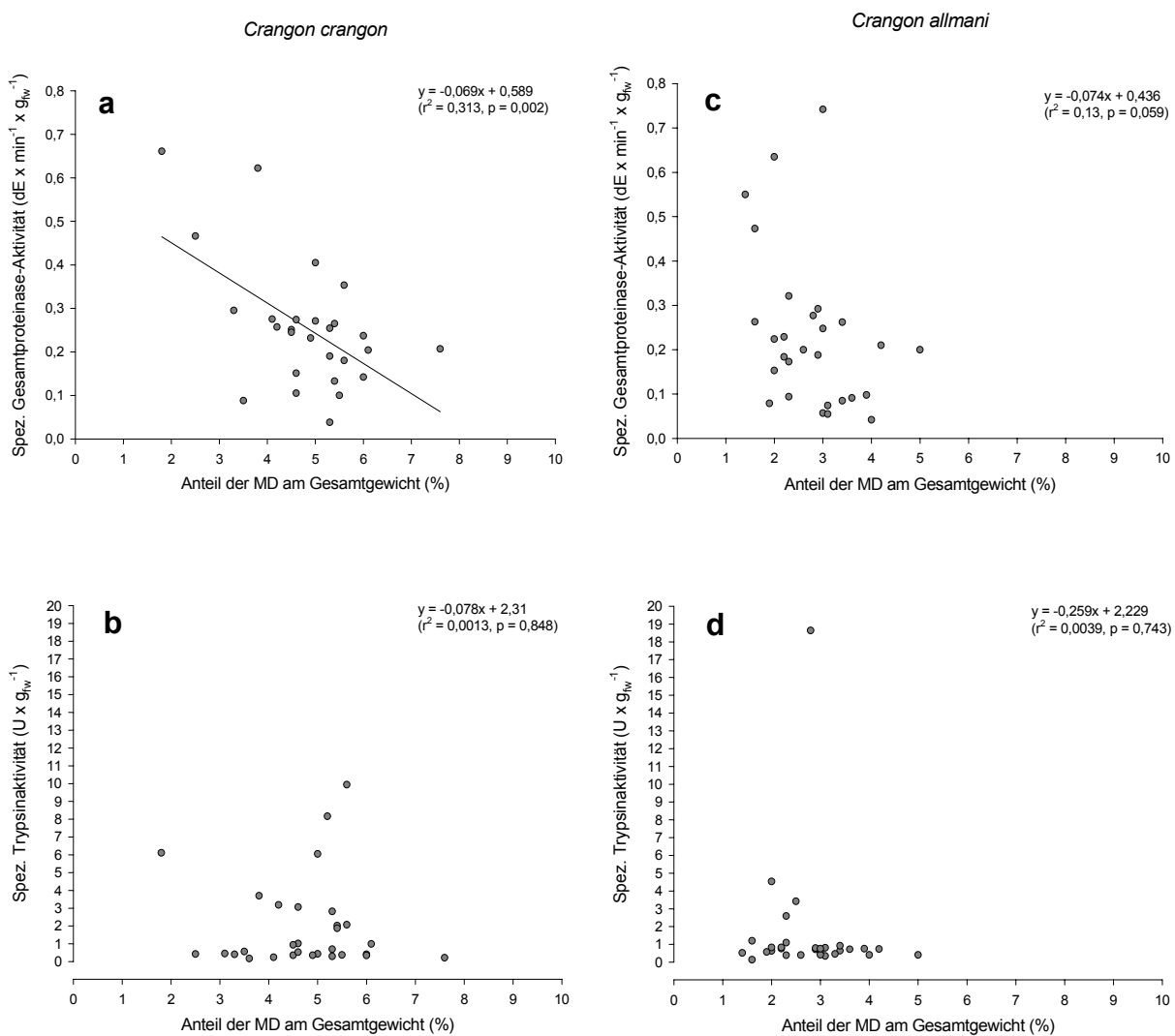


Abb. 19: Beziehung von spezifischer Gesamtproteinase-(a, c) bzw. Trypsin-Aktivität (b, d) und dem prozentualen Anteil der MD am Gesamtgewicht bei *C. crangon* (a, b) und *C. allmani* (c, d).  $n = 30$ .

## 3.2 Charakterisierung des Enzymspektrums

Für die Identifizierung und Isolierung einzelner Proteinasen speziell Trypsin und einzelner Peptidasen wurden aus den unter (3.1.2.3) verwendeten 30 Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* einzelne Extrakte für die weiteren Analysen ausgewählt. Für die Anionenaustauschchromatographie wurden zum einen Extrakte verwendet, die eine gewichtsspezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  aufwiesen, und damit das am häufigsten vorkommende Aktivitätsniveau repräsentierten. Für eine Gegenüberstellung wurden zum anderen Extrakte mit einer erhöhten Trypsin-Aktivität über 2,0 ausgewählt. Für die Isolierung von Trypsin mit Hilfe der Affinitätschromatographie wurden die Extrakte mit maximaler spezifischer Trypsin-Aktivität verwendet. Nach der Durchführung beider chromatographischer Arbeitsverfahren wurden anschließend ausgewählte Fraktionen durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese weiterführend aufgetrennt.

### 3.2.1 Anionenaustauschchromatographie

Nach der chromatographischen Auftrennung der Extrakte wurden die erhaltenen Fraktionen im weiteren Verlauf durch verschiedene Aktivitätstests genauer analysiert, um einzelne Proteinasen und Peptidasen zu identifizieren und ihre Verteilung in den Fraktionen zu bestimmen.

#### 3.2.1.1 Gesamtproteinase

In den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani*-Extrakten mit einer gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  (0,36 und 0,45) wurde mit dem Azocaseintest (s. 2.4.1.1) die Verteilung der Gesamtproteinase-Aktivität untersucht. Desweiteren wurde die Proteinkonzentration in den Fraktionen durch den Proteintest nach Bradford (s. 2.4.1.2) bestimmt (s. Abb. 20). Bei *C. crangon* eluierte die Gesamtheit der Proteinasen nach Anstieg des Gradienten in zwei getrennten Aktivitätsmaxima zwischen Fraktion 30 und 50 und somit bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M – 0,6 M. Die höchste Aktivität der Gesamtproteinase befand sich in Fraktion 34 (0,28 M NaCl). Das zweite Aktivitätsmaximum fand sich dagegen in Fraktion 38 (0,36 M NaCl). Vor dem Anstieg des Gradienten war keine Aktivität zu verzeichnen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Endopeptidasen, die die Gesamtproteinase ausmachen, vollständig an das Säulenmaterial gebunden haben. Mit dem Bradford-Test wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen bestimmt und mit der Aufzeichnung des UV-Monitors bei 280 nm verglichen. Die Konzentration korrelierte bis Fraktion 44 deutlich mit der Schreiberzeichnung (280 nm) und zeigte ein Maximum bei Fraktion 36 im Bereich der maximalen Proteinaseaktivität. Ab Fraktion 50 divergierte die Proteinkonzentration (Bradford) von der UV-Aufzeichnung. Es handelte sich also bei den Substanzen, die bei 280 nm detektiert wurden, offensichtlich nicht mehr um Proteine.

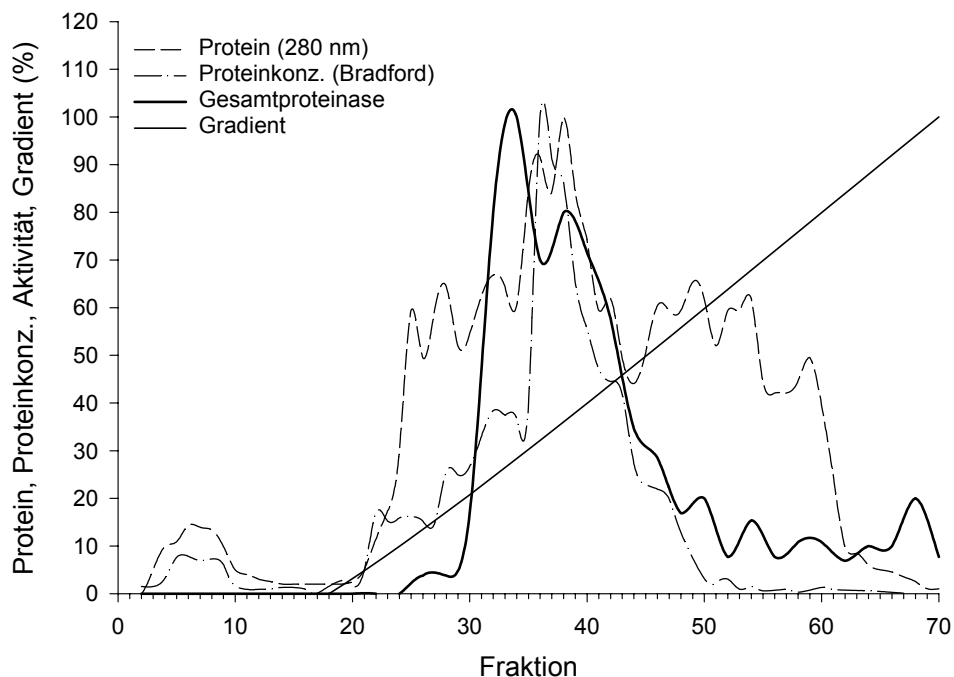
*Crangon crangon*

Abb. 20: Elutionsprofil der Gesamtproteinase von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Bei *C. allmani* eluierte die Gesamtheit der Proteinase nach Anstieg des NaCl-Gradienten ebenfalls in zwei Aktivitätsmaxima zwischen Fraktion 30 und 50 und damit bei einer NaCl-Konzentration von  $0,2 - 0,6 \text{ M}$  (s. Abb. 21). Die höchste Aktivität befand sich in diesem Fall in Fraktion 36 ( $0,32 \text{ M NaCl}$ ), während sich das zweite Aktivitätsmaximum in Fraktion 43 befand ( $0,45 \text{ M NaCl}$ ). Vor dem Anstieg des Gradienten wurde eine geringe Aktivität verzeichnet, die offensichtlich auf nicht bindende Proteinasebestandteile zurückzuführen ist. Deutlicher als bei *C. crangon* korrelierte bei *C. allmani* das Profil der Proteinkonzentration mit dem Profil der Gesamtproteinase und dem Proteinprofil bei  $280 \text{ nm}$ . Das Maximum der Proteinkonzentration lag in diesem Fall wie das Maximum der Gesamtproteinase in Fraktion 36. Ebenso wie bei *C. crangon* handelt es sich bei den Probenbestandteilen, die ab Fraktion 50 bei  $280 \text{ nm}$  detektiert wurden, offensichtlich nicht um Proteine.

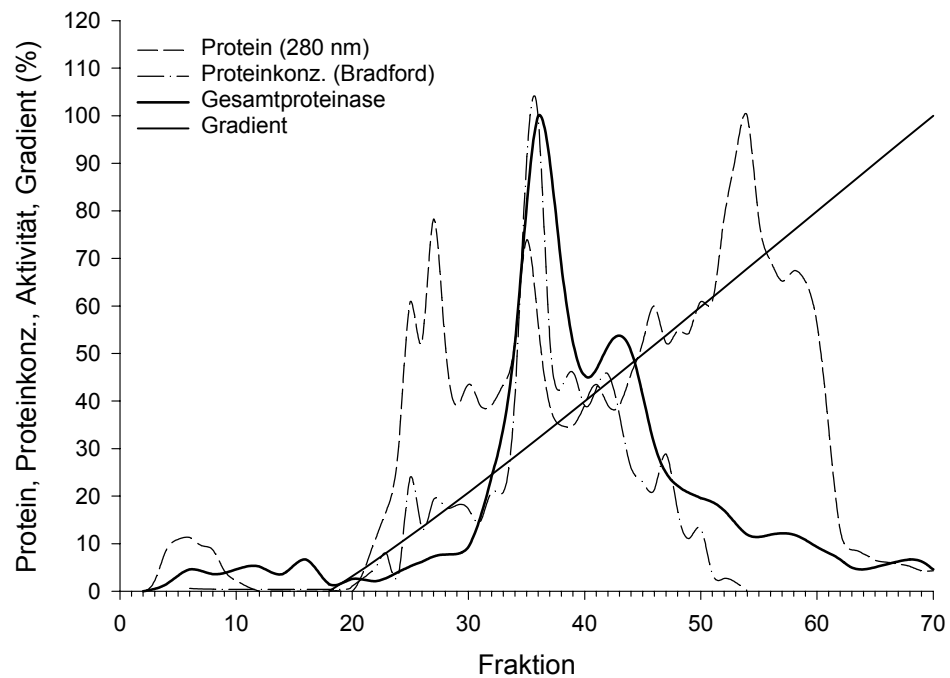
*Crangon allmani*

Abb. 21: Elutionsprofil der Gesamtproteinase von *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

### 3.2.1.2 Einfluss spezifischer Inhibitoren

Um den Anteil einzelner Proteinaseklassen zu untersuchen, wurde der Gesamtproteinasetest in den Fraktionen nach chromatographischer Auftrennung unter dem Einfluss spezifischer Proteinaseinhibitoren durchgeführt. Dazu wurde auf die bereits unter (3.1.1.2) beschriebenen Inhibitoren zurückgegriffen. Für diesen Versuchsansatz wurde ausschließlich ein Mitteldarmdrüsenextrakt von *C. crangon* mit einer spezifischen Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  verwendet (s. Abb. 22). Die Gesamtproteinase eluierte wie schon bei den dargestellten Profilen zwischen Fraktion 30 und 50. Auch hier lag das Aktivitätsmaximum in Fraktion 34 ( $0,28 \text{ M NaCl}$ ), gefolgt von einem zweiten Maximum in Fraktion 38 ( $0,36 \text{ M NaCl}$ ). Unter dem Einfluss des Cysteinproteinaseinhibitors E 64 fiel die Aktivität der Gesamtproteinase von Fraktion 24 bis zur Fraktion 38, also über den gesamten Bereich des ersten Maximums und den Beginn des zweiten Aktivitätsmaximums auf unter  $10 \%$  ab. Erst ab Fraktion 38 stieg die Aktivität wieder kontinuierlich an und erreichte letztlich in Fraktion 41  $65 \%$  der maximalen Aktivität. Nach diesem Maximum fiel die Aktivität in den weiteren Fraktionen gleichsinnig mit der nicht inhibierten Aktivität ab. Unter dem Einfluss des Serinproteinaseinhibitors AEBSF zeigte das Proteinaseprofil keine drastischen

Aktivitätseinbrüche. Im Bereich des ersten Aktivitätsmaximums bei Fraktion 34 lag die Aktivität bei 80 % und fiel im weiteren Verlauf nicht unter 90 % der nicht inhibierten Proteinaseaktivität.

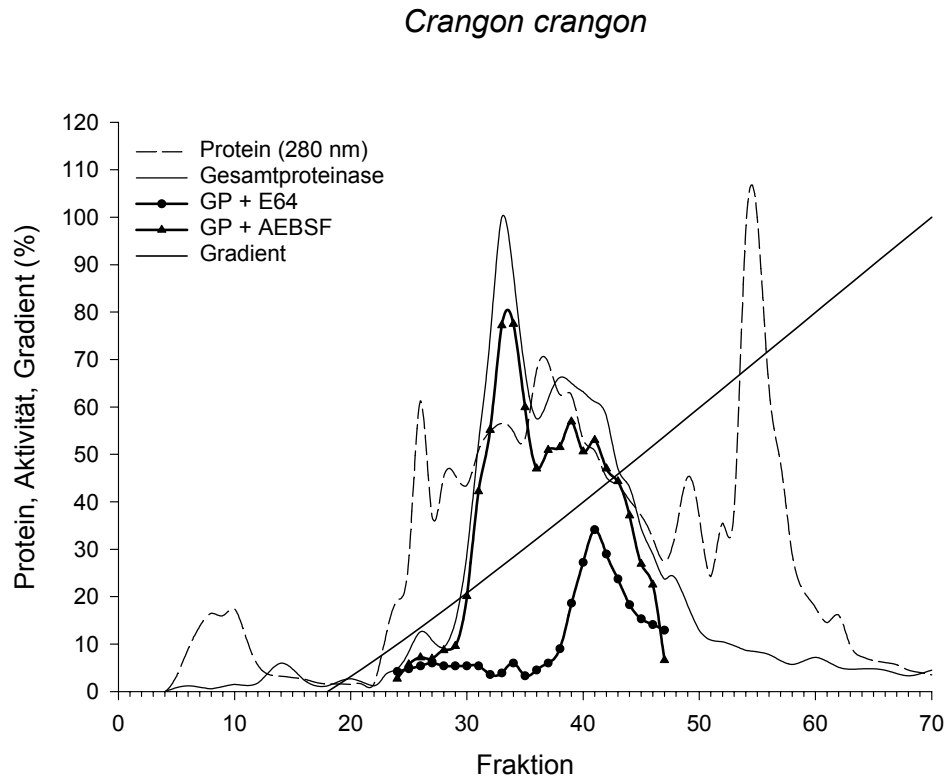


Abb. 22: Einfluss der spezifischen Proteinaseinhibitoren E 64 und AEBSF auf die Aktivität der Gesamtproteinase (GP) von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

### 3.2.1.3 Identifikation einzelner Proteinasen und Peptidasen

Die Identifikation einzelner Proteinasen und Peptidasen in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie erfolgte durch die Verwendung spezifischer synthetischer chromogener und fluorogener Substrate (s. 2.4.1.1). Die Identifikation der Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin erfolgte zuerst in den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani*, bei denen die Verteilung der Gesamtproteinase untersucht wurde (s. 3.2.1.1), also an den Tieren, die eine gewichtsspezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  aufwiesen (s. Abb. 23). Trotz der deutlich vorhandenen Gesamtproteinase-Aktivität konnte weder bei *C. crangon* noch bei *C. allmani* in den Fraktionen eine signifikante Trypsin- oder Chymotrypsin-Aktivität nachgewiesen werden.



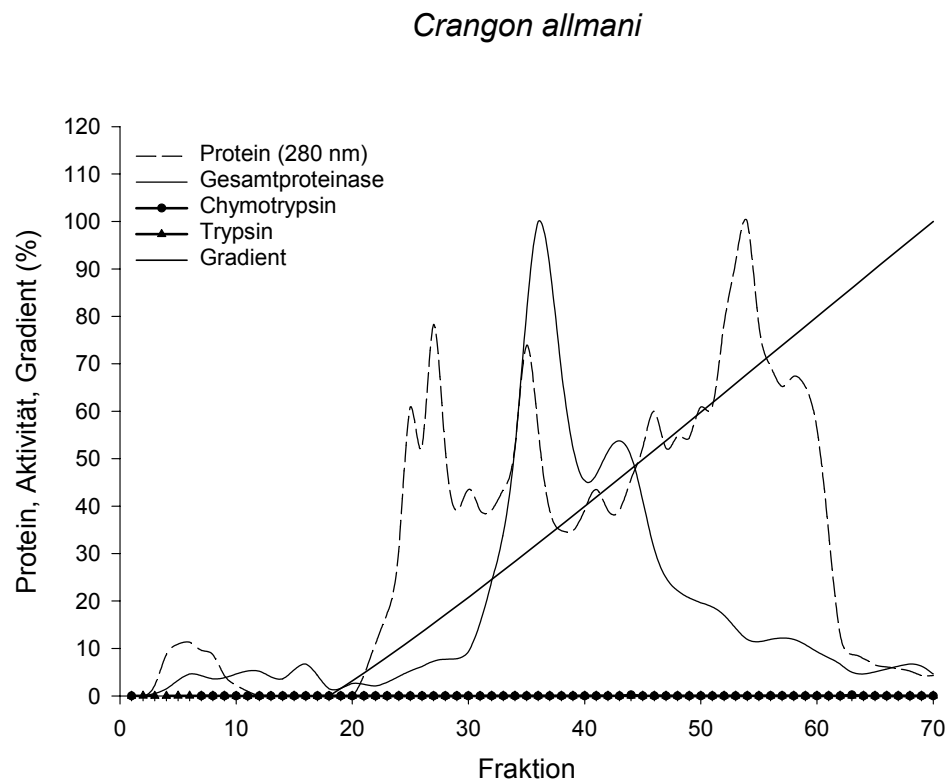
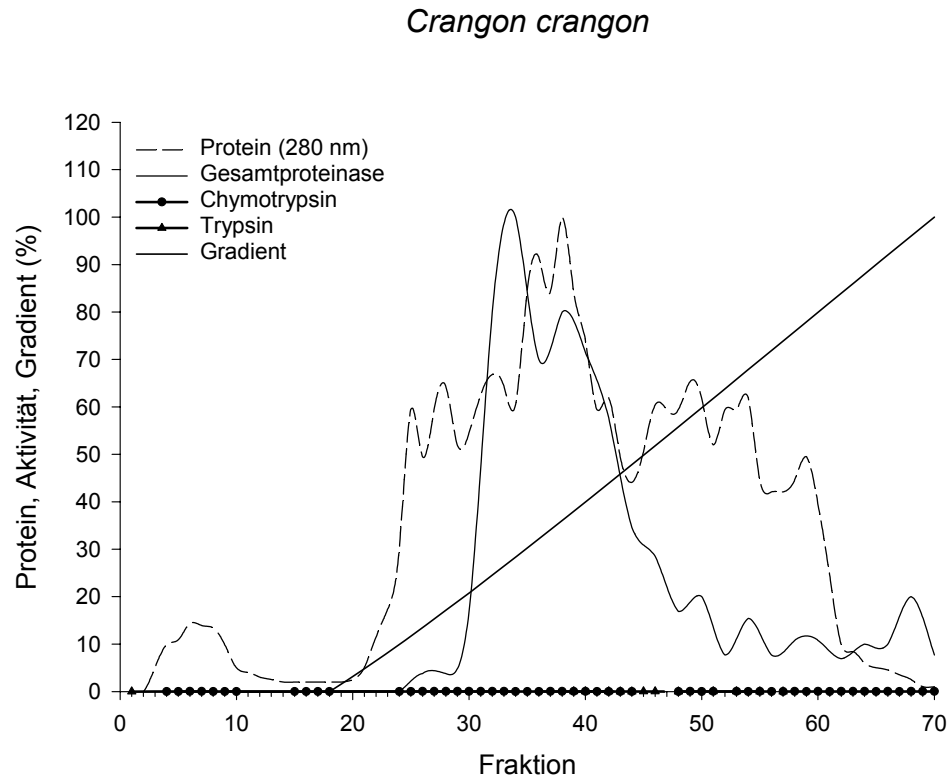


Abb. 23: Elutionsprofil der Gesamtproteinasen und Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin von *C. crangon* und *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Anschließend erfolgte der gleiche Nachweis in den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani*, bei denen zuvor in den Mitteldarmdrüsenextrakten gewichtsspezifische Trypsin-Aktivitäten über  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$  nachgewiesen wurden. Hierbei wurde für *C. crangon* ein Extrakt mit einer spezifischen Trypsin-Aktivität von 8,16 und für *C. allmani* von 3,42 verwendet. Bei *C. crangon* bestätigte sich das schon aufgezeigte Profil der Gesamtproteinase, das zwischen Fraktion 30 und 50 und somit bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M – 0,6 M eluierte, wobei sich hier nur ein deutliches Aktivitätsmaximum zeigte (s. Abb. 24). Die maximale Aktivität der Gesamtproteinase befand sich in Fraktion 33 (0,28 M NaCl). Ein zweites Aktivitätsmaximum deutete sich dagegen in Fraktion 37 (0,36 M NaCl) an. Zwischen Fraktion 34 und 38 konnte eine deutliche Trypsin-Aktivität mit einem Maximum in Fraktion 36 bei einer NaCl-Konzentration von 0,32 M nachgewiesen werden. Die maximale Trypsin-Aktivität befand sich somit nicht in der Fraktion der maximalen Aktivität der Gesamtproteinase.

### *Crangon crangon*

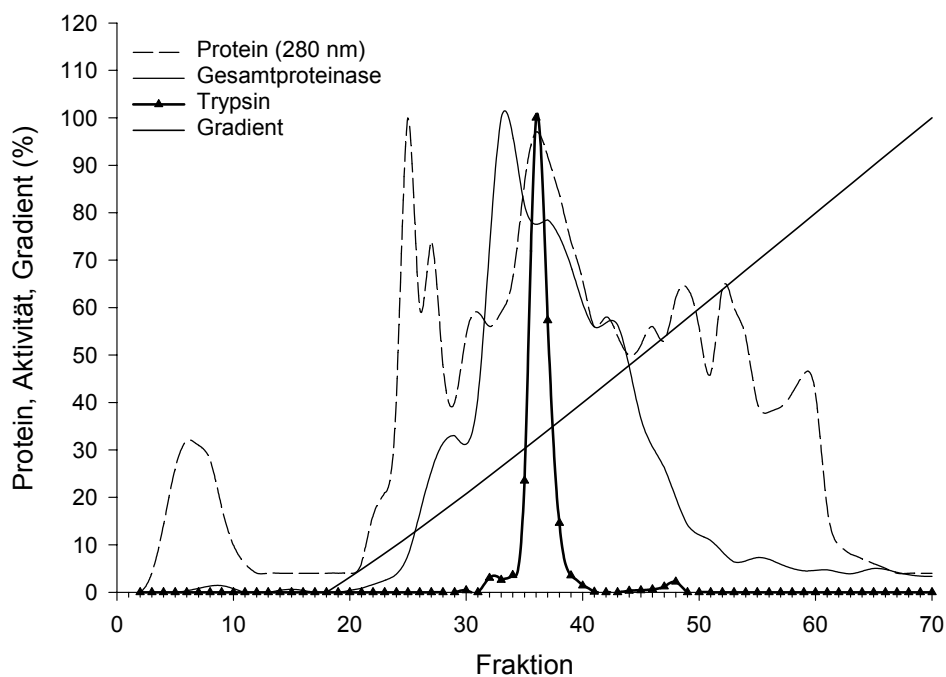


Abb. 24: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinase Trypsin von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität von  $8,16 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Wie zu erwarten, eluierte die Gesamtheit der Proteinasen bei *C. allmani* wie zwischen Fraktion 30 und 50 (s. Abb. 25). In diesem Fall zeigten sich deutlich die für *C. allmani* schon beschriebenen zwei Aktivitätsmaxima (3.2.1.1). Die höchste Aktivität konnte bei einer NaCl-Konzentration von 0,32 M in Fraktion 36 nachgewiesen werden, gefolgt von einem zweiten Maximum bei einer Konzentration von 0,45 M in Fraktion 42. Vor Anstieg des Gradienten konnte eine gewisse Proteinaseaktivität gemessen werden, so daß davon ausgegangen werden muß, daß nicht alle Proteinasen an das Säulenmaterial gebunden haben. In Fraktion 36 zeigte sich ein deutliches Aktivitätsmaximum von Trypsin. Ebenso wie bei *C. crangon* eluierte das Enzym bei einer NaCl-Konzentration von 0,32 M. Anders als bei *C. crangon* traten bei *C. allmani* jedoch das Aktivitätsmaximum der Gesamtproteinase und das von Trypsin in derselben Fraktion auf.

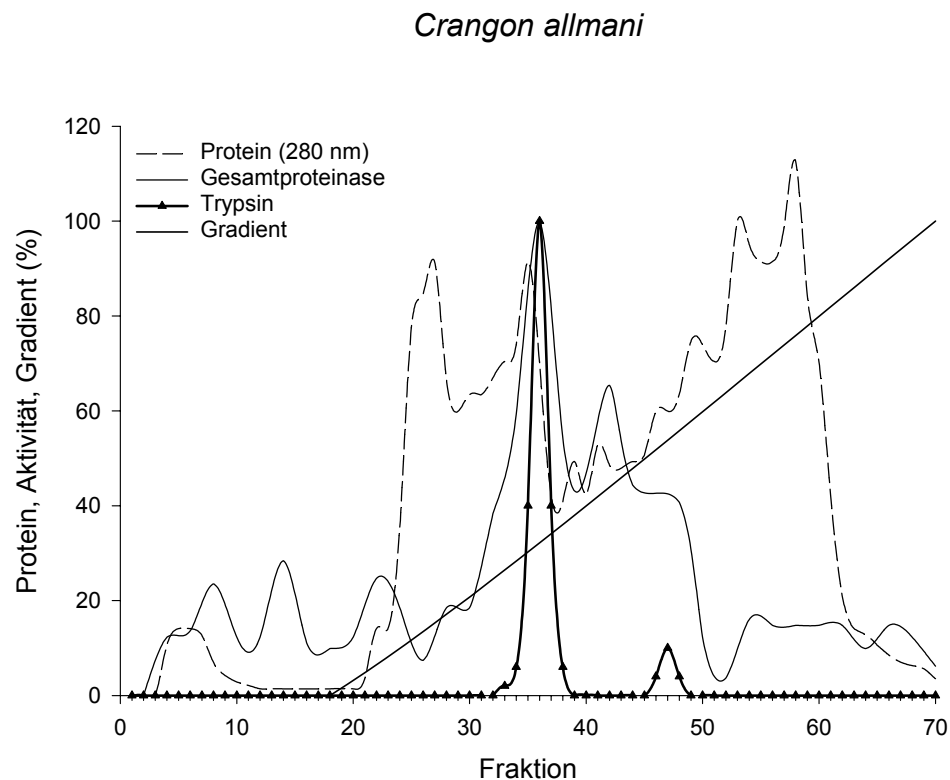


Abb. 25: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinase Trypsin von *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität von  $3,42 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Für die Serinproteinase Chymotrypsin konnte bei *C. crangon* eine deutliche Aktivität zwischen Fraktion 22 und 40 festgestellt werden ( $0,067 - 0,4 \text{ M NaCl}$ ) (s. Abb. 26). Die maximale Aktivität wurde in Fraktion 27 bei einer NaCl-Konzentration von  $0,15 \text{ M}$

gemessen. Eine vor Beginn des Gradienten detektierte Chymotrypsin-Aktivität deutete auf geringe Mengen nicht gebundenes Enzym hin.

### *Crangon crangon*

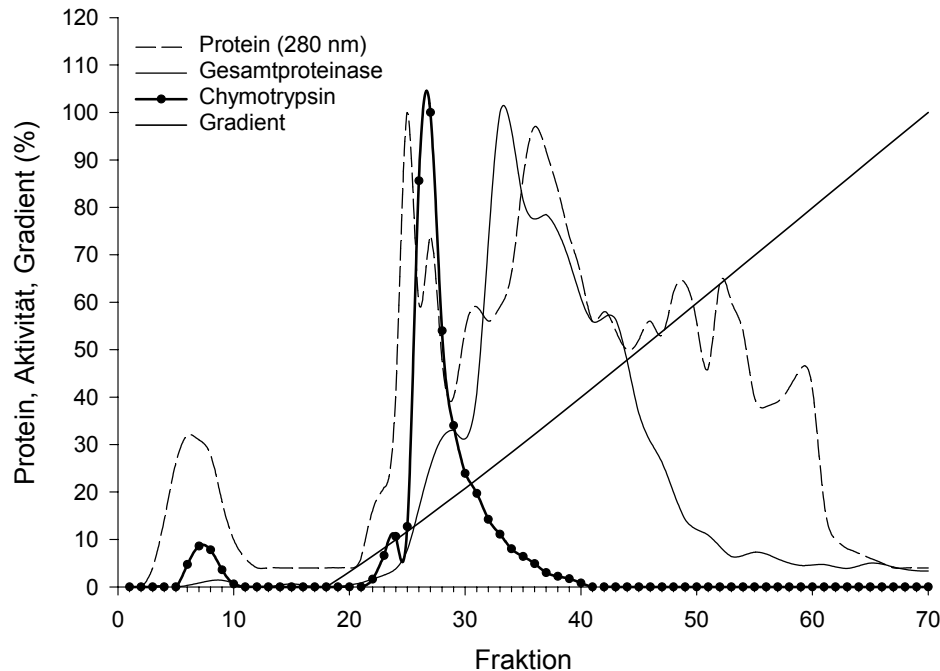


Abb. 26: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinase Chymotrypsin von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität von  $8,16 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Bei *C. allmani* konnte wie bei *C. crangon* zwischen Fraktion 22 und 40 (0,067 – 0,4 M NaCl) eine Aktivität von Chymotrypsin gemessen werden (s. Abb. 27). Die maximale Aktivität trat im Unterschied zu *C. crangon* hier jedoch in Fraktion 34 bei einer NaCl-Konzentration von 0,28 M NaCl auf und damit nur um 0,04 M niedriger als Trypsin, das bei 0,32 M eluierte (s.o.). Ein zweites Aktivitätsmaximum zeigte sich in Fraktion 24 (0,1 M NaCl). Bei einer NaCl-Konzentration um 0,15 M war jedoch im Unterschied zu *C. crangon* kein deutliches Aktivitätsmaximum festzustellen.

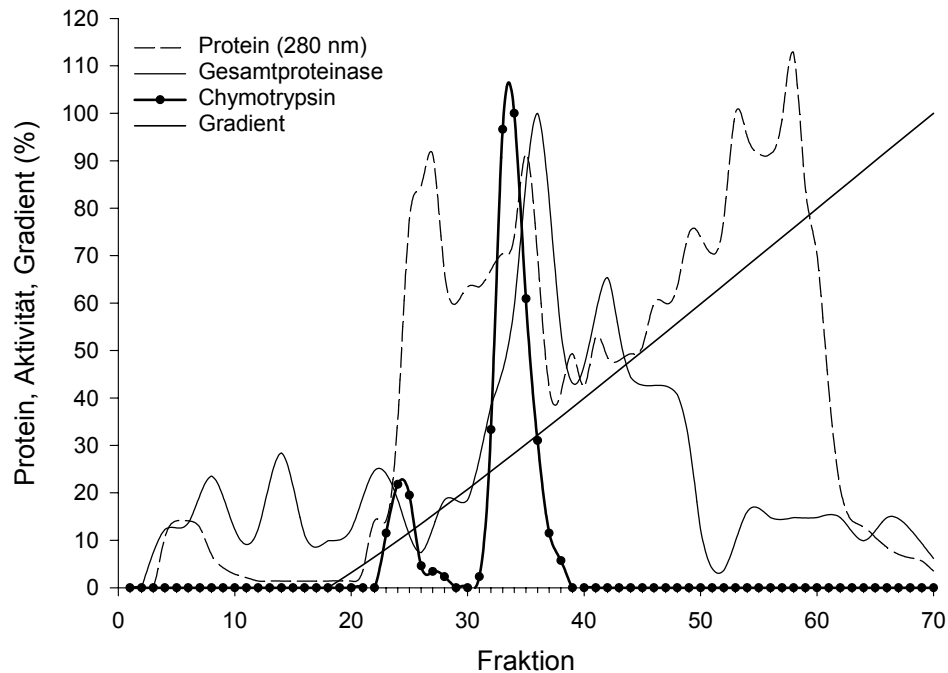
*Crangon allmani*

Abb. 27: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinase Chymotrypsin von *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität von  $3,42 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Im Anschluß wurde an Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani*, die trotz einer vorhandenen Gesamtproteinase-Aktivität keine signifikante Aktivität der Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin zeigten, untersucht, ob die Cysteinproteinase Cathepsin L nachzuweisen ist. Nach chromatographischer Auftrennung der Extrakte konnte bei beiden Arten eine Cathepsin L-Aktivität in den Fraktionen nachgewiesen werden (s. Abb. 28). Sowohl bei *C. crangon*, als auch bei *C. allmani* zeigten sich drei voneinander getrennte Aktivitätsmaxima bei 0,1, 0,15 und 0,28 M NaCl, die jedoch bei beiden Arten in unterschiedlicher Intensität ausgeprägt waren. Bei *C. crangon* eluierte Cathepsin L mit der höchsten Aktivität bei 0,15 M NaCl (Fraktion 23). Ein zweites Aktivitätsmaximum hatte *C. crangon* bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 M. In Fraktion 31 bei einer Konzentration von 0,28 M NaCl erreichte die Aktivität ein weiteres kleineres Maximum. Bei *C. allmani* trat Cathepsin L mit der höchsten Aktivität bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 M auf (Fraktion 24), gefolgt von zwei weiteren kleineren Maxima gleicher Intensität (Fraktion 28 und 34). Bei beiden Arten korrelierte das Aktivitätsprofil von Cathepsin L mit der Schreiberaufzeichnung bei 280 nm. Bei *C. allmani* zeigte sich zusätzlich eine Übereinstimmung mit dem Aktivitätsprofil der Gesamtproteinase, die sich bei *C. crangon* nur andeutete.

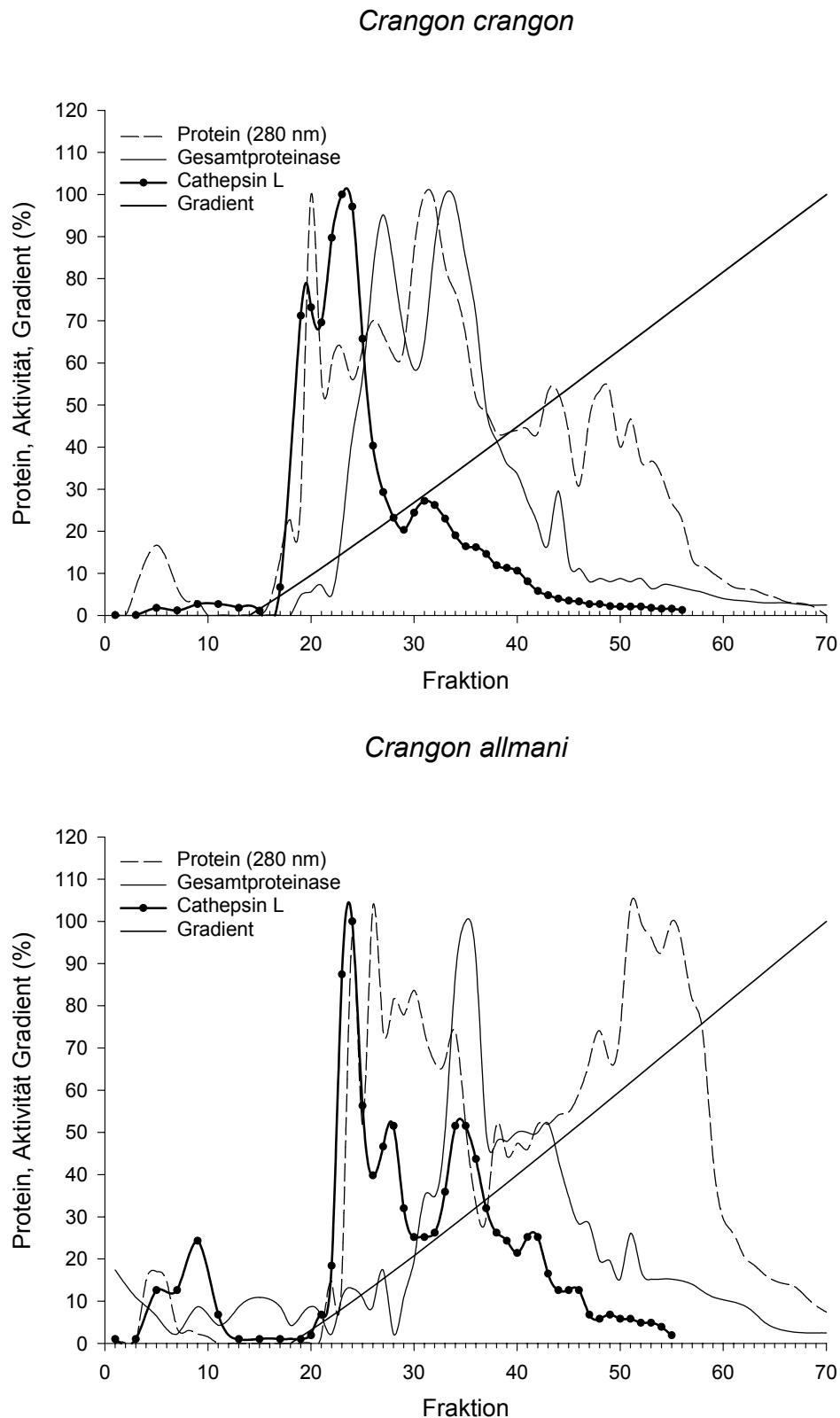


Abb. 28: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Cysteinproteinase Cathepsin L von *C. crangon* und *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fr}}^{-1})$ . Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.

Die Identifikation der Peptidasen (Exopeptidasen) Aminosäure-Arylamidase und Leucin-Aminopeptidase erfolgte ebenfalls an chromatographisch aufgetrennten Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* (s. Abb. 29). Bei *C. crangon* eluierte die Peptidase Aminosäure-Arylamidase mit einem Aktivitätsmaximum in Fraktion 23 bei einer NaCl-Konzentration von 0,15 M gefolgt von einem zweiten Maximum in Fraktion 26 bei 0,2 M NaCl. Ebenfalls in Fraktion 26 eluierte die Leucin-Aminopeptidase mit der höchsten Aktivität, gefolgt von einem zweiten deutlich schwächeren Maximum in Fraktion 31 bei 0,27 M NaCl.

Bei *C. allmani* traten bei beiden Peptidasen jeweils nur eines der beiden Aktivitätsmaxima auf. Die Aminosäure-Arylamidase eluierte wie bei *C. crangon* mit höchster Aktivität bei 0,15 M NaCl (Fraktion 23), zeigte jedoch kein zweites Maximum bei 0,2 M. Die Leucin-Aminopeptidase eluierte mit höchster Aktivität bei 0,27 M NaCl (Fraktion 30). Bei 0,2 M NaCl, der Konzentration, bei der die Leucin-Aminopeptidase im Falle von *C. crangon* mit höchster Aktivität auftrat, wurde bei *C. allmani* keine Aktivität festgestellt.

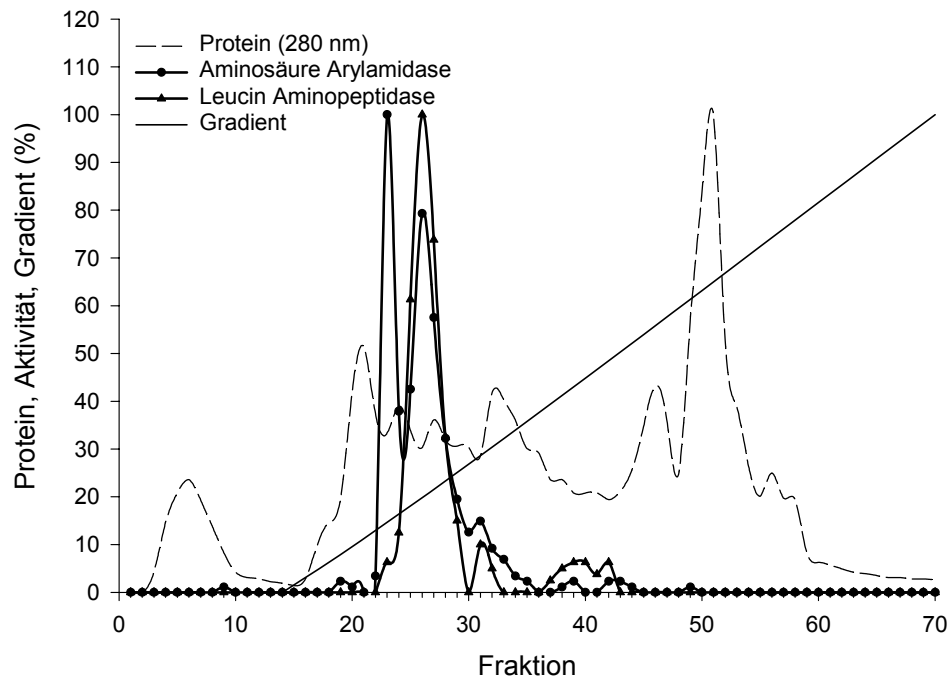
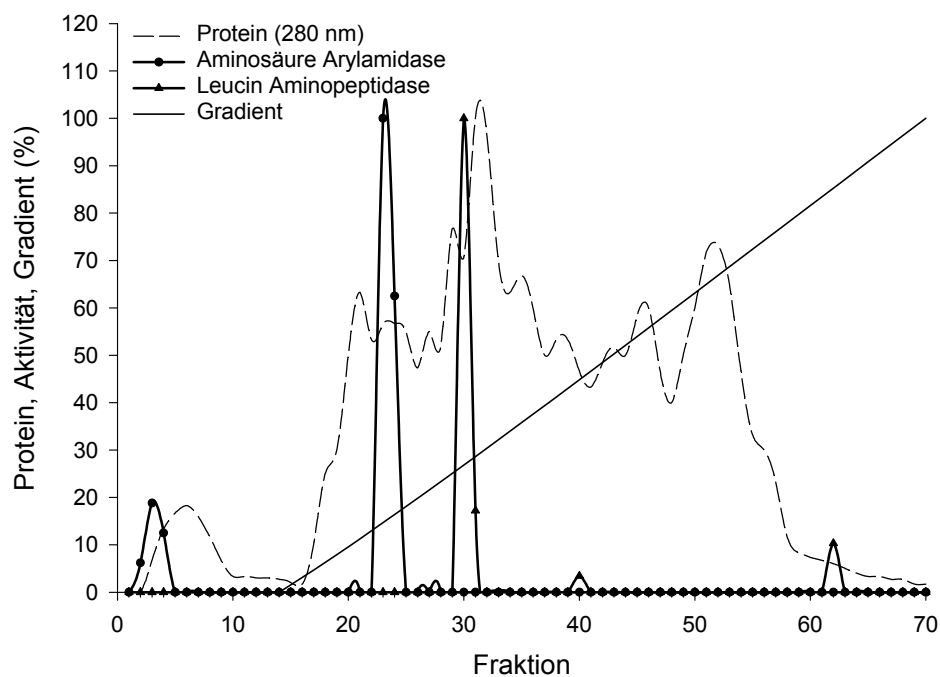
*Crangon crangon**Crangon allmani*

Abb. 29: Elutionsprofil der Peptidasen Aminosäure-Arylamidase und Leucin-Aminopeptidase von *C. crangon* und *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt. Die Aufreinigung erfolgte über eine Bio-Rad UNO-Q1 Anionenaustauschersäule an einer FPLC Arbeitsstation. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben.



### 3.2.2 Affinitätschromatographie

Mit der Affinitätschromatographie (s. 2.4.2) sollten Trypsin und trypsinähnliche Serinproteinasen aus den Mitteldarmdrüsenextrakten in einem Arbeitsschritt isoliert werden. Es wurden aus den unter (3.1.2.3) verwendeten 30 Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* jeweils die Extrakte mit maximaler gewichtsspezifischer Trypsin-Aktivität ausgewählt. Hierbei wurde für *C. crangon* ein Extrakt mit einer spezifischen Trypsin-Aktivität von 9,93 und für *C. allmani* von 18,63 ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ) verwendet.

Sowohl die nicht bindenden Proteinbestandteile nach dem Waschen der Säule, als auch das Eluat wurden jeweils in fünf Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen (Fraktion W1 – W5 und E1 – E5). Anschließend wurde in den so gewonnenen Fraktionen die Trypsin-Aktivität (s. 2.4.1.1) und die Proteinkonzentration (s. 2.4.1.2) bestimmt (s. Abb. 30).

Bei *C. crangon* trat die maximale Proteinkonzentration in Fraktion W1 auf. Über die folgenden vier Fraktionen fiel die Konzentration dann kontinuierlich auf 8 % der maximalen Konzentration ab, bevor sie in der Fraktion E2 mit 58 % ein zweites Maximum erreichte. Über die verbleibenden Fraktionen fiel die Konzentration dann erneut auf 8 % ab. Die Trypsin-Aktivität zeigte einen deutlichen Anstieg im Bereich der Fraktionen E1 – E5 mit einem Aktivitätsmaximum in Fraktion E2. Die Fraktionen W1 – W5 zeigten hingegen keine Trypsin-Aktivität. Vor diesem Hintergrund konnte von einer erfolgreichen affinitätschromatographischen Isolierung der trypsinähnlichen Serinproteinasen ausgegangen werden. Bei *C. allmani* zeigte das Profil der Proteinkonzentration einen ähnlichen Verlauf wie bei *C. crangon* und ebenfalls Maximalwerte in Fraktion W1 und E2. Im Gegensatz zu *C. crangon* trat die maximale Proteinkonzentration in Fraktion E2 auf und Fraktion W1 wies nur 39 % im Vergleich zu E2 auf. Die Trypsin-Aktivität zeigte in den Fraktionen die gleiche Verteilung wie bei *C. crangon* mit einem Maximum in Fraktion E2. Auch in diesem Fall konnte somit von einer erfolgreichen Isolierung der trypsinähnlichen Serinproteinasen ausgegangen werden.

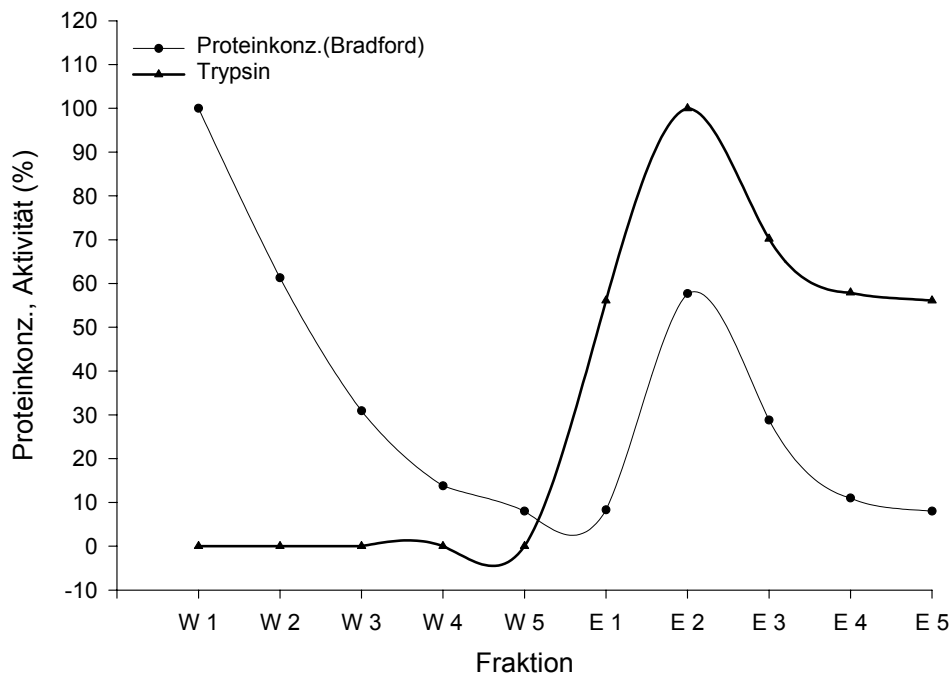
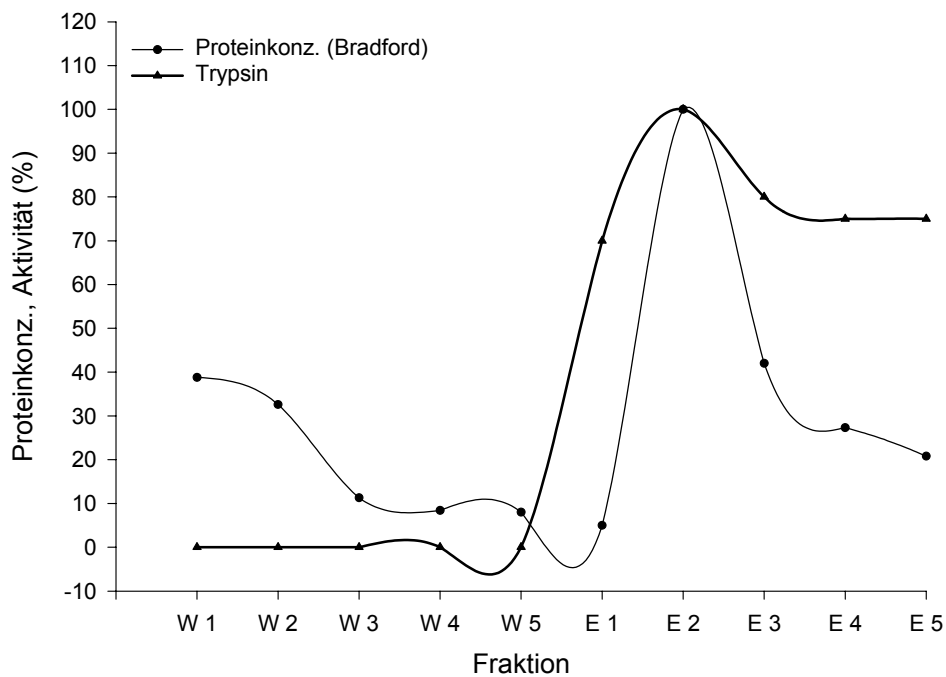
*Crangon crangon**Crangon allmani*

Abb. 30: Konzentrationsprofil des Gesamtproteins und Aktivitätsprofil der Serinproteinase Trypsin von *C. crangon* und *C. allmani* nach affinitätschromatographischer Auftrennung von Mitteldarmdrüsenextrakten mit maximal gemessener spezifischer Trypsin-Aktivität. Die Isolierung erfolgte über eine Benzamidin-Affinitätssäule. Die Werte sind in Relation zu den jeweiligen Maximalwerten angegeben. W = Waschfraktion, E = Eluierungsfraktion.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die weiterführende Charakterisierung einzelner Proteinaseen wurden spezielle Fraktionen nach der unter (3.2.1.3) beschriebenen chromatographischen Auftrennung von Rohextrakten mit geringen und hohen spezifischen Trypsin-Aktivitäten ausgesucht und für die gelelektrophoretische Analyse verwendet. Desweiteren wurden ausgewählte Fraktionen nach der affinitätschromatographischen Auftrennung der Extrakte mit maximaler Trypsin-Aktivität (s. 3.2.2) für die Gelelektrophorese eingesetzt.

#### 3.2.3.1 Identifikation einzelner Proteinaseen

Die gelelektrophoretische Auftrennung einzelner Proteinaseen in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie erfolgte zunächst in den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani* mit einer gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  (0,36 und 0,45). Aus den erstellten Aktivitätsprofilen (s. 3.2.1.3) wurden einzelne Fraktionen ausgewählt und für die SDS-PAGE eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine und der Nachweis der Proteinaseen erfolgte über eine SDS-PAGE bzw. eine Substrat-SDS-PAGE wie beschrieben (s. 2.4.3).

Bei *C. crangon* wurden die Fraktionen mit der höchsten Gesamtproteinase-Aktivität verwendet (P1 = Fraktion 34) (s. Abb. 31).

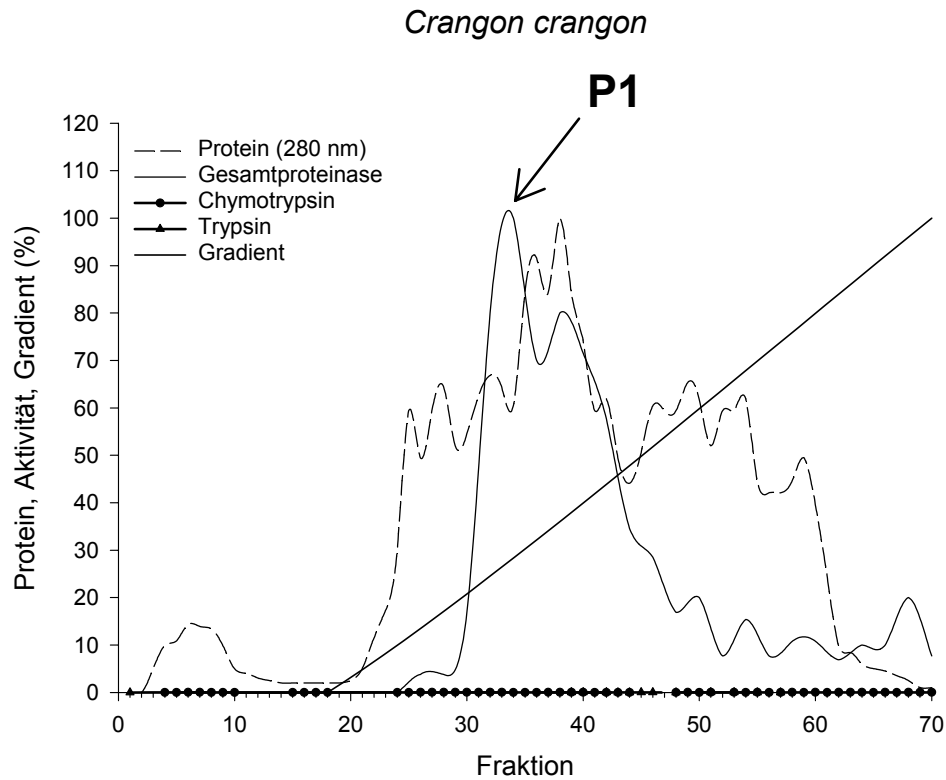


Abb. 31: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Der Pfeil kennzeichnet das Aktivitätsmaximum des Gesamtproteinaseprofils.

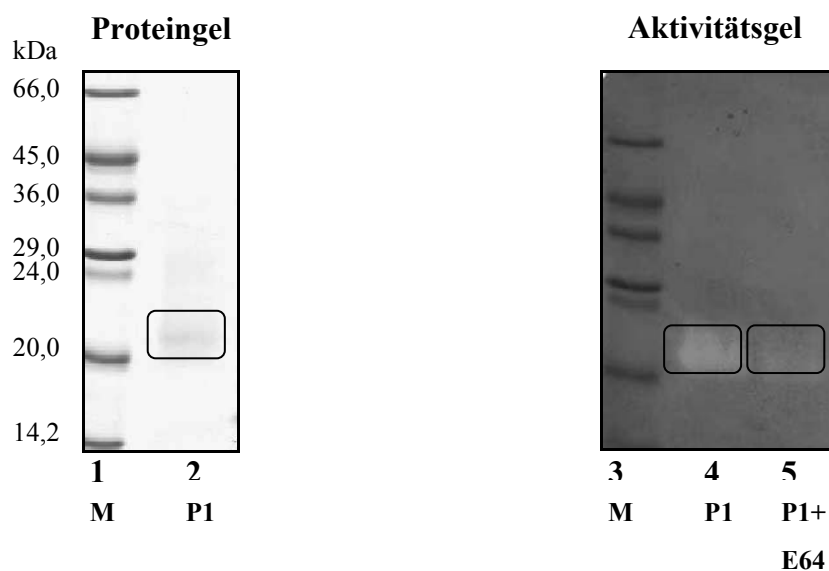


Abb. 32: Protein- (links) und Aktivitätsgel (rechts) nach SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen chromatographisch aufgetrennter Rohextrakte von *C. crangon* mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, P1; B3, M; B4, P1; B5, P1 + E64. Markierungen (s. Erklärung im Text).

Fraktion P1 zeigte auf dem Aktivitätsgel eine deutliche proteolytisch aktive Zone im Bereich zwischen 21 und 23 kDa (Bahn 4) (s. Abb. 32↑). Entsprechend dazu konnte auf dem Proteingel eine klare Bande bei 21 kDa (Bahn.2) bestimmt werden. Die Inkubation der Probe P1 mit dem Cyteinproteinaseinhibitor E 64 führte zu einer deutlichen Abschwächung der Aktivitätsbande (Bahn 5).

Bei *C. allmani* wurde die Fraktion 36 (P1) mit der maximalen Proteinaseaktivität für die Gelelektrophorese verwendet (s. Abb. 33).

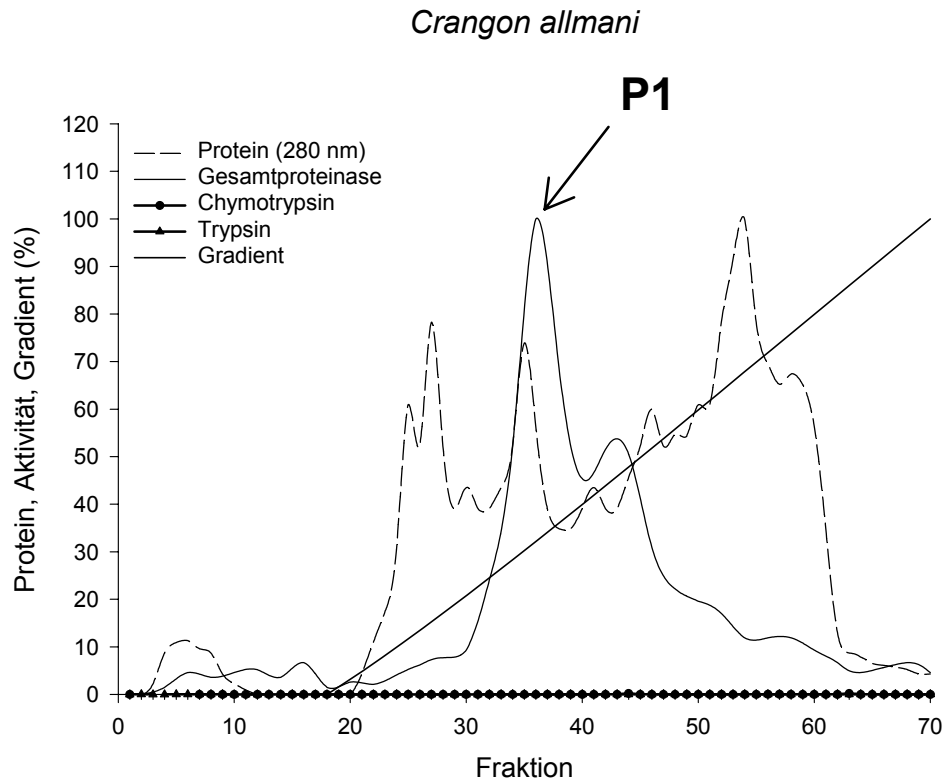


Abb. 33: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin von *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Der Pfeil kennzeichnet das Aktivitätsmaximum des Gesamtproteinaseprofils.

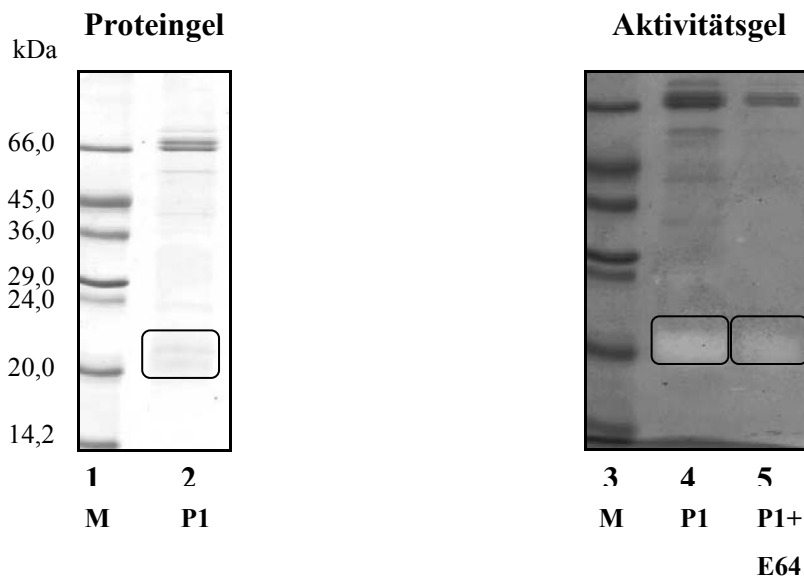


Abb. 34: Protein- (links) und Aktivitätsgel (rechts) nach SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen chromatographisch aufgetrennter Rohextrakte von *C. allmani* mit einer spez. Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{frw}}^{-1})$ . Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, P1; B3, M; B4, P1; B5, P1 + E64. Markierungen (s. Erklärung im Text).

Auch bei *C. allmani* zeigte sich für Fraktion P1 eine Aktivitätsbande im Bereich um 21 kDa, die durch den Einfluss von E 64 deutlich an Intensität verlor (Bahn 4 und 5) (s. Abb. 34↑). Im Größenbereich von 21 kDa zeigte sich auf dem Proteingel entsprechend die dazugehörige Proteinbande.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden nun einzelne Fraktionen der chromatographisch aufgetrennten Extrakte von *C. crangon* und *C. allmani* mit einer gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität über 2,0 ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ) (8,16 und 3,42) eingesetzt (s. 3.2.1.3). Bei *C. crangon* wurden die Fraktionen mit maximaler Trypsin-, Chymotrypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität für die SDS-PAGE verwendet (T = Fraktion 36, CT = Fraktion 27, P = Fraktion 33) (s. Abb. 35).

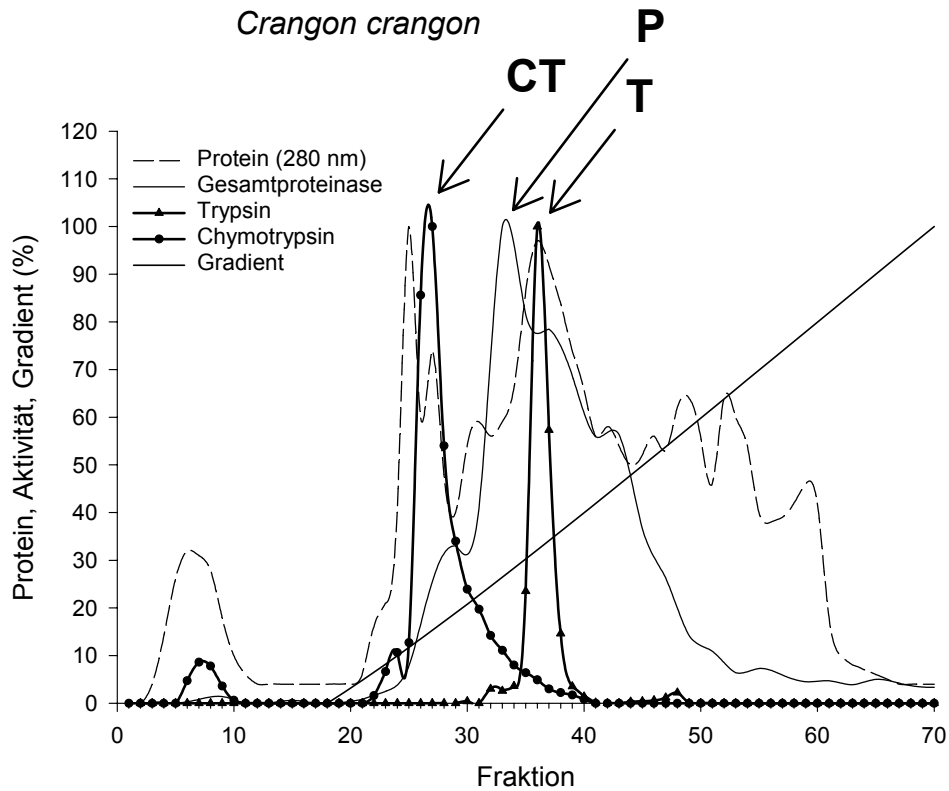


Abb. 35: Elutionsprofil der Gesamtproteinase und Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin von *C. crangon* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität über  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Pfeile kennzeichnen die Aktivitätsmaxima.

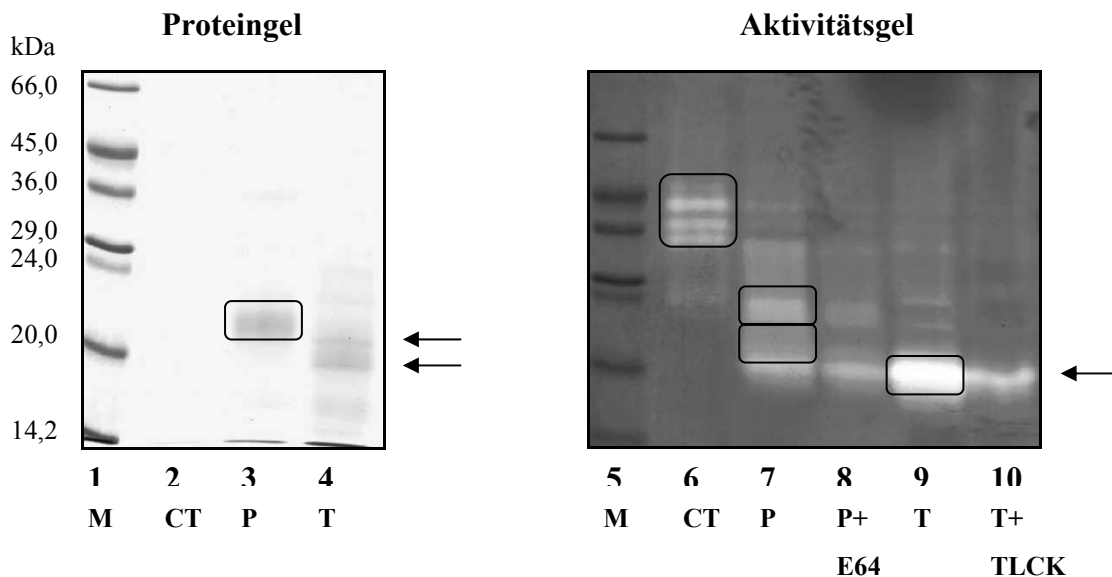


Abb. 36: Protein- (links) und Aktivitätsgel (rechts) nach SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen chromatographisch aufgetrennter Rohextrakte von *C. crangon* mit einer spez. Trypsin-Aktivität über  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, CT; B3, P; B4, T; B5, MGM; B6, CT; B7, P; B8, P + E64; B9, T; B10, T + TLCK. Markierungen und Pfeile (s. Erklärung im Text).



Die Fraktion CT zeigte drei deutliche Aktivitätsbanden von 43, 38 und 35 kDa sowie eine schwächere Bande von 48 kDa (Bahn 6), die sich jedoch auf dem Proteingel nicht identifizieren ließen (Bahn 2) (s. Abb. 36↑). Fraktion P zeigte zwei klar zu erkennende Aktivitätszonen (Bahn 7). Wie schon bei den dargestellten Proteinasebanden der Tiere mit geringer Trypsin-Aktivität zeigte sich auch hier bei 21 kDa eine einzelne recht verschleierte Aktivitätszone, die jedoch auf dem Proteingel einer deutlich erkennbaren Bande entsprach (Bahn 3). Eine weitere Aktivitätszone zeigte sich durch zwei dicht beieinander liegende Aktivitätsbanden bei 23,5 und 24 kDa. Diesen Banden konnte auf dem Proteingel keinen entsprechenden Proteinbanden zugeordnet werden. Durch den Inhibitor E 64 wurden diese Banden deutlich abgeschwächt, während die Aktivitätszone um 21 kDa fast vollständig verschwand (Bahn 8). Die Fraktion der maximalen Trypsin-Aktivität T zeigte eine sehr starke Aktivitätsbande bei 20 kDa (Bahn 9), die sich, wie das Proteingel zeigte, aus mindestens zwei Proteinbanden, einer schwächeren von 20,5 und einer stärkeren von 20 kDa zusammensetzte (Bahn 4). Der Nachweis, daß es sich bei diesen Proteinase um Trypsin handelte, erfolgte durch den spezifischen Trypsininhibitor TLCK (Bahn 10), unter dessen Einfluss die Aktivitätszone stark an Intensität abnahm. Nur die zweite etwas prominentere Bande bei 20 kDa zeigte eine Restaktivität. Die Aktivitätsbanden bei 20 kDa in Bahn 8 und 7 entstanden ebenfalls durch eben diese Proteinase, die offensichtlich schon in Fraktion 33 nachzuweisen war und unter dem Einfluss von E 64 keinen Aktivitätsverlust aufwies.

Für *C. allmani* wurden die folgenden Fraktionen der maximalen Enzymaktivitäten für die SDS-PAGE eingesetzt (T + P = Fraktion 36, CT1 = Fraktion 24, CT2 = Fraktion 34) (s. Abb. 37).

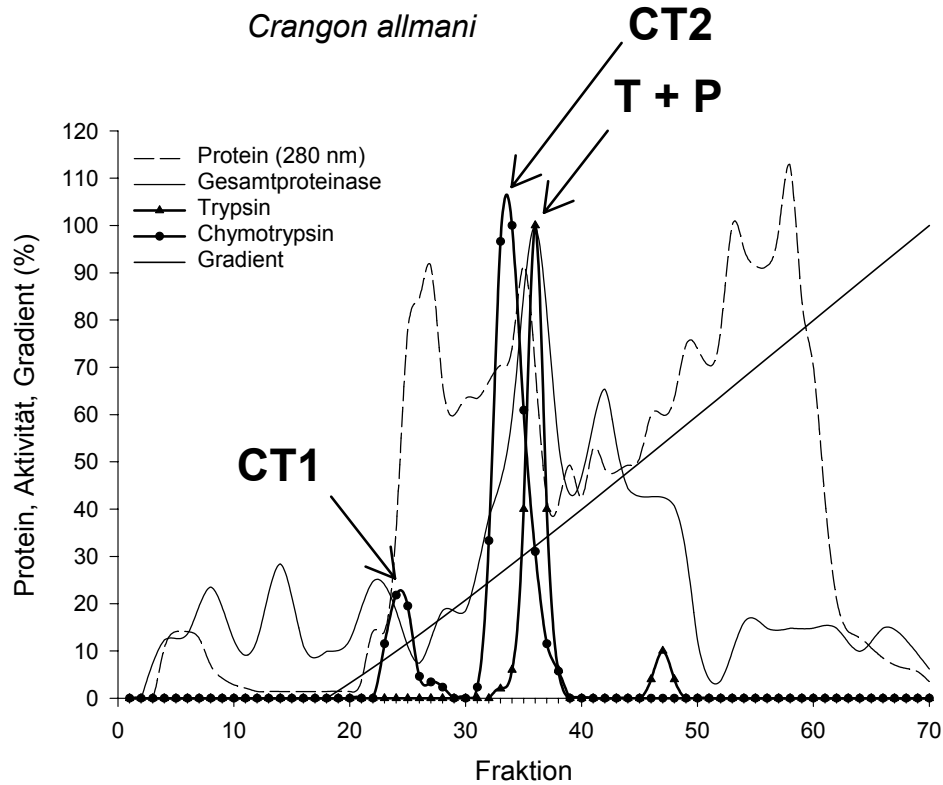


Abb. 37: Elutionsprofil der Gesamtproteinasen und Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin von *C. allmani* aus einem Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spez. Trypsin-Aktivität über  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Die Pfeile kennzeichnen die Aktivitätsmaxima.

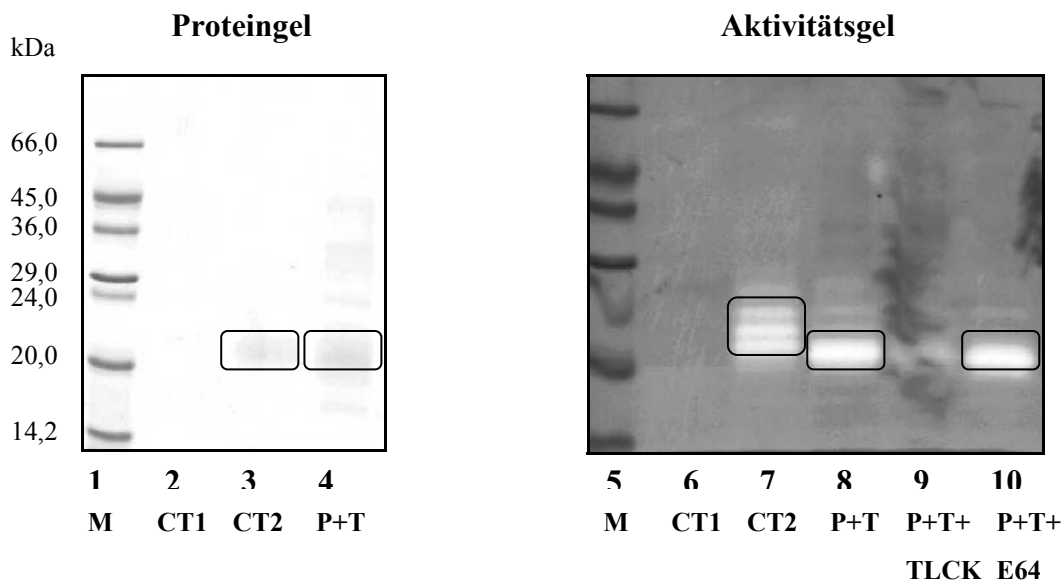


Abb. 38: Protein- (links) und Aktivitätsgel (rechts) nach SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen chromatographisch aufgetrennter Rohextrakte von *C. allmani* mit einer spez. Trypsin-Aktivität über  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, CT1; B3, CT2; B4, P + T; B5, MGM; B6, CT1; B7, CT2; B8, P + T; B9, P + T + TLCK; B10, P + T + E64. Markierungen (s. Erklärung im Text).

Die Fraktion CT1 zeigte keine erkennbaren Aktivitätsbanden (Bahn 6) und auch auf dem Proteingel waren keine entsprechenden Banden zu detektieren (Bahn 2) (s. Abb. 38↑). Die Fraktion CT2 mit maximaler Aktivität der Serinproteinase Chymotrypsin zeigte drei Aktivitätsbanden von 23, 22 und 20 kDa (Bahn 7), wobei auf dem Proteingel nur im Bereich um 20 kDa eine Proteinbande auftrat (Bahn 3). Die Fraktion mit der maximalen Trypsin-Aktivität, die gleichzeitig auch die maximale Gesamtproteinase-Aktivität aufwies (T + P), zeigte auf dem Aktivitätsgel eine deutliche Bande um 20 kDa, die eine kräftige Aktivitätszone bildete (Bahn 8) und bereits in Bahn 7 erschien. Auf dem Proteingel trat eine entsprechende Proteinbande auf (Bahn 4). Mit dem Trypsininhibitor TLCK zeigte die Aktivitätszone im Bereich um 20 kDa eine deutliche Abschwächung (Bahn 9). Der Inhibitor E 64 führte dagegen zu keiner Abschwächung der Aktivitätszone im Bereich um 20 kDa (Bahn 10).

### 3.2.3.2 Identifikation trypsinähnlicher Serinproteinasen

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der durch die Affinitätschromatographie isolierten trypsinähnlichen Serinproteinasen von *C. crangon* und *C. allmani* wurde die erste Waschfraktion (W1) sowie die zweite Eluierungsfraction (E2) verwendet. Zusätzlich wurde jeweils der Gesamtextrakt (G) für die SDS-PAGE eingesetzt (s. Abb. 39). Bei *C. crangon* erschienen im Gesamtextrakt auf dem Aktivitätsgel nur zwei deutliche Aktivitätszonen (Bahn 6) im Bereich von 21 und 20 kDa. Das Proteingel gab keine Hinweise darauf, aus wie vielen Banden sich diese Zone zusammensetzte. In der Fraktion W1 (Bahn 7) erschienen die beiden Zonen deutlich geschwächt, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Proteinase an das Säulenmaterial gebunden haben. In der Fraktion E2 (Bahn 8) deuteten sich die Aktivitätszonen aufgrund zu hoher Proteinkonzentration nur an. Im Bereich zwischen 23 und 20 kDa zeigten sich auf dem Proteingel in diesem Bereich drei scharfe Banden (Bahn 4). Insgesamt wurden in der Fraktion E2 auf dem Aktivitätsgel zahlreiche Proteinbanden sichtbar, die jedoch keiner Aktivitätsbande zugeordnet werden konnten. Bei *C. allmani* ließen sich im Gesamtextrakt insgesamt sechs Aktivitätsbanden eindeutig voneinander unterscheiden (Bahn 6). Im Bereich zwischen 48 und 40 kDa traten zwei Aktivitätsbanden von 48, 43 kDa auf, die sich deutlich in der Fraktion E2 (Bahn 8) wieder finden ließen. Im Gesamtextrakt zeigten sich weiterhin drei unterschiedlich starke Aktivitätsbanden von 23, 21, und 20 kDa. Eine weitere Bande zeigte sich bei 18 kDa. Von diesen sechs Banden konnten fünf in der Fraktion E2 erneut klar wiedergefunden werden (Bahn 8). Neben den zwei Banden zwischen 48 und 40 kDa erschienen die Banden bei 23 und 20 kDa, die sich auch auf dem Proteingel erkennen ließen (Bahn 4) sowie die Bande bei 18 kDa. Die Bande bei 21 kDa trat jedoch nicht mehr deutlich in Erscheinung. Die stärkste Bande bei 20 kDa war auch als einzige Bande in der Fraktion W1 (Bahn 7) und in der Fraktion E2 vertreten. Scheinbar hat die Proteinase nicht vollständig an das Säulenmaterial gebunden.

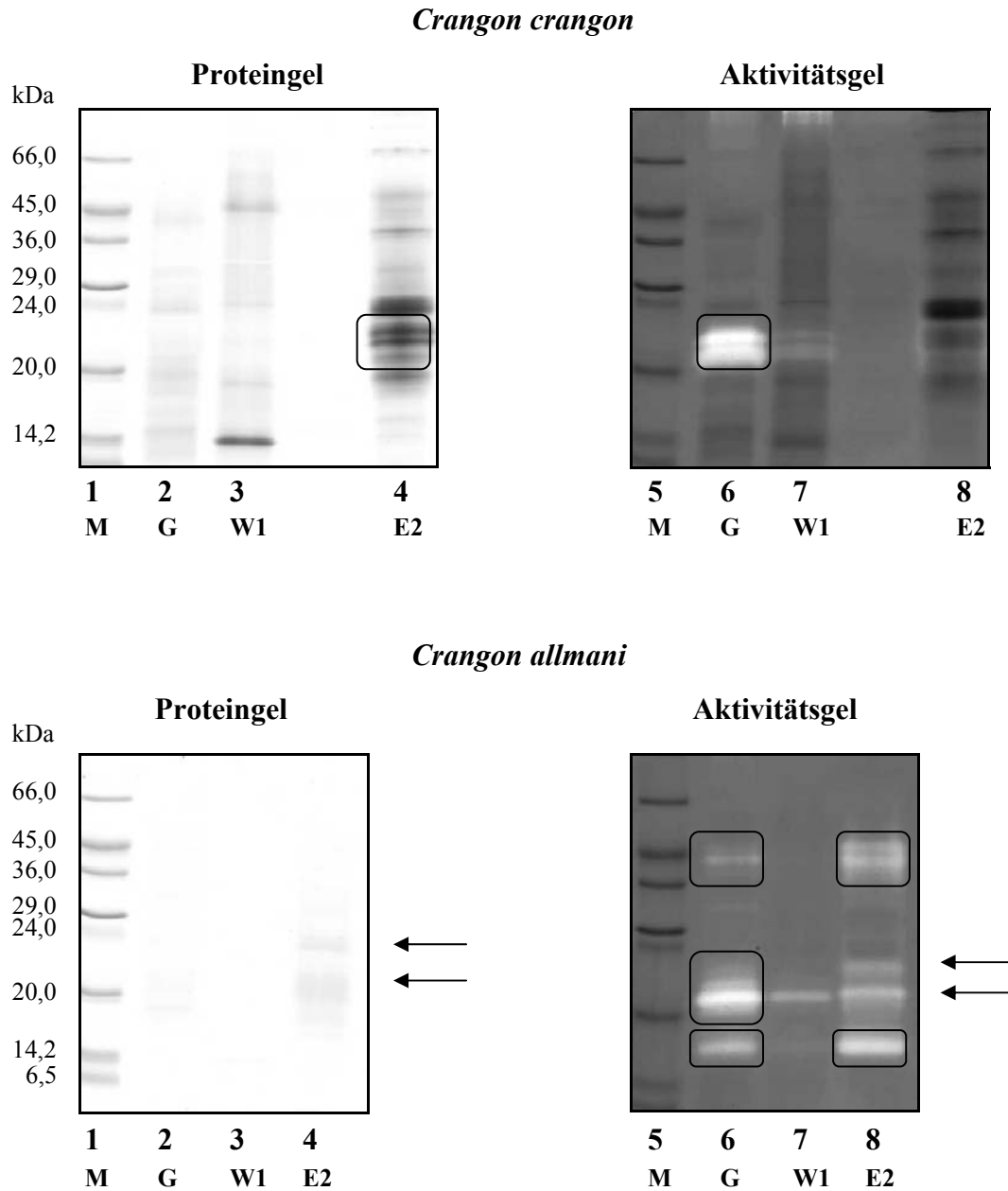


Abb. 39: Protein- (links) und Aktivitätsgel (rechts) nach SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen affinitätschromatographisch aufgetrennter Rohextrakte von *C. crangon* und *C. allmani* mit maximal gemessener Trypsin-Aktivität. Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, G; B3, W1; B4, E2; B5, M; B6, G; B7, W1; B8, E2. Markierungen und Pfeile (s. Erklärung im Text).

Insgesamt wurden im Rahmen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in diesem Versuchsabschnitt bei *C. crangon* und *C. allmani* folgende Proteinase gefunden:

Tabelle 17: Molekulargewichte der Serin- und Cysteinproteinase, die bei *C. crangon* und *C. allmani* gefunden werden konnten. In Klammern sind die Inhibitoren angegeben, mit denen der Nachweis erfolgte. Die Großbuchstaben kennzeichnen die Fraktionen der Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie, in denen der Nachweis erfolgte.

Molekulargewicht kDa	Proteinaseklasse	<i>C. crangon</i>	<i>C. allmani</i>
48,0	Serin (Benzamidin)	CT	E2
43,0	Serin (Benzamidin)	CT	A
38,0	Serin (?)	CT	
35,0	Serin (?)	CT	
24,0	Cystein (E 64)	P	
23,5	Cystein (E 64)	P	
23,0	Serin (Benzamidin)		E2, CT2
22,0	Serin (?)		CT2
21,0	Cystein (E 64)	P	P
20,0	Serin (TLCK)	T	T+P, E2
18,0	Serin (Benzamidin)		E2

### 3.3 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum

Im Rahmen dieses Versuchsabschnittes wurde der Einfluss des Nahrungsangebotes (karnivor, herbivor, Hunger) auf die Expression bzw. auf die Zusammensetzung des proteolytischen Enzymspektrums bei adulten Tieren von *C. crangon* untersucht (s. 2.5). Ziel war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Nahrungsangebot und der Intensität der Trypsin-Aktivität aufzuzeigen. Nach Ablauf der Ernährungsversuche wurden an den Mitteldarmdrüsenrohextrakten der Tiere die Aktivität der Gesamtproteinase sowie die Trypsin-Aktivität bestimmt. Desweiteren wurde das Protein- bzw. Aktivitätsspektrum einzelner Rohextrakte durch eine SDS-PAGE dargestellt.

#### 3.3.1 Gesamtproteinase

##### 3.3.1.1 Spezifische Aktivität

Zwischen den vier unterschiedlichen Versuchsgruppen (Kontrolle, karnivor, herbivor, Hunger) traten in der gewichtsspezifischen Aktivität der Gesamtproteinase keine signifikanten Unterschiede auf ( $p > 0,05$ ) (s. Abb. 40). Die Aktivitätswerte lagen in einem Bereich zwischen 0,3 und 0,5 ( $\text{dE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ). Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten eine spezifische Aktivität von 0,35. Im Vergleich dazu hatten die Tiere mit karnivorer Ernährung sowie die Tiere, die über den Versuchszeitraum hungerten, mit 0,47 bzw. 0,49 eine erhöhte Aktivität. Die geringste Aktivität der Gesamtproteinase lag mit 0,3 bei der herbivoren Versuchsgruppe.

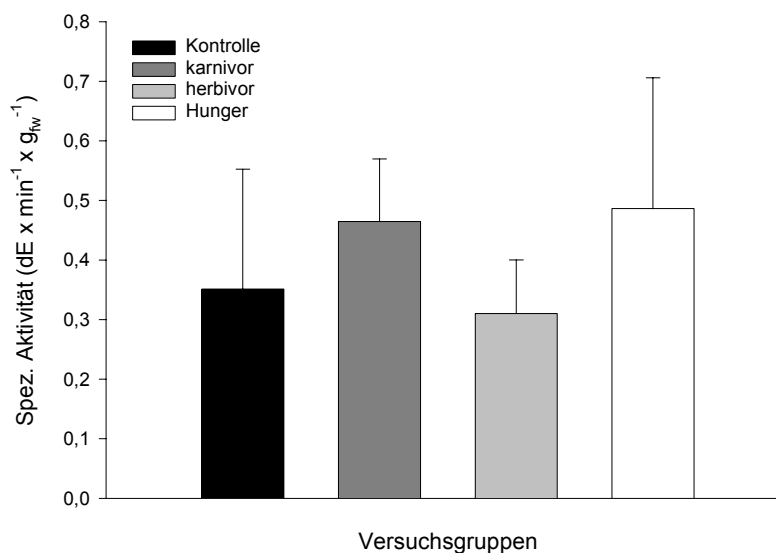


Abb. 40: Gewichtsspezifische Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* nach unterschiedlichem Nahrungsangebot über 14 Tage. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Varianzanalyse,  $n = 10$  (Kontrolle und karnivor),  $n = 6$  (herbivor),  $n = 8$  (Hunger)).

### 3.3.1.2 Anteil der Mitteldarmdrüse am Gesamtgewicht

Nachdem eine Korrelation zwischen dem Anteil der Mitteldarmdrüse (MD) am Gesamtgewicht und der spezifischen Aktivität der Gesamtproteinase bei *C. crangon* und *C. allmani* festgestellt werden konnte (s. 3.1.3), wurde auch im Rahmen dieses Versuchsabschnittes bei den vier unterschiedlichen Versuchsgruppen der prozentuale Anteil der Mitteldarmdrüse untersucht (s. Abb. 41). Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Gewichtsanteil von 5,3 % wiesen die übrigen Versuchsgruppen erniedrigte sowie erhöhte Gewichtsanteile der Mitteldarmdrüse auf, die jedoch statistisch nicht signifikant waren. Die Hungergruppe hatte dabei mit 4 % den geringsten Anteil aller Versuchsgruppen. Die Tiere mit karnivorer Ernährung zeigten im Mittel mit 6 % den größten Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse. Die herbivore Versuchsgruppe wies mit 4,7 % Gewichtsanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe einen geringfügig erniedrigten Wert auf.

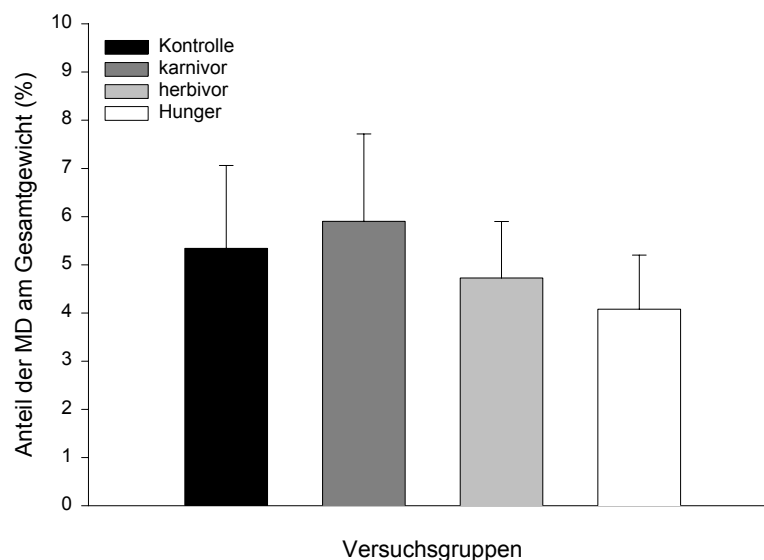


Abb. 41: Prozentualer Anteil der MD am Gesamtgewicht von *C. crangon* nach unterschiedlichem Nahrungsangebot über 14 Tage. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Varianzanalyse,  $n = 10$  (Kontrolle und karnivor),  $n = 6$  (herbivor),  $n = 8$  (Hunger)).

### 3.3.2 Trypsin

#### 3.3.2.1 Spezifische Aktivität

Zwischen den vier unterschiedlichen Versuchsgruppen traten keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Trypsin-Aktivität auf ( $p > 0,05$ ) (s. Abb. 42). Die Mediane der Aktivitätswerte aller Versuchsgruppen lagen in einem Bereich zwischen 0,7 (Kontrolle) und 0,4 (Hunger) ( $U \cdot g_{fw}^{-1}$ ) dicht beieinander. Die karnivore Gruppe besaß die geringste Streuung der Aktivitätswerte und im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell niedrigere Trypsin-Aktivität. Ähnlich zeigten sich die Verhältnisse bei der Hungergruppe mit einem zwar noch niedrigeren Median, jedoch einer durch einen Ausreißer bedingten höheren Streuung. Die Kontrollgruppe und die herbivore Gruppe zeigten tendenziell höhere Aktivitätswerte.

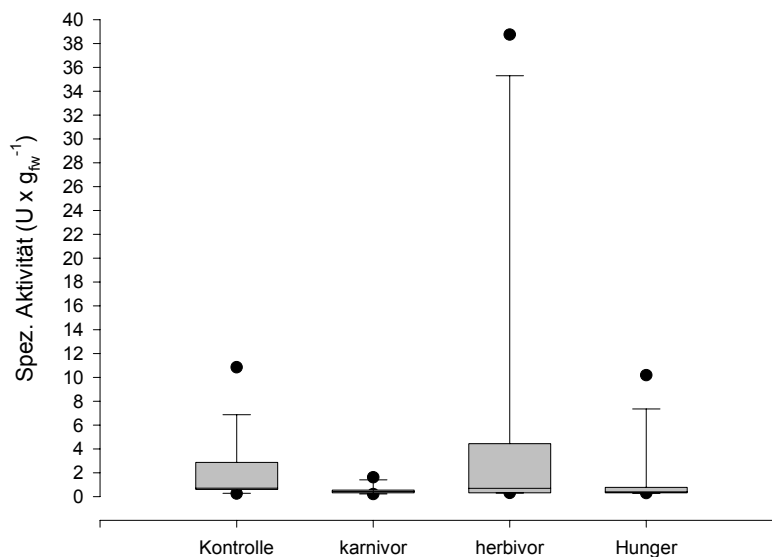


Abb. 42: Gewichtsspezifische Trypsin-Aktivität von *C. crangon* nach unterschiedlichem Nahrungsangebot über 14 Tage. (Median, 5 %-, 25 %-, 75 %- und 95 % Perzentil, Ausreißer, Varianzanalyse nach Rängen,  $n = 10$  (Kontrolle und karnivor),  $n = 6$  (herbivor),  $n = 8$  (Hunger)).



### 3.3.2.2 Häufigkeitsverteilung

Die ermittelten spezifischen Trypsin-Aktivitäten aller Versuchstiere wurden für jede Ernährungsbedingung zur Untersuchung der Häufigkeitsverteilung erneut in drei Gruppen mit unterschiedlich hoher Trypsin-Aktivität eingeteilt ( $< 2,0$ ,  $2,0 - 6,0$ ,  $> 6,0$  ( $U \cdot g_{fw}^{-1}$ )). Die natürlich auftretende Häufigkeitsverteilung spiegelte dabei die Kontrollgruppe wieder (s. Abb. 43). Hier zeigten sieben von 10 Tieren eine spezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0$ , 2 Tiere zwischen  $2,0$  und  $6,0$ , und nur ein Tier lag mit der Aktivität über  $6,0$ . Der prozentuale Anteil der Tiere mit einer Aktivität unter  $2,0$  lag mit  $70\%$  damit im gleichen Bereich, wie er schon für die Häufigkeitsverteilung unter (3.1.2.3) mit  $67\%$  gezeigt wurde.

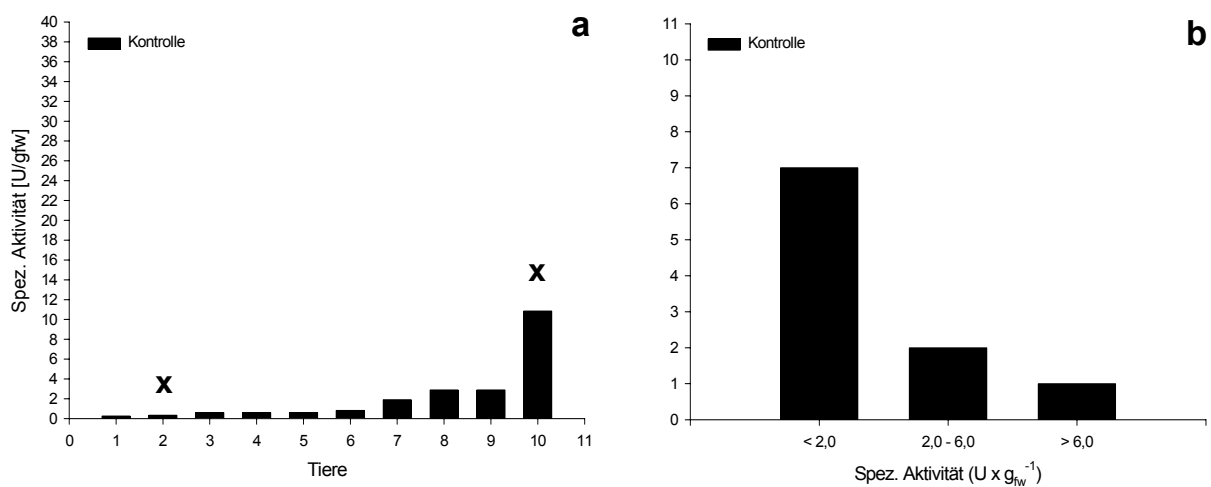


Abb. 43: Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten bei *C. crangon* als Kontrollgruppe. Einzeldarstellung (a) und Histogramm (b),  $n = 10$ . Die Kreuze kennzeichnen die für die SDS-PAGE verwendeten Extrakte.

Bei karnivorer Ernährung zeigten alle 10 Versuchstiere eine Trypsin-Aktivität unter  $2,0$  ( $U \cdot g_{fw}^{-1}$ ) (s. Abb. 44). Unter herbivoren Ernährungsbedingungen lagen vier von sechs Tieren und damit, ähnlich wie bei der Kontrollgruppe,  $67\%$  aller Tiere mit der Aktivität unter  $2,0$ . Ein Tier zeigte eine Aktivität zwischen  $2,0$  und  $6,0$ , während ein weiteres mit  $38$  ( $U \cdot g_{fw}^{-1}$ ) die unter allen Versuchstieren maximale Trypsin-Aktivität zeigte. Von den Versuchstieren der Hungergruppe zeigten über  $87\%$ , d.h. sieben von acht Tieren, eine geringe Aktivität unter  $2,0$ . Ein Tier ragte mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität von  $10$  ( $U \cdot g_{fw}^{-1}$ ) aus dieser Verteilung heraus.

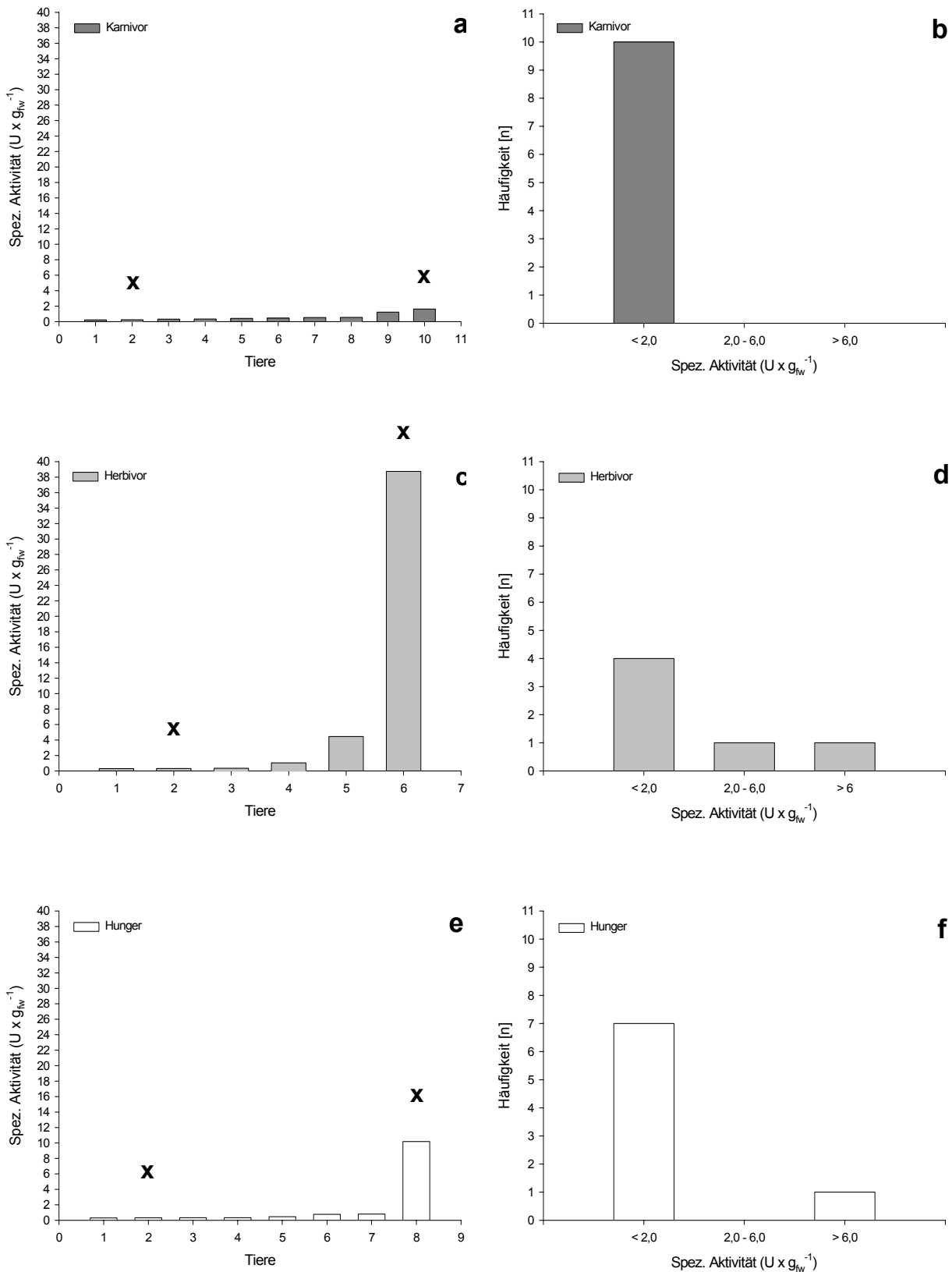


Abb. 44: Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten bei *C. crangon*. Karnivor (a, b), herbivor (c, d), Hunger (e, f). Einzeldarstellung (a, c, e) und Histogramm (b, d, f).  $n = 10$  (Kontrolle und karnivor),  $n = 6$  (herbivor),  $n = 8$  Hunger. Die Kreuze kennzeichnen die für die SDS-PAGE verwendeten Extrakte.

### 3.3.2.3 Trypsin /Gesamtproteinase Beziehung

Für eine Darstellung der Beziehung zwischen Trypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität der unterschiedlichen Ernährungsgruppen wurden die gewichtsspezifischen Aktivitäten aller Versuchstiere gegeneinander aufgetragen (s. Abb. 45). Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe hatten die Tiere mit karnivorer Ernährung generell eine höhere Gesamtproteinase-Aktivität, die jedoch nicht mit einer Zunahme der Trypsin-Aktivität korrelierte. Die gleiche Tendenz zeigte sich bei den Tieren der Hungergruppe. Die Tiere mit herbivorer Ernährung zeigten generell eher niedrige Gesamtproteinase-Aktivitäten, die in keinem Fall einen Wert von 0,45 überschritten. Auch für diese Tiere konnte jedoch keine korrelierende Veränderung der Trypsin-Aktivitäten festgestellt werden.

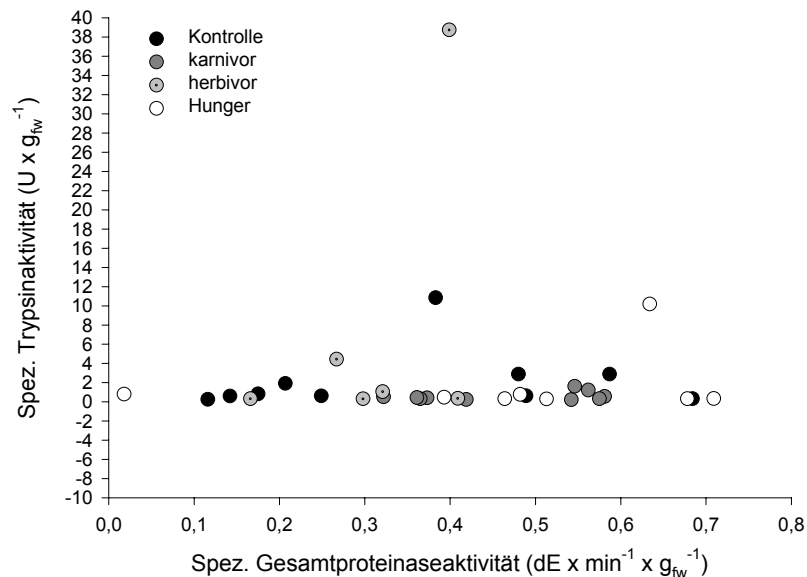


Abb. 45: Beziehung von spezifischer Gesamtproteinase- und Trypsin-Aktivität bei *C. crangon* nach unterschiedlichem Nahrungsangebot über 14 Tage. n = 10 (Kontrolle und karnivor), n = 6 (herbivor), n = 8 Hunger.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Protein- bzw. Enzymspektrum ausgewählter Rohextrakte wurde anschließend durch eine SDS-PAGE dargestellt. Hierfür wurde exemplarisch aus jeder Versuchsgruppe ein Mitteldarmdrüsenextrakt mit einer spezifischen Trypsin-Aktivität unter 2,0 ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ) sowie der Extrakt mit maximaler Trypsin-Aktivität ausgewählt (s. 3.3.2.2) und nach folgendem Schema auf das Gel aufgebracht:

Tabelle 18: Gelbeladungsschema für die SDS-PAGE einzelner Gesamtextrakte der vier Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Spez. Trypsin-Aktivität des Extraktes ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ )	Gelbahn
KONTROLLE (K2)	10,84	2
KONTROLLE (K1)	0,32	3
KARNIVOR (KA1)	0,23	4
KARNIVOR (KA2)	1,61	5
HERBIVOR (HE1)	0,32	6
HERBIVOR (HE2)	38,73	7
HUNGER (HU1)	0,32	8
HUNGER (HU2)	10,17	9

Auf dem Aktivitätsgel bildeten nur die Extrakte K2 (Bahn 2) und HE2 (Bahn 7) deutliche Aktivitätszonen aus, die sich trotz unterschiedlicher Intensitäten der Banden in der Anordnung stark ähnelten (s. Abb. 46). Sowohl K2 als auch HE2 zeigten drei klar getrennte Aktivitätsbanden bei 20, 21 und 23 kDa, von denen die 20 kDa Bande die stärkste Intensität aufwies. Insbesondere für K2 konnten die entsprechenden Proteinbanden auf dem Proteingel identifiziert werden. Hierbei wurde deutlich, daß die intensive Aktivitätsbande bei 20 kDa durch zwei Proteinbanden von 20 und 20,5 kDa hervorgerufen wurde. Bei 21 und 23 kDa erschien jeweils eine einzelne Proteinbande. Ein weiterer Bereich starker Proteinaseaktivität zeigte sich bei beiden Extrakten zwischen 25 und 36 kDa. Bei HE2 ließen sich recht deutlich vier einzelne Aktivitätsbanden gleicher Intensität von 25, 30, 32 und 35 kDa unterscheiden. K2 hatte im Bereich von 25 kDa die stärkste Aktivitätszone. Eine weitere einzelne Aktivitätsbande zeigten beide Extrakte bei 64 kDa. Unterhalb dieser Bande erschien in beiden Fällen ein weiterer Bereich mit Proteinaseaktivität, der zumindest im Falle von HE2 deutlich eine Auftrennung in drei einzelne Banden von 43, 48 und 55 kDa zuließ. Bei 80 kDa erschien ebenfalls in beiden Extrakten eine Aktivitätsbande, die insbesondere in HE2 intensiv ausgeprägt war. Die übrigen Extrakte zeigten trotz vorhandener Gesamtproteinase-Aktivität und im Fall von HU2 sogar vorhandener Trypsin-Aktivität über 2,0 keine deutlichen Aktivitätszonen. Mit sehr schwacher Aktivität deuteten sich im Bereich von 20, 21 und 23 kDa die Banden an, die in stärkerer Intensität schon in K2 und HE2 aufgetreten waren.

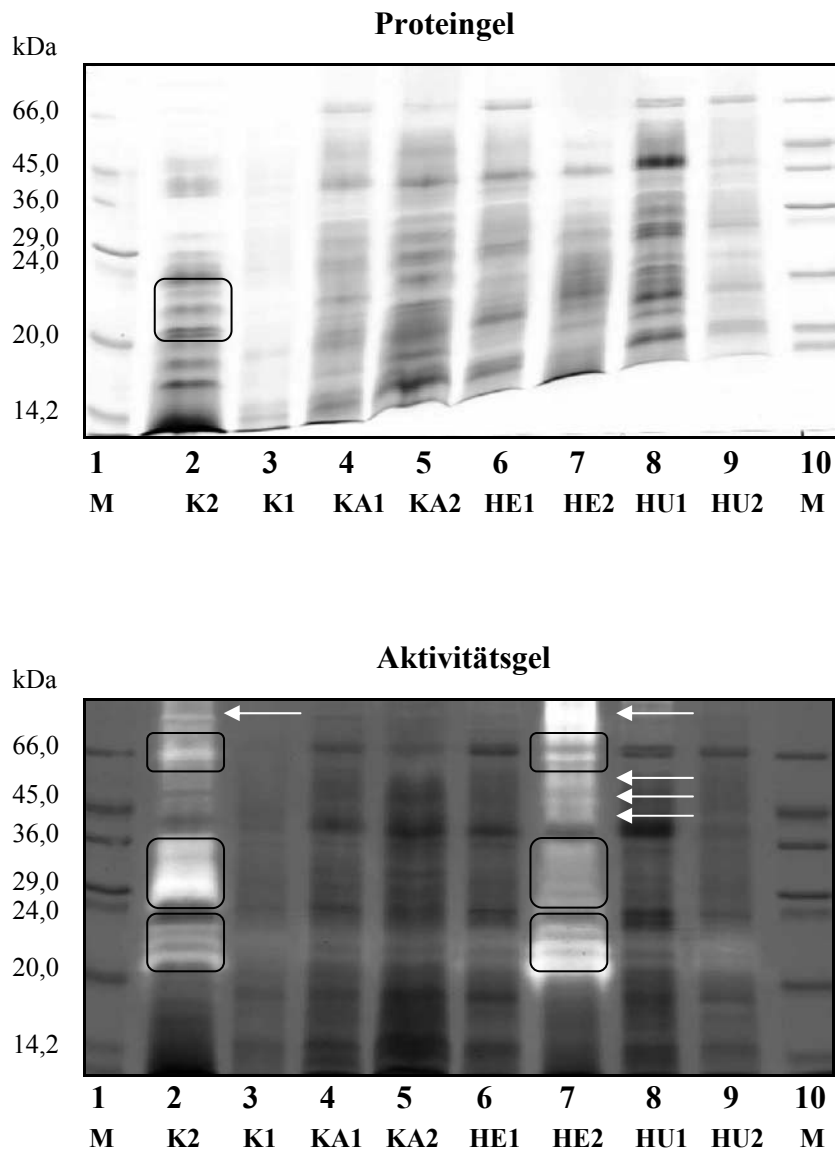


Abb. 46: Protein- (oben) und Aktivitätsgel (unten) nach SDS-PAGE ausgewählter Mitteldarmdrüsenextrakte von *C. crangon* nach unterschiedlichem Nahrungsangebot über 14 Tage. Bahn (B) 1, Molekulargewichtsmarker (M); B2, K2; B3, K1; B4, KA1; B5, KA2; B6, HE1; B7, HE2; B8, HU1; B9, HU2; B10, M. Markierungen und Pfeile (Erklärung s. Text).



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden an Mitteldarmdrüsenextrakten der dekapoden Garnelen *C. crangon* und *C. allmani* quantitative und qualitative Untersuchungen proteolytischer Verdauungsenzyme durchgeführt. Ziel der Arbeit war die Zusammensetzung, Eigenschaften und das katalytische Potential der Endopeptidasen erstmalig näher zu beschreiben und Hinweise auf mögliche Zusammenhänge mit der Lebens- bzw. Ernährungsweise der Nordseegarnelen zu finden.

### 4.1 Quantifizierung der Gesamtproteinase-Aktivität

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen des Enzym-Assays wurde zunächst der Einfluss verschiedener Reaktionspuffer, von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität untersucht.

Bei *C. crangon* gab es zwischen dem Imidazol-, Tris-HCl- und Phosphatpuffer keine signifikanten Aktivitätsunterschiede der Gesamtproteinase. Der Citrat-Phosphatpuffer führte jedoch zu einer erhöhten Aktivität, die sich signifikant von den anderen Puffern unterschied. Zwischen dem Phosphatpuffer, bei dem die niedrigste Aktivität zu verzeichnen war, und dem Citrat-Phosphatpuffer lag hierbei jedoch nur ein Aktivitätsunterschied von 16 %. Bei *C. allmani* war die Aktivität bei Verwendung des Citrat-Phosphat- und des Phosphatpuffers gegenüber dem Imidazol- und dem Tris-HCl-Puffer signifikant erhöht. Diese zeigten wie bei *C. crangon* untereinander keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Auch in diesem Fall lag zwischen dem Citrat-Phosphatpuffer, der zur höchsten Aktivität führte, und dem Puffer, der die geringste Aktivität zur Folge hatte (Imidazol), nur ein Unterschied von 23 %. Entsprechend scheinen die verwendeten Reaktionspuffer sich bei beiden Arten in ihrem Einfluss auf die Aktivität der Gesamtproteinase nur gering zu unterscheiden. Für die weiteren Routine-messungen konnten also prinzipiell alle getesteten Puffer verwendet werden.

Vor der Wahl eines geeigneten Reaktionspuffers wurde zunächst jedoch der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Aktivität der Gesamtproteinase untersucht. Sowohl bei *C. crangon*, als auch bei *C. allmani* führte  $\text{Ca}^{2+}$  beim Tris-HCl- und Imidazolpuffer zu einer Erhöhung der Gesamtproteinase-Aktivität. Die eingesetzten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen (10 mM und 20 mM) führten jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden. Bei den beiden Phosphatpuffern war die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  nicht möglich, da aufgrund des Phosphatgehaltes der Puffer Calcium-Phosphatpräzipitate ausfallen würden. Der stabilisierende Einfluss von bivalenten Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  auf proteolytische Verdauungsenzyme und besonders Serin-Proteinasen bei Säugetieren und Fischen ist bereits beschrieben worden (Ásgeirsson & Bjarnason 1991, Stryer 1996). Der Einfluss solcher Metallionen auf proteolytische Verdauungsenzyme bei Crustaceen wird dagegen in der Literatur ambivalent beschrieben. In einer Zusammenfassung zahlreicher Untersuchungsergebnisse über Proteinase bei verschiedenen Crustaceen von Dall und Moriarty (1983) wird ein aktivitätsfördernder Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf Enzyme bei Crustaceen bezweifelt.

So fanden zum Beispiel Eisen et al (1973) bei der Beschreibung trypsinähnlicher Proteinasen der Winkerkrabbe *Uca pugilator* heraus, daß die Enzyme für eine stabile Molekülstruktur kein  $\text{Ca}^{2+}$  benötigen. Im Gegensatz dazu wurde bei *P. vannamei* durch den Einsatz von Chelatoren eine Verringerung der Chymotrypsin-Aktivität nachgewiesen (Hernández-Cortés et al. 1997). Chelatoren bilden mit Hilfe von Metallionen komplexe zyklische Verbindungen, so daß die Metallionen in der Lösung gebunden werden und nicht mehr für andere Reaktionen zur Verfügung stehen. Die Autorin sieht darin eine Bestätigung für den aktivitätsfördernden Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf Chymotrypsine von Crustaceen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani* zeigten einerseits einen positiven Effekt auf die Aktivität der Proteinasen. Andererseits kam es bei den Messungen, bei denen kein  $\text{Ca}^{2+}$  eingesetzt wurde, zu keinem drastischen Aktivitätsverlust. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß keine Erkenntnisse darüber vorlagen, ob in den Rohextrakten eine natürliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vorlag. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß die Proteinasen durch  $\text{Ca}^{2+}$  in den Extrakten positiv beeinflusst wurden. Die Zugabe  $\text{Ca}^{2+}$  war somit nicht unbedingt erforderlich, führte aber zu einer leichten Erhöhung der Aktivität. Für alle folgenden Untersuchungen an Proteinasen der Nordseegarnelen wurden deshalb Reaktionspuffer mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration von 10 mM verwendet. Als Reaktionspuffer konnten dann entsprechend nur der Tris-HCl- bzw. der Imidazolpuffer eingesetzt werden (s.o.).

Schließlich wurde die pH-Abhängigkeit der Gesamtproteinase im Bereich von pH 5,0 – pH 8,0 untersucht.

Bei beiden Arten lag die maximale Aktivität der Gesamtproteinase für die verwendeten Puffer zwischen pH 5,0 und pH 6,0 und nahm zum neutralen und alkalischen Bereich hin kontinuierlich ab. Bei pH 8,0 sank die Aktivität auf unter 65 % der maximalen Aktivität. Generell liegen die pH-Optima der bei Crustaceen untersuchten Proteinasen in einem Bereich zwischen 5,0 und 9,0 (Garcia-Carreño 1992, Garcia-Carreño et al. 1994, Ceccaldi 1997). Trypsinähnliche Serinproteinasen zeigen dabei typischerweise ein pH-Optimum im neutralen bis schwach alkalischen Bereich zwischen 7,0 und 9,0. So hat zum Beispiel die Gesamtproteinase der Garnele *Pleoticus muelleri*, für die ein hoher Anteil trypsinähnlicher Serinproteinasen aufgezeigt wurde, ein pH-Optimum zwischen 7,5 und 8,0 (Gimenez et al. 2001). Für *P. vannamei* konnten die Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin als Hauptproteinasen nachgewiesen werden (Le Moullac 1997). Beide Proteinasen können nur durch Enzymmessungen im alkalischen Bereich erfasst werden. Cathepsinähnliche Cysteinproteinasen weisen dagegen pH-Optima in einem Bereich zwischen 4,0 und 7,0 auf. So konnte ebenfalls an *P. vannamei* eine Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteinase nachgewiesen werden, die ihre maximale katalytische Aktivität um pH 5,0 zeigte (Le Boulay et al. 1996). In einer Studie über die pH-Optima proteolytischer Verdauungsenzyme bei verschiedenen Crustaceen (Degkwitz 1957) wurde für *C. crangon* übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit ein pH-Optimum zwischen 5,5 und 6,0 festgestellt. Die Autorin schließt daraus auf fast ausschließlich catheptische



Enzyme und einen höchstens unbedeutenden Anteil an tryptischen Enzymen. Vor diesem Hintergrund deuten die ermittelten pH-Optima bei *C. crangon* und *C. allmani* zwischen 5,0 und 6,0 auf einen geringen Anteil von trypsinähnlichen Serinproteinasen hin. Der ermittelte pH-Bereich hingegen ist typisch für cathepsinähnliche Proteinase.

Zur Erfassung spezifischer Eigenschaften der Gesamtproteinase bei *C. crangon* und *C. allmani* wurde die Thermostabilität, die Langzeitstabilität sowie der Einfluss spezifischer Inhibitoren untersucht.

Zur Untersuchung der Thermostabilität der Gesamtproteinase wurden Mitteldarmdrüsenextrakte der beiden Arten bei Temperaturen von 20 - 60 °C bis zu einer Stunde vorinkubiert. Die Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani* zeigte jeweils eine geringe Thermostabilität. Die Tatsache, daß die Gesamtproteinase der beiden Arten eine deutliche Instabilität bei Temperaturen über 20 °C aufweist, könnte im Zusammenhang mit einer Anpassung an die natürlichen Umgebungstemperaturen der Tiere verstanden werden. Ein solcher Zusammenhang zwischen der natürlichen Umgebungstemperatur, an die die Arten angepaßt sind, und der Proteinasestabilität wurde bereits für zwei dekapode Crustaceen aus verschiedenen klimatischen Regionen beschrieben (Dittrich 1992). Hierbei zeigte die West-Indo-pazifische Art *Clibanarius striolatus* im Vergleich mit *P. bernhardus* aus der Deutschen Bucht eine deutlich höhere Thermostabilität einer bei beiden Arten vorhandenen trypsinähnlichen Proteinase. Bei *P. bernhardus* sank die Aktivität der Proteinase ähnlich wie bei *C. crangon* und *C. allmani* bei 50 °C nach 40 min auf unter 80 % und bei 60 °C nach 20 min auf 9 % der Anfangsaktivität. Im Gegensatz dazu zeigte die Proteinase von *C. clibanarius* bei 50 °C über 120 min keinen Aktivitätsverlust. Bei 60 °C lag die Aktivität nach 30 min noch bei 85 % der Anfangsaktivität. Die beobachtete geringe Thermostabilität der Gesamtproteinase könnte in diesem Zusammenhang eine Anpassung der Nordseegarnelen an die natürlichen Umgebungstemperaturen sein, die bis in die Nähe des Gefrierpunktes fallen können und im Jahresmittel deutlich unter 20 °C liegen. Die offensichtliche Instabilität der Enzyme bei höheren Temperaturen könnte dabei durch besondere molekulare Struktureigenschaften verursacht werden. Johnson et al. (1975) vermuten als Ursache für die bei antarktischen Fischen beobachteten hohen Enzymstabilitäten eine Zunahme schwacher intramolekularer Bindungen im Zuge einer Anpassung an die kalten Umgebungstemperaturen. Diese schwachen Molekülbindungen, die bei niedrigen Temperaturen eine feste Molekülstruktur zur Folge haben, würden sich demnach bei einer Zunahme der Temperatur verstärkt öffnen und somit für eine schnelle Inaktivierung der Enzyme verantwortlich sein. Es ist vorstellbar, daß solche Struktureigenschaften auch bei den Nordseegarnelen für die beobachtete geringe Thermostabilität verantwortlich sind.

Die Ergebnisse zur Langzeitstabilität können im selben Zusammenhang mit der beschriebenen Thermostabilität der Proteinase interpretiert werden. Bei beiden Arten verlor die Gesamtproteinase bei 25 °C innerhalb der ersten 24 Stunden über 70 % der maximalen

Aktivität. Bei 5 °C konnten bei beiden Arten über den gesamten Versuchszeitraum deutlich höhere Aktivitätswerte ermittelt werden. Zumindest bei *C. crangon* blieb der rapide Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 24 Stunden bei 5 °C aus.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Enzymmessungen wurden auf der Grundlage der Versuche zur Enzymstabilität daraufhin bei Temperaturen um 30 °C durchgeführt. Desweiteren wurden ausschließlich frische bzw. bei – 80 °C aufbewahrte Präparate für die Untersuchungen verwendet.

Abschließend wurde durch die Verwendung der spezifischen Proteinaseinhibitoren E 64 und AEBSF der Anteil von Cystein- bzw. Serinproteinasen an der Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt.

Der Einfluss von E 64 führte bei *C. crangon* und *C. allmani* zu einem Aktivitätsverlust von über 70 %. Unter dem Einfluss von AEBSF hingegen sank die Aktivität um weniger als 9 %.

E 64 ist ein hoch selektiver und irreversibler Inhibitor für Cysteinproteinasen (Barrett et al. 1982). Dies konnte bei Wirbeltieren für verschiedene Cysteinproteinasen wie zum Beispiel Papain, Actinidase und Cathepsin B, H und L gezeigt werden (Katunuma & Kominami 1995, Sreedharan et al. 1996, Visessanguan et al. 2003). AEBSF ist ein spezifischer Inhibitor für Serinproteinasen. Es konnte gezeigt werden, daß AEBSF Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin bei Wirbeltieren inhibiert (Markwardt 1974). Die Ergebnisse der Inhibitorversuche lassen den Schluß zu, daß bei den untersuchten Nordseegarnelen *C. crangon* und *C. allmani* der überwiegende Teil der Proteinase-Aktivität auf Cysteinproteinasen zurückzuführen ist, während kaum ein Anteil an Serinproteinasen zu verzeichnen ist. Die Inhibitorversuche bestätigen auch die Ergebnisse aus der pH-Meßreihe. Die für *C. crangon* und *C. allmani* ermittelten relativ niedrigen pH-Optima deuten auf einen geringen Anteil von trypsinähnlichen Serinproteinasen hin und sind eher typisch für cathepsinähnliche Proteinasen. Es ist somit wahrscheinlich, daß bei den untersuchten Arten Cathepsine hauptsächlich zur Proteinaseaktivität beitragen.

Zum Vergleich wurden Mitteldarmdrüsenextrakte von *P. montagui*, *P. californiensis* und *E. superba* für die Inhibitorversuche eingesetzt. Bei *P. montagui* verringerte sich die Aktivität unter dem Einfluss von E64 ähnlich wie bei *C. crangon* und *C. allmani* um 60% , während AEBSF zu einem Aktivitätsverlust von nur 10 % führte. Bei *P. californiensis* und *E. superba* kehrten sich die Verhältnisse jedoch um. Die Aktivität wurde durch E 64 nur um maximal 10 % verringert, während AEBSF zu einem Aktivitätsverlust von mindestens 50 % führte. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte für *E. superba* in enzymatischen Untersuchungen ein hoher Anteil von Serinproteinasen gezeigt werden (Osnes & Mohr 1985). *P. californiensis* besitzt wie zahlreiche andere Penaeus-Arten typischerweise ebenfalls einen hohen Anteil an Serinproteinasen (Tsai et al. 1986).

Nach der Untersuchung zur Wirksamkeit von E 64 und AEBSF wurde für *C. crangon* und *C. allmani* die gewichtsspezifische Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt und mit den Aktivitäten von *P. montagui* und *E. superba* verglichen. Zusätzlich wurden erstmals *P. bernhardus* und *C. pagurus* für einen Vergleich herangezogen.

Alle für die Bestimmung herangezogenen Arten zeigten eine hohe spezifische Proteinase-Aktivität, wie sie für Verdauungsextrakte zahlreicher dekapoder Crustaceen typisch ist (Gibson & Barker 1979, Osnes 1985, Honjo et al. 1990, Garcia-Carreño 1992). Zwischen den untersuchten Arten, die sich zum Teil beträchtlich in ihrem Lebens- und Ernährungsverhalten unterscheiden, traten keine signifikanten Unterschiede in der gewichtsspezifischen Aktivität der Gesamtproteinase auf. Eine häufig angebrachte Hypothese besagt, daß zwischen dem natürlichen Ernährungsverhalten der Arten und der Enzymaktivität, die für die Hydrolyse der entsprechend häufigsten Nahrungskomponenten verantwortlich ist, eine erkennbare Korrelation besteht (Guillaume & Ceccaldi 2001). So würden karnivore Arten generell höhere Proteinase-Aktivitäten aufweisen als omnivore Arten, die wiederum durch höhere Amylase-Aktivitäten gekennzeichnet wären. Diese scheinbar logische Hypothese konnte jedoch bisher nicht zufriedenstellend bestätigt werden. Im Gegenteil zeigen verschiedene Studien einen entgegengesetzten Trend. Hinsichtlich einer Beziehung zwischen der spezifischen Proteinase-Aktivität und der Ernährungsweise einzelner Arten konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß die omnivoren Garnelen *P. vannamei* und *Penaeus monodon* höhere Proteinase-Aktivitäten hatten als die karnivoren Vertreter *P. californiensis* und *Penaeus muelleri* (Gimenez et al. 2001). Vermutlich kommt es selbst innerhalb einer Art zu enormen Streuungen der Enzymaktivitäten, da diese in hohem Maße von der jeweiligen qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Nahrung abhängig sein können. Im Rahmen der Proteinasebestimmung ließen sich zwischen den omnivoren Vertretern wie *E. superba* und den Nordseegarnelen auf der einen Seite und den deutlich karnivoren Arten *C. pagurus* und *P. bernhardus* auf der anderen Seite wie erwähnt keine signifikanten Unterschiede ermitteln. Die omnivoren Arten zeigten im Mittel jedoch höhere Proteinase-Aktivitäten als *C. pagurus* und *P. bernhardus*. Innerhalb der untersuchten Arten trat insgesamt jedoch eine hohe Streuung der Meßwerte auf, so daß von einer weiterführenden Interpretation abgesehen werden muß. Hinsichtlich des methodischen Vorgehens bleibt zu erwähnen, daß für die zum Vergleich herangezogenen Arten im einzelnen keine Optimierung der Reaktionsbedingungen des Testverfahrens stattgefunden hat. Der verwendete pH-Wert von 6,0 kann bei diesen Arten zu einer gewissen Einschränkung der Proteinase-Aktivität geführt haben, wenn deren pH-Optima im alkalischen Bereich lagen. Davon ist insbesondere bei Arten mit einem hohen Anteil an Serinproteinasen auszugehen, wie es bei *E. superba* der Fall ist.

Für die Untersuchung einer möglichen Beziehung zwischen der gewichtsspezifischen Proteinase-Aktivität und der relativen Größe der Mitteldarmdrüse bei *C. crangon* und *C. allmani* wurde bei jeweils 30 Tieren der prozentuale Anteil der Mitteldarmdrüsen am Ge-

samtgewicht bestimmt und mit der entsprechenden gewichtsspezifischen Proteinase-Aktivität verglichen. Sowohl bei *C. crangon* als auch bei *C. allmani* wurden zwischen den untersuchten Tieren erhebliche Unterschiede zwischen den Gewichtsanteilen der Mitteldarmdrüsen gefunden. Die prozentualen Anteile der Mitteldarmdrüsen lagen dabei für *C. crangon* zwischen 2 und 8 % des Gesamtgewichtes. Bei *C. allmani* lagen diese Anteile zwischen 1 und 5 % des Körpergewichtes. Bei *C. crangon* trat eine negative Korrelation zwischen dem relativen Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse und der gewichtsspezifischen Aktivität der Gesamtproteinase auf. *C. allmani* zeigte die gleiche Tendenz, jedoch war die Regression in diesem Fall nicht statistisch signifikant. Eine mögliche Erklärung für diese Beziehung kann in der Funktion der Mitteldarmdrüse als Speicherorgan bei Crustaceen gefunden werden. Neben sekretorischen Zellen, die für die Ausschüttung von Verdauungsenzymen verantwortlich sind, befinden sich im Epithel der Mitteldarmdrüse spezifische Reservezellen (Restzellen), die in hohem Maße zur Speicherung von Lipiden, Glycogen und verschiedenen Mineralien befähigt sind. Diese Speicherstoffe können sowohl exogener Natur sein und aus der aufgenommenen Nahrung stammen, als auch durch den Abbau eigenen Gewebes gewonnen werden (Guillaume & Ceccaldi 2001). Während einer auftretenden Hungersituation greifen die Tiere verstärkt auf diese Reservestoffe zurück. So konnten Speck & Urich (1969) zeigen, daß bei *Orconectes limosus* während einer zweiwöchigen Hungerphase die Lipide der Mitteldarmdrüse verstärkt metabolisiert wurden. In diesem Wechselspiel zwischen Speicherung und Metabolisierung von Reservestoffen kann die Mitteldarmdrüse in Abhängigkeit von der jeweiligen Ernährungssituation enormen Größenveränderungen unterliegen. Darauf deuten auch die Ergebnisse dieser Arbeit hin. Die bei *C. crangon* und *C. allmani* ermittelten unterschiedlichen Gewichtsanteile der Mitteldarmdrüsen könnten unterschiedliche Ernährungszustände widerspiegeln. Die Tatsache, daß bei der Abnahme des Gewichtsanteils der Mitteldarmdrüse gleichzeitig eine Erhöhung der spezifischen Proteinase-Aktivität zu beobachten war, könnte dadurch erklärt werden, daß bei der Abnahme der Mitteldarmdrüse im Zuge eines verstärkten Abbaus von Reservestoffen die Aktivität der Gesamtproteinase auf einem gleichbleibenden Niveau gehalten wurde.

#### 4.2 Quantifizierung der Trypsin-Aktivität

*E. superba* hatte eine signifikant höhere spezifische Aktivität als alle anderen Arten. Eine zweite Gruppe mit ebenfalls hoher Trypsin-Aktivität bildeten *C. pagurus* und *P. bernhardus*. *C. crangon* und *C. allmani* hatten die geringsten spezifischen Trypsin-Aktivitäten der untersuchten Arten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Norseeegarnelen *C. crangon* und *C. allmani* trotz einer relativ hohen mit den anderen untersuchten Arten vergleichbaren Gesamtproteinase-Aktivität sehr geringe Trypsin-Aktivitäten aufweisen. Damit konnten sowohl die im Vorfeld dieser Arbeit ermittelten geringen Trypsin-Aktivitäten, als auch die im Rahmen dieser Arbeit ge-

wonnenen Hinweise auf den geringen Anteil trypsinähnlicher Serinproteinasen bestätigt werden.

Das numerische Verhältnis aus den Aktivitäten von Trypsin- und Gesamtproteinase war entsprechend für *C. crangon* und *C. allmani* am niedrigsten. Bereits bei der nahverwandten Art *P. montagui*, die im Vergleich mit *C. crangon* und *C. allmani* keine signifikant höhere Trypsin-Aktivität aufwies, lag der Anteil um den Faktor 3,5 bzw. 2 höher. Der Trypsinanteil erhöhte sich kontinuierlich bei *P. bernhardus* und *C. pagurus* und lag letztendlich bei *E. superba* um den Faktor 10 höher als bei *C. crangon* und um den Faktor 6 höher als bei *C. allmani*.

Die hohen Trypsinanteile von *E. superba*, *C. pagurus*, *P. bernhardus* stehen im Einklang mit verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten über Proteinase bei Crustaceen. Bei den meisten Crustaceen, insbesondere aber bei den Dekapoda, wurde nachgewiesen, daß trypsinähnliche Serinproteinasen zu den proteolytischen Hauptverdauungsenzymen zählen, die i.a. in großen Mengen und zum Teil in mehreren Isoformen gebildet werden. So wurden bei *E. superba* drei verschiedene trypsinähnliche Serinproteinasen isoliert und charakterisiert (Osnes & Mohr 1985). Brun & Wojtowicz (1976) konnten für *Cancer borealis* und *Cancer irrotatus* im Rahmen vergleichender Studien über Verdauungsenzyme ebenfalls trypsinähnliche Proteinase nachweisen. Dittrich (1992) beschrieb die thermischen Eigenschaften einer trypsinähnlichen Proteinase von *P. bernhardus* im Vergleich mit einer verwandten Art. Auch für viele dekapode Garnelen liegen Aktivitätsnachweise vor. Murthy & Saxena (1979) konnten zum Beispiel eine Trypsin-Aktivität in der Mitteldarmdrüse von *Macrobrachium lamarrei* nachweisen. Ebenso gelang dies bei *P. vannamei* (Le Moullac et al. 1997, Hernandez-Cortes et al. 1997).

Die gemessenen ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten bei *C. crangon* und *C. allmani* beruhten bisher nur auf der Untersuchung relativ weniger Exemplare. Da generell jedoch nicht auszuschließen war, daß bei den beiden Arten eine hohe intraspezifische Streuung der Trypsin-Aktivitäten vorlag, wurde an jeweils 30 weiteren Tieren die Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten und ergänzend die Aktivität der Gesamtproteinase bestimmt.

Die Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitätsniveaus bei *C. crangon* und *C. allmani* läßt zwei wesentliche Schlußfolgerungen zu. Zum einen kann eine hohe intraspezifische Streuung der Aktivitäten bei den beiden Arten ausgeschlossen werden. Der überwiegende Anteil der Tiere hatte eine sehr niedrige Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$ . Zum anderen kann ausgeschlossen werden, daß beide Arten prinzipiell nicht zu einer Erhöhung der Trypsin-Aktivität fähig sind.

Wie schon für die spezifische Aktivität der Gesamtproteinase wurden die spezifischen Trypsin-Aktivitäten beider Arten gegen die jeweiligen prozentualen Anteile der Mitteldarmdrüse am Gesamtgewicht der Tiere aufgetragen. Für beide Arten ließ sich dabei keine Korrelation zwischen spezifischer Trypsin-Aktivität und dem Gewichtsanteil der Mittel-

darmdrüse feststellen. Eine zwangsläufige Veränderung der spezifischen Enzymaktivität, die, wie es für die Gesamtproteinase diskutiert wurde, aus einer Gewichtszunahme oder Gewichtsabnahme der Mitteldarmdrüse bei gleichbleibender Enzymaktivität resultiert, erscheint damit unwahrscheinlich. Die wenigen gemessenen erhöhten spezifischen Trypsin-Aktivitäten resultieren also offensichtlich aus einer individuell verstärkten Enzymsynthese. Es konnte für die Tiere mit erhöhter spezifischer Trypsin-Aktivität keine gleichzeitige Erhöhung der spezifischen Gesamtproteinase-Aktivität beobachtet werden. Es existiert also keine Korrelation zwischen der gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität und der zugehörigen Gesamtproteinase-Aktivität.

Es bleibt festzuhalten, daß beide Arten prinzipiell niedrige Trypsin-Aktivitäten aufweisen, offenbar jedoch unter bestimmten Umständen zu einer Erhöhung der Trypsin-Aktivität fähig sind. Aufgrund der beschriebenen Häufigkeitsverteilung lassen sich mögliche analytische Ursachen für die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten von *C. crangon* und *C. allmani* einschränken. Zunächst kann ausgeschlossen werden, daß das Trypsin der Nordseegarnelen unter den gewählten Reaktionsbedingungen instabil ist und dadurch der Aktivitätsnachweis nicht gelingt. Abgesehen davon, daß die bisher bekannten Trypsin-Isoformen aus anderen Crustaceen eine besonders hohe Stabilität aufweisen, konnten für beide Arten neben niedrigen auch hohe Trypsin-Aktivitäten bestimmt werden. Aus dem gleichen Grund ist auszuschließen, daß das Trypsin der Nordseegarnelen eine veränderte Substratspezifität aufweist und dadurch nicht auf das verwendete Trypsinsubstrat anspricht. Auch einige mögliche biologische Ursachen erscheinen als Erklärung für die geringen Trypsin-Aktivitäten eher unwahrscheinlich. So könnte man aufgrund der überwiegend niedrigen Trypsin-Aktivitäten von einer evolutiven Entwicklung bei den Nordseegarnelen ausgehen, in deren Verlauf es, bedingt durch eine Veränderung der Enzymstruktur, zu einer Reduktion der Trypsin-Aktivität gekommen ist. Phylogenetische Zusammenhänge bei der Entsehung unterschiedlicher Enzymformen sind besonders bei Fischen untersucht worden (Spillart & Gudmundsdóttir 1999) und verdeutlichen, daß die Aminosäuresequenzen bestimmter Enzyme im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung enormen Veränderungen unterliegen können. Gegen die Annahme, daß solch eine Entwicklung generell bei den Nordseegarnelen stattgefunden hat spricht die Tatsache, daß bei beiden Arten wenige Tiere zum Teil deutlich erhöhte Trypsin-Aktivitäten aufweisen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die ungewöhnliche Häufigkeitsverteilung auf eine Intraspezifischen Variabilität in der Enzymausstattung zurückzuführen ist.

Desweiteren können die Enzymaktivitäten verschiedener Verdauungsenzyme mit verschiedenen Phasen des Häutungszyklus variieren. Gimenez et al. (2001) konnten an *P. muelleri* Zusammenhänge zwischen verschiedenen Häutungsstadien und der Trypsin-Aktivität aufzeigen. In den Zwischenhäutungsstadien wurden geringe Trypsin-Aktivitäten gemessen, während diese in der Nachhäutungsphase anstiegen. Im Rahmen der Untersuchungen an *C. crangon* und *C. allmani* wurden jedoch für die Enzymmessungen

gezielt nur Tiere im Zwischenhäutungsstadium verwendet, so daß diese Ursache für eine Variation der Aktivitäten ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Das erst in den letzten Jahren intensiver erforschte Vorkommen endogener oder exogener natürlicher Trypsininhibitoren könnte eine weitere Erklärung für die Variation darstellen. Diese natürlichen Enzyminhibitoren scheinen eine wichtige Funktion bei der Regulation des Verdauungssystems einiger Crustaceen einzunehmen. García-Carreño et al. (1998) konnten in der Mitteldarmdrüse von *Litopenaeus vannamei* eine Substanz nachweisen, die einen starken aktivitätsmindernden Einfluss auf Trypsin hatte. Der Einfluss solcher Inhibitoren als Ursache für die geringen Trypsin-Aktivitäten bei den Nordseegarnelen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Es erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, daß solche Inhibitoren für eine Häufigkeitsverteilung der Aktivitäten, wie sie gezeigt wurde, verantwortlich sind. Wahrscheinlicher wäre dann eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der Häufigkeiten.

Die biologischen Ursachen für die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten bzw. für die wenigen hohen Aktivitäten bei den Nordseegarnelen könnten auch in einer Anpassung an spezifische Ernährungsbedingungen oder in einer speziellen Weise der enzymatischen Nahrungsnutzung und Assimilation der Nahrung begründet zu sein. Dieser Aspekt wurde in einem eigenen Versuchsabschnitt näher untersucht. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt.

Vor diesem Versuchsabschnitt sollten jedoch erst einmal ausgewählte Mitteldarmdrüsenextrakte von *C. crangon* und *C. allmani* mittels chromatographischer und gelelektrophoretischer Verfahren weiterführend charakterisiert werden.

### 4.3 Chromatographie

Für die Auftrennung und Isolierung der zu untersuchenden Enzyme wurden zum einen Extrakte verwendet, die eine geringe gewichtsspezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  aufwiesen. Diesen wurden zum anderen Extrakte mit einer erhöhten Trypsin-Aktivität über  $2,0$  gegenübergestellt.

Die chromatographische Auftrennung der Extrakte unterstreicht die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Gesamtproteinase-Aktivität für *C. crangon* und *C. allmani*. Für beide Arten wurde in den Fraktionen trotz sehr geringer Trypsin-Aktivität eine ausgeprägt hohe Proteinase-Aktivität nachgewiesen. Die Ähnlichkeit der Aktivitätsprofile legt die Vermutung nahe, daß die Proteinase-Aktivität beider Arten durch ein vergleichbares Enzymspektrum hervorgerufen wird. In beiden Fällen deutet sich eine weitgehende Übereinstimmung der in den Fraktionen ermittelten Proteinkonzentration mit der Intensität der Proteinase-Aktivität an. Offensichtlich korreliert die Zunahme der Proteinase-Aktivität mit einer Zunahme der Proteinmenge. Die Vermutung liegt nahe, daß in den Fraktionen, in denen sich eine hohe Proteinase-Aktivität mit einer hohen Proteinkonzentration deckt, auch eine erhöhte Menge an Proteinase vorliegt. Nur wenige Fraktionen bei beiden Arten zeigen trotz einer meßbaren Proteinkonzentration keine Proteinase-Aktivität. Für beide Arten zeigte

sich ab einer NaCl-Konzentration von 0,6 M eine Divergenz zwischen Proteinkonzentration und UV-Aufzeichnung (280 nm). Bei 280 nm absorbieren vor allem Aminosäuren mit aromatischen Ringen die ultraviolette Strahlung. Bei den Substanzen, die bei 280 nm detektiert wurden und offensichtlich keine Proteine waren, könnte es sich zum Beispiel um Nukleinsäuren aus dem Mitteldarmdrüsen Gewebe handeln. Nukleinsäuren besitzen stark variierende Absorptionseigenschaften und können auch bei 280 nm ultraviolette Strahlung absorbieren.

Der Anteil einzelner Proteinaseklassen in den Fraktionen wurde wiederum durch den Einsatz der spezifischen Proteinaseinhibitoren E 64 und AEBSF untersucht. Für diesen Versuchsansatz wurde ausschließlich ein Mitteldarmdrüsenextrakt von *C. crangon* mit einer geringen spezifischen Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  verwendet.

Unter dem Einfluss des Cysteinproteinaseinhibitors E 64 fiel die Aktivität der Gesamtproteinase über den gesamten Bereich des ersten Maximums und den Beginn des zweiten Aktivitätsmaximums auf unter 10 % der maximalen Aktivität ab (s. Abb. 22). Unter dem Einfluss des Serinproteinaseinhibitors AEBSF hingegen zeigte das Aktivitätsprofil keine drastischen Einbrüche und sank in keiner Fraktion unter 80 % der maximalen Aktivität. Die Bestimmung der Anteile einzelner Proteinaseklassen an den Gesamtextrakten hatte wie beschrieben einen hohen Anteil von Cysteinproteinasen (über 70 %) an der Gesamtproteinase aufgezeigt, während kaum ein Anteil von Serinproteinasen zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis kann hiermit klar bestätigt werden. Darüber hinaus wird deutlich, daß E 64 insbesondere im Bereich der maximalen Aktivität der Gesamtproteinase den größten Einfluss ausübt. Das läßt den Schluß zu, daß hauptsächlich Cysteinproteinasen in diesen Fraktionen zur Proteinase-Aktivität beitragen. Im Bereich des zweiten Aktivitätsmaximums, wo die Proteinase-Aktivität durch den Einfluss von E 64 nur auf 65 % sank, lassen sich andere Proteinaseklassen vermuten. Da auch AEBSF in diesem Bereich zu keiner größeren Inaktivierung der Aktivität geführt hat, könnten hier Metallo- oder Aspartatproteinasen für die Aktivität mitverantwortlich sein.

In den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani*, bei denen die Verteilung der Gesamtproteinase untersucht wurde, also an Tieren, die eine spezifische Trypsin-Aktivität unter  $2,0 \text{ (U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1})$  aufwiesen, erfolgte der Nachweis für die Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin.

Trotz der deutlichen Gesamtproteinase-Aktivität konnte bei beiden Arten keine Trypsin- oder Chymotrypsin-Aktivität nachgewiesen werden. Das Fehlen der Trypsin-Aktivität steht im Einklang mit der quantitativ ermittelten gewichtsspezifischen Trypsin-Aktivität des Gesamtextraktes.

Der Aktivitätsnachweis in den Fraktionen stellt vor allem eine zusätzliche Absicherung der bisher gewonnenen Erkenntnisse dar.



Durch die Aufreinigung der Gesamtextrakte konnten eventuell vorhandene Inhibitoren oder andere Substanzen, die eine Inaktivierung der Enzyme in den Gesamtextrakten bewirken, möglicherweise entfernt werden.

Anschließend erfolgte der Nachweis von Trypsin und Chymotrypsin in den Fraktionen von *C. crangon* und *C. allmani* mit spezifischen Trypsin-Aktivitäten über 2,0 ( $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{fw}}^{-1}$ ).

Sowohl bei *C. crangon*, als auch bei *C. allmani* konnte eine deutliche Trypsin-Aktivität über einen Bereich von wenigen Fraktionen festgestellt werden (s. Abb. 24 - 27). Der eindeutige Nachweis einer Trypsin-Isoform zeigt, daß die chromatographische Aufreinigung offensichtlich keinen gravierenden Aktivitätsverlust zur Folge hatte, der eine mögliche Ursache für die zuvor ermittelten Trypsinprofile ohne Aktivität gewesen sein könnte. Solch ein Aktivitätsverlust durch die chromatographische Auftrennung kann dadurch entstehen, daß stabilitätsvermittelnde Substanzen wie Salze und andere Proteine beim Trennvorgang entfernt werden (Osnes & Mohr 1985).

Die Trypsin-Aktivität beschränkte sich bei beiden Arten auf wenige Fraktionen, woraus geschlossen werden kann, daß außer Trypsin weitgehend keine anderen Proteinase das spezifische Substrat umgesetzt haben.

Sowohl bei *C. crangon*, als auch bei *C. allmani* eluierte Trypsin bei der gleichen NaCl-Konzentration von 0,32 M. Diese Übereinstimmung ist in zweierlei Hinsicht ein wichtiger Hinweis. Zum einen zeigt sich hiermit, daß das Trypsin (möglich wären auch mehrere Isoformen) der beiden Arten die gleichen Ladungseigenschaften und damit einen ähnlichen Aufbau besitzt. Zum anderen deutet die Übereinstimmung darauf hin, daß die Trypsin-Aktivität bei beiden Extrakten durch das eigene Trypsin der Tiere hervorgerufen wurde. Vorstellbar wäre auch, daß bei der Verdauung von aufgenommenen Beutetieren deren Trypsine frei werden und ihr katalytisches Potential bewahren. Solche Enzyme könnten in den Fraktionen aufgetrennter Extrakte ebenso eine Aktivität hervorrufen, wie die endogenen Enzyme. In so einem Fall wäre es jedoch wahrscheinlicher, daß die Trypsin-Aktivität aufgrund unterschiedlicher Herkunft in verschiedenen Fraktionen auftreten würde.

Im Falle von *C. crangon* befanden sich die maximale Trypsin- und Gesamtproteinase-Aktivität nicht in derselben Fraktion, was darauf hindeutet, daß die Trypsinexpression zusätzlich zu der oder den Proteinase/n stattgefunden hat, die die maximale Proteinase-Aktivität erzeugen. Bei *C. allmani* lagen die Aktivitätsmaxima in ein und derselben Fraktion. Es ist jedoch schwer zu klären, ob in diesem Fall das Trypsin mehr oder weniger allein für die Gesamtproteinase-Aktivität in diesen Fraktionen verantwortlich war. Dagegen spricht, daß bei der gleichen NaCl-Konzentration zuvor die maximale Proteinase-Aktivität auftrat, ohne daß eine Trypsin-Aktivität zu verzeichnen war.

Auch die Serinproteinase Chymotrypsin konnte bei *C. crangon* und *C. allmani* eindeutig festgestellt werden. Bei *C. crangon* trat ein Aktivitätsmaximum auf, während bei *C. allmani*

neben einem Hauptmaximum noch ein weiteres, aber undeutlicheres isoliertes Maximum auftrat.

Während in zahlreichen Studien über Verdauungsenzyme bei dekapoden Crustaceen Trypsin-Aktivitäten beschrieben wurden, wird hingegen die Gegenwart von Chymotrypsin unterschiedlich bewertet. Während in einigen Arbeiten keine Chymotrypsin-Aktivität gezeigt werden konnte (Galgani & Nagayama 1988, Garcia-Carreño & Haard 1993), konnten andere Studien in dekapoden Crustaceen Chymotrypsin nachweisen (Tsai et al. 1986, Hernández-Cortés 1993). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten für beide Arten eine deutliche Aktivität von Chymotrypsin. Im Unterschied zur Trypsin-Aktivität ergab sich für die Nordseegarnelen jedoch ein unterschiedliches Eluierungsmuster. Bei *C. allmani* deuteten sich zwei Isoformen des Enzyms an (s.o.), die bei deutlich unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eluierten und bei *C. crangon* nicht zu finden waren. Die Chymotrypsinform von *C. crangon* hingegen konnte nicht bei *C. allmani* gefunden werden. Es bleibt fraglich, ob den untersuchten Arten generell die jeweils nicht vorhandene/n Chymotrypsinform/en fehlte/n, oder ob diese im Rahmen regulatoriver Mechanismen einer niedrigen Expression unterlag/en und somit nicht gemessen werden konnte.

Nach der Aufreinigung und Identifikation der Serinproteinasen in Extrakten mit einer hohen Trypsin-Aktivität wurde in den Fraktionen aufgetrennter Mitteldarmdrüsenextrakte von *C. crangon* und *C. allmani* mit einer geringen Trypsin-Aktivität der Nachweis der Cysteinproteinase Cathepsin-L durchgeführt. Bei beiden Arten konnte Cathepsin-L in drei unterschiedlichen Aktivitätsmaxima nachgewiesen werden. Die Aktivitätsmaxima waren jedoch bei beiden Arten unterschiedlich ausgeprägt. Im Unterschied zu den Elutionsprofilen von Trypsin und Chymotrypsin zeigte das Profil von Cathepsin-L eine wesentlich breitere Verteilung über die Fraktionen. Insbesondere bei *C. allmani* konnte man eine deutliche Übereinstimmung mit dem Aktivitätsprofil der Gesamtproteinase erkennen. Im Vergleich mit dem Aktivitätsprofil der Gesamtproteinase nach Inkubation mit dem Cysteinproteinaseinhibitor E 64 wird deutlich, daß der Bereich der stärksten Inhibierung genau der Bereich ist, in dem Cathepsin-L ein Aktivitätsmaxima aufzeigt. Der Bereich, in dem die Cathepsin-L-Aktivität kontinuierlich abfällt, korreliert wiederum mit der Zunahme der durch E 64 inhibierten Gesamtproteinase-Aktivität. Mit dem Aktivitätsnachweis von Cathepsin-L konnte erstmals die Aktivität einer spezifischen Cysteinproteinase gezeigt werden, nachdem bis zum jetzigen Zeitpunkt mehrere Hinweise auf einen hohen Anteil cathepsinähnlicher Cysteinproteinasen an der Gesamtproteinase-Aktivität der Nordseegarnelen erbracht wurden. Cathepsin-L ist eine typische Cysteinproteinase, die vor allem in lysosomalen Zellkompartimenten gefunden wird. Dort übernimmt Cathepsin-L zusammen mit anderen Cathepsinen eine wichtige Rolle bei der Proteolyse endogener und exogener Proteine (Kominami et al. 1991). Während die Cysteinproteinasen bei Vertebraten eine sehr gut untersuchte Enzymgruppe darstellen, liegen für Invertebraten nur wenige Erkenntnisse über Charakteristika und Aktivitäten von

Cysteinproteinasen vor. Laycock et al. (1989) fanden in Verdauungsextrakten des Amerikanischen Hummers eine Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteinase, die für über 80 % der proteolytischen Aktivität verantwortlich war. In der Mitteldarmdrüse von *P. vannamei* konnte die Aktivität einer Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteinase mit einem pH-Optimum von 5,1 nachgewiesen werden (Le Boulay et al. 1996).

Neben Proteinasen gehören auch Peptidasen zum proteolytischen Enzymspektrum der Crustaceen, wobei diese Enzymgruppe weit weniger gut untersucht ist als die Proteinasen. In einigen Arbeiten konnten bei dekapoden Crustaceen Peptidaseaktivitäten nachgewiesen werden (Kleine 1967, Doke & Ninjoor 1987).

In aufgetrennten Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* erfolgte der Nachweis der Peptidasen Aminosäure-Arylamidase und Leucin-Amino-peptidase. Für beide Arten konnte sowohl eine Arylamidase-, als auch eine Amino-peptidaseaktivität nachgewiesen werden. Bei *C. crangon* traten beide Enzyme mit jeweils zwei Aktivitätsmaxima in Erscheinung. *C. allmani* zeigte jeweils nur ein Aktivitätsmaximum der beiden Enzyme.

#### 4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die weiterführende Charakterisierung einzelner Proteinasen wurden spezielle Fraktionen nach der Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie ausgesucht und für die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Der Aktivitätsnachweis einzelner Proteinasen erfolgte über eine Substrat-SDS-PAGE. Im Gegensatz zu einer normalen SDS-PAGE liegt der Vorteil dieser Methode darin, ein Proteingemisch gelelektrophoretisch aufzutrennen, ohne die in der Probe befindlichen Enzyme weitgehend zu deaktivieren. Hierfür ist es notwendig, die Enzymproben im Vorfeld nur mit sehr geringen Mengen des denaturierenden Agens SDS zu behandeln und keiner Hitzebehandlung auszusetzen. Normalerweise werden die zu untersuchenden Proben im Vorfeld gelelektrophoretischer Auftrennungen gekocht und mit SDS behandelt, um allen Proteinen eine starke negative Ladung zu verleihen, so daß die Auftrennung derselben nach der Molekülgröße erfolgen kann. Verdauungsenzyme zeichnen sich durch eine sehr kompakte Molekülstruktur aus, u.a. um besonders gegen eine Autolyse geschützt zu sein. So kann bei Verdauungsenzymen trotz einer Behandlung mit geringen SDS-Konzentrationen die Aktivität der Enzyme gewahrt bleiben. So zeigte zum Beispiel Schweinetrypsin bei einer Behandlung mit 0,1 % SDS 95 % der Enzymaktivität ohne Behandlung (Garcia-Carreño et al. 1993). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß einige Proteinasen, die durch die Substrat-SDS-PAGE nachgewiesen werden sollen, spezifische Aktivatoren wie zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$  benötigen und somit keine Aktivitätsbanden erzeugen. Desweiteren muß berücksichtigt werden, daß der pH-Wert des Puffersystem (pH 6,8/pH 8,8) bei der Gelelektrophorese nicht dem pH-Optimum aller in der Probe befindlichen Enzyme entspricht. Dies gilt insbesondere für die Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani* mit einem pH-Optimum zwischen 5,0 und 6,0. Für eine Optimierung wäre es notwendig gewesen, die Methode weiter zu

entwickeln und an die entsprechenden pH-Werte der Gesamtproteinase anzupassen. Dies war jedoch im Rahmen der Arbeit nicht möglich.

Aus den genannten Gründen wurde zusätzlich zur Substrat-SDS-PAGE eine SDS-PAGE durchgeführt, um die entsprechenden Proteinbanden zu erhalten. Die Methode der Substrat-SDS-PAGE diente im Rahmen dieser Arbeit zum Aktivitätsnachweis einzelner Proteinase und hatte nicht zum Ziel, die Molekulargewichte der Enzyme zu bestimmen. Eine exakte Größenbestimmung kann nur durch die Sequenzierung eines Proteins erfolgen. Außerdem zeigen die Proteine durch die besondere Probenbehandlung bei der Substrat-SDS-PAGE veränderte Laufeigenschaften, die es schwer ermöglichen, die Molekülgrößen exakt zu bestimmen und mit anderen Angaben zu vergleichen. Bei einer voll denaturierenden SDS-PAGE kommt es zu einer stärkeren Auffaltung der Proteine, so daß im Vergleich das gleiche Protein langsamer durch das Gel wandert und letztendlich ein größeres Molekulargewicht vermittelt. Die in dieser Arbeit ermittelten Molekülgrößen sollten in erster Linie dem Vergleich verschiedener Proteinase bei den untersuchten Arten dienen.

Für die Identifikation einzelner Proteinase nach der Anionenaustauschchromatographie wurden jeweils die Fraktionen ausgewählt, die die maximale Gesamtproteinase-, Trypsin- und Chymotrypsin-Aktivität aufwiesen.

Die Fraktionen mit der maximalen Aktivität der Gesamtproteinase von *C. crangon* und *C. allmani*, bei denen keine Trypsin- und Chymotrypsin-Aktivitäten gemessen werden konnten, zeigten bei beiden Arten eine Aktivitätsbande bei 21 kDa, der eine entsprechende Proteinbande von 21 kDa zugeordnet werden konnte. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß der Inhibitor E 64 zu einer deutlichen Abschwächung der Aktivitätsbande führt. Bei der entsprechenden Proteinase handelt es sich also offensichtlich um eine Cysteinproteinase. Die Identifikation dieser Cysteinproteinase in der Fraktion der maximalen Proteinase-Aktivität ist eine weitere Bestätigung des im Vorfeld mehrfach gezeigten hohen Anteils von Cysteinproteinase an der Aktivität der Gesamtproteinase. Ob es sich bei dieser Proteinase um eine Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteinase handelt, kann ohne den Einsatz eines weiteren spezifischen Inhibitors nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, daß Cathepsine monomere Proteinase sind, die sich durch ein Molekulargewicht unter 30 kDa auszeichnen (Le Boulay et al. 1996). Die relativ schwache Ausprägung der Aktivitätsbande bei 21 kDa könnte durch ein pH-Optimum der entsprechenden Proteinase im schwach sauren Bereich verursacht sein. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, daß die Proteinase zur Gruppe der Cathepsine gehört, die sich durch pH-Optima im sauren Bereich auszeichnen (s.o.).

In den Fraktionen der maximalen Gesamtproteinase-Aktivität von *C. crangon* und *C. allmani*, bei denen zusätzlich Trypsin- und Chymotrypsin-Aktivitäten ermittelt wurden, zeigten sich ebenfalls Aktivitätsbanden im Bereich um 21 kDa, die durch E 64 abgeschwächt wurden. Bei *C. crangon* erschienen in der Fraktion der maximalen Proteinase-Aktivität zwei weitere Aktivitätsbanden von 23,5 und 24 kDa, denen zwar keine entsprechenden Proteinbanden zugeordnet werden konnten, die jedoch ebenfalls durch E 64 abgeschwächt wurden.

Die Fraktionen der maximalen Trypsin-Aktivität zeigten bei *C. crangon* und *C. allmani* eine sehr deutliche Aktivitätsbande bei 20 kDa, die auch auf den entsprechenden Proteingelen wiederzufinden war. Unter dem Einfluss des spezifischen Trypsininhibitors TLCK nahm die Intensität der Bande bei *C. crangon* stark ab, während sie bei *C. allmani* vollständig verschwand. Der Inhibitor E 64 hingegen führte in beiden Fällen zu keinem Aktivitätsverlust. Es erscheint somit sehr wahrscheinlich, daß die Aktivitätsbanden bei 20 kDa durch Trypsin hervorgerufen wurden. Inwieweit die doch sehr starke Aktivitätsbanden durch mehrere ähnlich große Isoformen des Enzyms hervorgerufen werden, ist schwer zu beurteilen. Zumindest auf dem entsprechenden Proteingel bei *C. crangon* deuten sich im Bereich um 20 kDa zwei einzelne Banden an. Mit 20 kDa liegt das Trypsin der Nordseegarnelen in einem Bereich von 20 – 25 kDa, der als der natürliche Größenbereich der Säugetiertrypsine gilt (Keil 1971). Ein Vergleich mit Größenangaben von Trypsinformen, die bei anderen dekapoden Crustaceen beschrieben wurden, hat aufgrund der oben erwähnten unterschiedlich methodischen Herangehensweise nur eine begrenzte Aussagekraft. Gimenez et al. (2001) fanden bei *P. muelleri* mittels einer Substrat-SDS-PAGE vergleichbare Trypsinformen bei 17,4, 19,1 und 20 kDa. Weitere Arbeiten, die diese Methode verwendet haben, sind selten.

Entsprechend der unterschiedlichen Chymotrypsin-Aktivitätsmaxima bei *C. crangon* und *C. allmani* zeigten sich in den Fraktionen der beiden Arten auf dem Aktivitätsgel verschiedene Banden. Bei *C. crangon* erschienen in der Fraktion der maximalen Chymotrypsin-Aktivität drei deutliche Aktivitätsbanden von 43, 38 und 35 kDa sowie eine schwächere Bande von 48 kDa. Bei *C. allmani* zeigten sich in der Fraktion der maximalen ChymoTrypsin-Aktivität drei Aktivitätsbanden von 23, 22 und 20 kDa, wohingegen in der Fraktion mit dem zweiten, schwächeren Aktivitätsmaximum keine Banden nachgewiesen werden konnten. Bei der Bande von 20 kDa handelt es sich vermutlich um die Trypsinbande, die bereits in dieser Fraktion nachzuweisen war. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die übrigen Aktivitätsbanden, die in den Fraktionen maximaler ChymoTrypsin-Aktivität nachgewiesen wurden, alle auf Chymotrypsinformen zurückzuführen sind. In wissenschaftlichen Studien über Chymotrypsinformen bei verschiedenen dekapoden Crustaceen konnten bis jetzt maximal zwei Formen innerhalb einer Art beschrieben werden. Für eine exakte Zuordnung der Banden wäre es sinnvoll gewesen, einen spezifischen Chymotrypsininhibitor einzusetzen. Der häufig verwendete spezifische Chymotrypsininhibitor TPCK konnte jedoch nicht eingesetzt werden, da das Lösungsmittel, in dem der Inhibitor gelöst werden muß (Methanol), die Aktivität der Gesamtproteinase stark beeinträchtigt hat. Somit wäre eine exakte Identifikation von Chymotrypsin nicht möglich gewesen.

Weitere Hinweise auf die Natur der Aktivitätsbanden aus den Fraktionen mit maximaler Chymotrypsin-Aktivität ergaben sich jedoch durch die Isolierung von trypsinähnlichen Serinproteinasen aus den Mitteldarmdrüsenextrakten von *C. crangon* und *C. allmani* im Rahmen der Affinitätschromatographie.

Der Nachweis einzelner trypsinähnlicher Serinproteinasen, die durch die Affinitätschromatographie gewonnen werden sollten, gelang nur im Fall von *C. allmani*. Bei *C. crangon* erschienen zwar zwei deutliche Aktivitätsbanden im Gesamtextrakt, jedoch konnten diese Banden nicht in der Eluierungsfraction wiedergefunden werden. Zwar deuteten sich dort gewisse Aktivitätsbereiche an, doch war es nicht möglich, eine exakte Zuordnung zu treffen und somit eine Aussage über die erfolgreiche Isolierung einzelner trypsinähnlicher Serinproteinasen zu machen. Generell erschienen in der Eluierungsfraction mehrere Proteinbanden, die zu keiner Aktivitätsbande geführt haben. Zum einen wäre möglich, daß es sich bei diesen Banden um trypsinähnliche Serinproteinasen handelt, diese jedoch im Zuge des Verfahrens ihre Enzymaktivität weitgehend verloren haben. Zum anderen könnten verschiedene Proteine unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben.

Bei *C. allmani* ließen sich im Gesamtextrakt insgesamt sechs Aktivitätsbanden unterscheiden, von denen fünf in der Eluierungsfraction wiedergefunden werden konnten. Als trypsinähnliche Serinproteinasen erschienen zwei deutliche Aktivitätsbanden bei 48 und 43 kDa. Genau in diesem Größenbereich lagen die Aktivitätsbanden von *C. crangon*, die in der Fraction mit der maximalen Chymotrypsin-Aktivität nach der Anionenaustauschchromatographie auftraten. Somit erscheint es wahrscheinlich, daß es sich bei den Proteinase in dieser Größenordnung auch um Chymotrypsinformen handelt. Desweiteren erschienen zwei klare Aktivitätsbanden um 23 und 20 kDa. Auch diese Banden konnten bereits in den Fractionen der Anionenaustauschchromatographie gezeigt werden. Die Bande bei 20 kDa konnte für beide Arten durch TLCK als Trypsinform identifiziert werden. Die Bande bei 23 kDa zeigte sich bereits bei *C. allmani* in der Fraction der maximalen Chymotrypsin-Aktivität, so daß auch in diesem Fall davon ausgegangen werden kann, daß es sich um eine Chymotrypsinform handelt. Erstmals erschien eine Aktivitätsbande bei 18 kDa mit starker Intensität in der Eluierungsfraction. Die einzige Bande, die im Gesamtextrakt auftauchte, jedoch nicht als trypsinähnliche Serinprotease identifiziert werden konnte, zeigte sich bei 21 kDa. Das ist genau der Größenbereich, in dem für beide Arten in den Fractionen der Anionenaustauschchromatographie die Aktivität einer Cysteinprotease gezeigt werden konnte.

Die gelelektrophoretische Charakterisierung zeigte deutlich, daß in den Extrakten mit erhöhten Trypsin-Aktivitäten neben der prominenten Trypsinform bei 20 kDa eine ganze Palette weiterer trypsinähnlicher Serinproteinasen nachzuweisen war. Von diesen Serinproteinasen sind zumindest drei vermutlich Chymotrypsinformen.

Im Gegensatz dazu konnte in den Extrakten mit geringen Trypsin-Aktivitäten nur eine deutliche Cysteinprotease im Größenbereich von 21 kDa nachgewiesen werden, die offensichtlich den Hauptteil der Gesamtprotease-Aktivität erzeugte.

#### 4.5 Einfluss des Nahrungsangebotes auf das Enzymspektrum

In diesem Versuchsabschnitt wurde durch Fütterungsexperimente der Einfluss qualitativ unterschiedlicher Nahrung auf die Zusammensetzung des proteolytischen Enzymspektrums von *C. crangon* untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zur Intensität der Gesamtproteinase-, insbesondere jedoch der Trypsin-Aktivität aufzuzeigen.

Zwei Versuchsgruppen wurden über den Versuchszeitraum rein herbivor bzw. karnivor gefüttert. Eine dritte Gruppe hat über den gleichen Zeitraum gehungert. Nach Ablauf des Versuches wurde an den Mitteldarmdrüsenrohextrakten der Tiere die Aktivität der Gesamtproteinase sowie die Trypsin-Aktivität bestimmt. Das Protein bzw. Aktivitätsspektrum einzelner Rohextrakte wurde abschließend durch eine SDS- bzw. Substrat-SDS-PAGE dargestellt. Für alle Untersuchungen diente eine Kontrollgruppe als Standard. Im Zusammenhang mit der Gesamtproteinase-Aktivität wurden erneut der prozentuale Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse bestimmt.

Die herbivore Versuchsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell eine höhere spezifische Trypsin-Aktivität. Die karnivore Versuchsgruppe hingegen hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell niedrigere Trypsin-Aktivität. Diese Ergebnisse könnten durch die spezielle Weise der enzymatischen Nahrungsnutzung und Assimilation der Nahrung erklärt werden. Jones et al. (1997) und Le Vay et al. (2001) fanden, daß sich insbesondere herbivore dekapode Larven wie zum Beispiel phytotrophe Penaeiden-Larven durch besonders hohe Trypsin-Aktivitäten auszeichnen, während im Gegensatz dazu karnivore Larven deutlich verringerte Trypsin-Aktivitäten aufweisen. Die Ursache für die Korrelation zwischen hoher Trypsin-Aktivität und herbivorer Ernährungsweise sehen die Autoren in einer für die Tiere notwendigen Anpassung der Nahrungsassimilation.

Der Proteingehalt von Phytoplankton wie zum Beispiel Kieselalgen ist in der Regel deutlich niedriger als der von Zooplankton. Crustaceenlarven benötigen jedoch eine adäquate Proteinmenge, um während der Entwicklung eine ausreichende Energiequelle bereitzustellen und ein C:N Verhältnis von ungefähr 5:1 aufrecht zu erhalten (Anger 1988, Le Vay et al. 1993). Um diese Proteinmengen für den Metabolismus und das Wachstum zu gewinnen, passen sich herbivore Larven durch hohe Ingestionsraten, kurze Retentionszeiten der Nahrung und eine hohe Enzymaktivität an. Im Gegensatz dazu haben karnivore Larven eine andere Strategie. Sie haben niedrige Enzymaktivitäten und kompensieren dies durch verlängerte Retentionszeiten ihrer energetisch hochwertigen Nahrung (Le Vay et al. 2001).

Zwar wurden in dieser Arbeit keine herbivoren und karnivoren Crustaceenlarven verglichen, doch vor dem Hintergrund der beschriebenen Erkenntnisse ist es vorstellbar, daß sich einzelne Individuen auch innerhalb einer Art durch eine Regulierung der Enzymaktivitäten an sich verändernde Nahrungsbedingungen anpassen.

Hinsichtlich der Gesamtproteinase zeigte die herbivore Gruppe die geringste Aktivität aller Versuchsgruppen und einen im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erniedrigten Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse. Die karnivore Gruppe hatte im Vergleich mit der Kontrollgruppe

eine erhöhte Gesamtproteinase-Aktivität und den größten Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse aller Versuchsgruppen. Es deutet sich somit erneut an, daß zwischen der spezifischen Gesamtproteinase- und Trypsin-Aktivität offenbar keine Korrelation besteht. Dies konnte für alle Versuchsgruppen durch die Auftragung der spezifischen Gesamtproteinase-Aktivitäten gegen die spezifischen Trypsin-Aktivitäten gezeigt werden. Es ist vorstellbar, daß die Tiere der herbivoren Gruppe mit einer Erhöhung der Trypsin-Aktivität auf die veränderten Nahrungsbedingungen reagieren, jedoch gleichzeitig aufgrund des deutlich geringeren Energiegehaltes der Nahrung auf Reservestoffe der Mitteldarmdrüse zurückgreifen. Da im Rahmen der Enzymregulierung sinnvollerweise andere Proteinase auf Grund des geringeren Proteingehaltes der Nahrung reduziert werden, ist die Abnahme der Mitteldarmdrüse bei gleichzeitig sinkender spezifischer Gesamtproteinase-Aktivität zu erklären. Bei den Tieren der karnivoren Gruppe könnten die Verhältnisse umgekehrt sein. Mit der Reduzierung der Trypsin-Aktivität werden, als Reaktion auf die energiereichere, gehaltvollere Nahrung, gleichzeitig in einem größeren Spektrum zum Beispiel zytosolische und lysosomale Proteinase und somit Cathepsine benötigt. Die reichhaltige Nahrung ermöglicht die Speicherung von Reservestoffen. In diesem Sinne steigt die spezifische Gesamtproteinase-Aktivität und der Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse gleichzeitig an.

Die Hungergruppe ließ ebenfalls eine niedrige Trypsin-Aktivität erkennen. Bei dem geringsten Gewichtsanteil der Mitteldarmdrüse aller Versuchsgruppen zeigte die Gruppe dabei die höchste Aktivität der Gesamtproteinase. Dies läßt sich wie folgt erklären, denn ohne verfügbare Nahrung waren die Tiere gezwungen, die Mitteldarmdrüse für die Mobilisierung von Reservestoffen abzubauen. Bei einem gleichbleibenden Niveau der Gesamtproteinase-Aktivität ist eine Zunahme der spezifischen Proteinaseaktivität die Folge.

Auf der Grundlage dieses Erklärungsmodells könnte die ungewöhnliche Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten bei den Nordseegarnelen *C. crangon* und *C. allmani* unterschiedliche Ernährungszustände einzelner Individuen im biologischen Umfeld bzw. die unterschiedlichen Abundanzen der verfügbaren Nahrung in demselben widerspiegeln.

*C. crangon* ist vor allem ein karnivorer Räuber, dessen Hauptnahrung sich vor allem aus der benthischen In- und Epifauna zusammensetzt. Bevorzugt werden dabei Polychaeten, andere Crustaceen, vor allem Amphipoden und Mysidaceen, aber auch Copepoden und verschiedene Larven, Schnecken und junge Muscheln gefressen (Plagmann 1939, Oh et al. 2001). Darüber hinaus zeigen Mageninhaltsuntersuchungen jedoch auch ein breites Spektrum pflanzlicher Nahrungsbestandteile. So wurden zum Teil in großen Mengen planktische und benthische Kieselalgen und Grünalgen gefunden (Plagmann 1939). Einige Tiere scheinen sich auch über längere Zeiträume nur von Schlick und Detritus zu ernähren. Insgesamt muß *C. crangon* wohl als omnivor mit einer erheblichen Nahrungsbreite eingestuft werden. Pihl & Rosenberg (1984) zeigten, daß die Nahrungszusammensetzung von *C. crangon* sehr starken räumlichen und saisonalen Schwankungen unterliegt. Offensichtlich ist *C. crangon* in der Lage, sich an



unterschiedliche Zusammensetzungen der benthischen Gemeinschaft und an schwankende Abundanzen der verfügbaren Beute in Abhängigkeit verschiedener Sedimenttypen und Jahreszeiten anzupassen (Ansell et al. 1999). Dies erfordert eine gewisse Flexibilität der Ernährungsstrategie, die sich sinnvollerweise in der Fähigkeit der Enzymregulation, wie sie diskutiert wurde, widerspiegeln bzw. durch sie ermöglicht werden könnte. Dies gilt im gleichen Maße für die Garnele *C. allmani*, die weitgehend ein ähnliches Ernährungsverhalten zeigt (Allen 1960).

Es muß erwähnt werden, daß die in den Fütterungsexperimenten aufgezeigten Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten zwar eine Tendenz widerspiegeln, jedoch nicht als signifikant betrachtet werden können. Ausgedehntere Fütterungsexperimente mit einer erheblich höheren Anzahl an Versuchstieren wären sinnvoll, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Das Protein- bzw. das Enzymspektrum ausgewählter Rohextrakte wurde anschließend durch eine Substrat-SDS- und SDS-PAGE dargestellt.

Das Hauptziel der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Rohextrakte bestand darin, mögliche Unterschiede im proteolytischen Enzymspektrum als Reaktion auf das unterschiedliche Nahrungsangebot durch einen Vergleich der Aktivitätsbanden darzustellen. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese verdeutlichen, daß offensichtlich durch den Einfluss karnivorer und herbivorer Nahrung bzw. durch eine Hungersituation bei den untersuchten Arten keine signifikanten Unterschiede im Muster der Aktivitätsbanden hervorgerufen werden. Für die Extrakte, die eine geringe Trypsin-Aktivität hatten, konnten trotz vorhandener Gesamtproteinase-Aktivität in diesem Fall keine deutlichen Aktivitätsbanden identifiziert werden. Hier deutet sich erneut ein methodisches Problem an, daß schon bei der Darstellung der Chromatographie-Fractionen erwähnt wurde. Durch den hohen pH-Wert des Puffersystems bei der Gelelektrophorese können Proteinase mit einem pH-Optimum im sauren Bereich einen Großteil ihrer Aktivität verlieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei den Nordseegarnelen mit geringen Trypsin-Aktivitäten der Hauptteil der Proteinase-Aktivität durch eine oder mehrere Cysteinproteinase/n hervorgerufen wird, die ein pH-Optimum zwischen pH 5,0 und 6,0 zeigen.

Ergänzend zu den bisher gewonnenen Ergebnissen bestätigt die Darstellung der Aktivitätsbanden durch die Substrat-SDS-PAGE jedoch noch einmal, daß die Tiere mit erhöhten Trypsin-Aktivitäten neben der prominenten Trypsinform um 20 kDa ein breites Spektrum von Proteinase besitzen, von denen einige trypsinähnliche Serinproteinase sind.

#### 4.6 Schlußbetrachtung und Ausblick

Die Nordseegarnelen *C. crangon* und *C. allmani* sind vor allem karnivore Räuber und bevorzugen, so lange die natürlichen Bedingungen dies gewährleisten, energetisch hochwertige tierische Nahrung. Darüber hinaus zeichnen sich beide Arten jedoch durch ein breites Nahrungsspektrum aus, daß auch pflanzliche Nahrung einschließt. Diese Nahrungsbreite verdeutlicht die Fähigkeit der Garnelen, sich an wechselnde Ernährungsbedingungen anzupassen. Die dafür notwendige Flexibilität der Ernährungsstrategie könnte durch die Fähigkeit zur Enzymregulation gegeben sein.

Fütterungsexperimente mit der Nordseegarnele *C. crangon* deuten darauf hin, daß die biologische Ursache für die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten bzw. für die wenigen hohen Aktivitäten in einer Anpassung der Tiere an spezifische Ernährungsbedingungen und einer unterschiedlichen enzymatischen Nahrungsnutzung begründet sein könnten.

*C. crangon* zeigte nach rein herbivorer Ernährung mit Mikroalgen eine tendenziell höhere spezifische Trypsin-Aktivität als nach rein karnivorer Ernährung. Der Anstieg der Trypsin-Aktivität könnte als assimilatorische Anpassung an die pflanzliche Nahrung verstanden werden, bei der der geringe Proteingehalt der Algen durch eine hohe Enzymaktivität bei gleichzeitig hoher Ingestionsrate und kurzer Retentionszeit der Nahrung kompensiert wird.

Im Gegensatz dazu könnte die geringere Trypsin-Aktivität bei der Verwertung energetisch hochwertiger tierischer Nahrung durch verlängerte Retentionszeiten der Nahrung kompensiert werden.

Um die in dieser Arbeit aufgezeigten Tendenzen und das daraus abgeleitete Erklärungsmodell zu bestätigen, sind weiterführende Versuche zum Einfluss qualitativ unterschiedlicher Nahrung notwendig. Darüber hinaus müßten weitere mögliche biologische Ursachen für die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten der Nordseegarnelen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten, berücksichtigt werden.

- Welchen Einfluss haben zum Beispiel natürliche endogene und exogene Inhibitoren auf die Enzymaktivität und wie werden sie reguliert ?
- Wird die Enzymaktivität möglicherweise durch physiologische Veränderungen, im Zuge der Reproduktion, beeinflusst?
- Welche Rolle spielen eventuell hormonelle Regulationsmechanismen?

Auf der Grundlage der ungewöhnlichen Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Trypsin-Aktivitäten und den daraus resultierenden Fragestellungen könnten die Nordseegarnelen *C. crangon* und *C. allmani* als Modellorganismen für die Untersuchung zur Expression von Serinproteinase bei Crustaceen dienen.

Ergänzend zu den in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen und qualitativen enzymatischen Untersuchungen der Gesamtproteinase sowie einzelner Proteinase und Peptidasen sollten weitere Verdauungsenzyme der Nordseegarnelen untersucht werden. Insbesondere im Hinblick auf cathepsinähnliche Cysteinproteinase, die den Großteil der Gesamtproteinase-Aktivität bilden, sind weiterführende enzymatische Untersuchungen nötig.

Neben den Nordseegarnelen wäre es erstrebenswert, andere Arten in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Bei der zunehmenden Bedeutung mariner Aquakulturtechnologien wäre es hilfreich, auf der Grundlage von Erkenntnissen über das verdauungsphysiologische Potential der Nordseegarnelen und das anderer Arten Hinweise über mögliche ökologische Bedürfnisse der Arten zu erhalten. Diese Hinweise könnten bei der Auswahl geeigneter Zuchtorganismen für die Aquakultur sowie bei der Optimierung bestehender Anlagen hilfreich sein.



## 5. Zusammenfassung

Die Nordseegarnele *C. crangon* nimmt in der Nordsee vor allem im Wattenmeer eine zentrale ökologische Rolle ein. Nach *C. crangon* ist die nahverwandte Garnele *C. allmani* die zweithäufigste Art der Gattung in der Nordsee. Beide Arten sind in der Lage sich an unterschiedliche Zusammensetzungen der benthischen Gemeinschaft und an wechselnde Ernährungsbedingungen anzupassen. Über die ernährungsphysiologischen Grundlagen dieser Anpassungsfähigkeit ist jedoch nur sehr wenig bekannt.

Vorläufige Untersuchungen an der Nordseegarnele *C. crangon* und *C. allmani* ergaben ungewöhnlich geringe Trypsin-Aktivitäten bei gleichzeitig relativ hoher Gesamtproteinase-Aktivität. Trypsin ist bei den meisten dekapoden Crustaceen das proteolytische Hauptverdauungsenzym und wird i.a. in großen Mengen und häufig in mehreren Isoformen synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden an Mitteldarmdrüsenextrakten der dekapoden Garnelen *C. crangon* und *C. allmani* quantitative und qualitative Untersuchungen proteolytischer Verdauungsenzyme durchgeführt. Nachdem die Reaktionsbedingungen des Testverfahrens optimiert wurden, wurde die Aktivität der Gesamtproteinase quantifiziert. Es konnte zunächst bestätigt werden, daß die Nordseegarnelen eine hohe spezifische Proteinase-Aktivität aufwiesen, wie sie für zahlreiche dekapode Crustaceen typisch ist. Im Vergleich mit verschiedenen anderen Crustaceen ergaben sich keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Der überwiegende Teil dieser Proteinase-Aktivität wurde jedoch durch Cysteinproteinasen hervorgerufen, während kaum ein Anteil an Serinproteinasen zu verzeichnen war.

Im Anschluß erfolgte die Quantifizierung der Trypsin-Aktivität. Im Vergleich mit den anderen Crustaceen-Arten, für die eine vergleichbar hohe Aktivität der Gesamtproteinase festgestellt wurde, zeigten *C. crangon* und *C. allmani* ungewöhnlich geringe spezifische Trypsin-Aktivitäten. Anhand einer für beide Arten aufgestellten Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Trypsin-Aktivitätsniveaus wurde deutlich, daß der Großteil der untersuchten Tiere sehr niedrige Trypsin-Aktivitäten aufwies.

Einige wenige Tiere beider Arten hatten jedoch erhöhte, zum Teil beträchtlich hohe Aktivitäten.

Die Untersuchung chromatographisch aufgetrennter Mitteldarmdrüsenextrakte von Tieren mit geringer spezifischer Trypsin-Aktivität bestätigte die Ergebnisse der quantitativen Enzymbestimmungen. Die Chromatogramme beider Arten zeigten eine ausgeprägte Proteinase-Aktivität und ein ähnliches Eluierungsmuster der Proteinasen. Durch den Cysteinproteinaseinhibitor E 64 konnte insbesondere in den Fraktionen maximaler Proteinase-Aktivität bis zu 90 % der Aktivität inhibiert werden, während der Serinproteinaseinhibitor AEBSF die Proteinase-Aktivität kaum beeinflusste. Ergänzend zu dem hohen Anteil der

Cysteinproteinasen trat in den Chromatogrammen bei beiden Arten eine ausgeprägte Cathepsin-L-Aktivität auf.

In Extrakten von *C. crangon* und *C. allmani* mit hoher spezifischer Trypsin-Aktivität konnte sowohl eine deutliche Trypsin-Aktivität als auch eine Chymotrypsin-Aktivität aufgetrennt und analysiert werden.

Durch eine SDS-Gelelektrophorese konnten Proteinase in einem Größenbereich zwischen 18 und 48 kDa aufgetrennt werden. Der Großteil der Gesamtproteinase-Aktivität in Extrakten mit geringen Trypsin-Aktivitäten wurde durch eine Cysteinproteinase von 21 kDa repräsentiert. In Extrakten mit erhöhten Trypsin-Aktivitäten konnte für beide Arten eine Trypsinform von 20 kDa identifiziert werden. Desweiteren konnten in diesen Extrakten insgesamt sieben weitere trypsinähnliche Serinproteinase nachgewiesen werden, von denen wahrscheinlich drei Chymotrypsinformen sind.

Anhand von Fütterungsexperimenten wurde der Einfluss qualitativ unterschiedlicher Nahrung auf die Zusammensetzung des proteolytischen Enzymspektrums von *C. crangon* untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Ursache für die ungewöhnlich geringen Trypsin-Aktivitäten bzw. für die wenigen hohen Aktivitäten in einer Anpassung der Tiere an spezifische Ernährungsbedingungen und einer unterschiedlichen enzymatischen Nahrungsnutzung begründet sein könnten.

*C. crangon* zeigte nach rein herbivorer Ernährung mit Mikroalgen eine tendenziell höhere spezifische Trypsin-Aktivität, als nach rein karnivorer Ernährung. Der Anstieg der Trypsin-Aktivität könnte als enzymatische Anpassung an die pflanzliche Nahrung verstanden werden, bei der der geringe Proteingehalt der Algen durch eine hohe Enzymaktivität bei gleichzeitig hoher Ingestionsrate und kurzer Retentionszeit der Nahrung kompensiert wird.

Im Gegensatz dazu könnte die geringere Trypsin-Aktivität bei der Verwertung energetisch hochwertiger tierischer Nahrung durch verlängerte Retentionszeiten der Nahrung kompensiert werden. Diese Fähigkeit zur Anpassung der Enzymaktivitäten an wechselnde Ernährungsbedingungen könnte die Grundlage für eine hohe Flexibilität der Ernährungsstrategie und damit eine Erklärung für das breite Nahrungsspektrum der Nordseegarnelen sein.

## 6. Literatur

- Aasgeirsson B, Bjarnason JB (1991) Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp Biochem Physiol B* 99: 327-335.
- Allen JA (1960) On the biology of *Crangon allmani* Kinahan in Northumberland waters. *J Mar Biol Assoc UK* 39: 481-508.
- Anger K (1988) Growth and elemental composition (C, N, H) in *Inachus dorsettensis* (Decapoda: Majidae) larvae reared in the laboratory. *Mar Biol* 99: 255-260.
- Ansell AD, Comely CA, Robb L (1999) Distribution, movements and diet of macrocrustaceans on a Scottish sandy beach with particular reference to predation on juvenile fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 176: 115-130.
- Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K (1982) L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E 64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* 201: 189-198.
- Beukema JJ (1992) Dynamics of juvenile shrimp *Crangon crangon* in a tidal-flat nursery of the Wadden Sea after mild and cold winters. *Mar Ecol Prog Ser* 83: 157-165.
- Blahudka S, Türkay M (2002) A population study of the shrimp *Crangon allmani* in the German Bight. *Helgol Mar Res* 56: 190-197.
- 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.
- Brun GL, Wojtowicz MB (1976) A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab *Cancer borealis* and rock crab *Cancer irroratus*. *Comp Biochem Physiol B* 53: 387-391.
- Ceccaldi HJ (1997) Anatomy and physiology of digestive system. In: *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture* (D'Abramo LR, Conklin DE, Akiyama DM eds) 6: 261-291. World Aquaculture Society, Louisiana.
- Ceccaldi HJ (1998) A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Rev Fish Sci* vol 6 (1-2): 13-39.
- Dall W, Moriarty DJW (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. In: *The Biology of Crustacea 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*: 215-261.
- Degkwitz E (1957) Ein Beitrag zur Natur der proteolytischen Verdauungsfermente bei verschiedenen Crustaceenarten. *Veröffentl Inst Meeresf Bremerhaven* 5: 1-13.
- Dittrich B (1992) Comparative studies on the thermal properties of a trypsin-like protease in two hermit crabs. *Helgol Meeresunters* 46: 45-52.
- Doke SN, Ninjoor V (1987) Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *J Food Sci* 52: 1203-1208.
- Eisen AZ, Henderson KO, Jeffrey JJ, Bradshaw RA (1973) A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator*. Purification and properties. *Biochemistry* 12: 1814-1822.
- Galgani F, Nagayama F (1988) Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryon affinis* and *Chionoecetes japonicus*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 54: 983-987.
- García-Carreño FL, Dimes LE, Haard NF (1993) Substrate-Gel Elektrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal Biochem* 214: 65-69.
- García-Carreño FL, Haard NF (1994) Preparation of an exopeptidase-enriched fraction from hepatopancreas of decapods. *Process Biochem* 29: 663-670.
- García-Carreño FL, Carrillo O, Angeles Navarrete Del Toro M (1998). Control of digestive functions in shrimp, I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopancreas. In: *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress* (Schramm FR, von Vaupel Klein JC eds) 1: 915-922.
- García-Carreño FL, Navarrete del Toro A, Ezquerro M (1997) Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J Mar Biotechnol* 55: 36-40.
- García-Carreño FL (1992) The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp Biochem Physiol B* 103: 575-578.

- García-Carreño FL, Hernández-Cortés MP, Haard NF (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J Agric Food Chem* 42: 1456-1461.
- Geiger R, Fritz H (1988) Chymotrypsin. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer HU ed): 119-129. Verlagsgesellschaft Chemie, Weinheim.
- Gibson R, Barker PL (1979) The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 17: 285-346.
- Gimenez AVF, García-Carreño FL, Del Toro MAN, Fenucci JL Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comp Biochem Physiol* 130: 331-338.
- Guillaume J, Ceccaldi HJ (2001) Digestive physiology of shrimps. In: *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*: 239-252.
- Hernández-Cortés MP (1993) Chymotrypsin and collagenase activity in langostilla *Pleuroncodes planipes* (Decapoda). BS Thesis Universidad Autonoma de Baja California Sur Mexico.
- Hernández-Cortés MP (1997) Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Dekapoda). *J Food Biochem* 21: 497-514.
- Honjo I, Kimura S, Nonaka M (1990) Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 56: 1627-1634.
- Johnston IA, Walesby NJ, Davison W, Goldspink G (1975) Temperature adaptation in myosin of Antarctic fish. *Nature Lond* 254: 74-75.
- Jones DA, Kumlu M, Le Vay L, Fletcher DJ (1997) The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155: 289-299.
- Katunuma N, Kominami E (1995) Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol* 251: 382-397.
- Keil B (1971) Trypsin. In: *The Enzymes* (Boyer PD ed): 249-275. Academic Press, New York.
- Kleine R (1967) Vorkommen und Eigenschaften der proteolytischen Enzyme des Magensaftes und der Mitteldarmdrüse des Flusskrebse *Astacus astacus* (L.) und *Cambarus affinis* (Say). 2. Endopeptidasen. *Z Vergl Physiol* 55: 51-69.
- Kominami E, Ueno T, Muno D, Katunuma N (1991) The selective role of cathepsins B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS Lett* 287: 189-192.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Lond* 227: 680-685.
- Laycock MV, Hiram T, Hasnain S, Watson D, Storer AC (1989) Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochem J* 263: 439-444.
- Le Boulay C, Van Wormhoudt A, Sellos D (1996) Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *J Comp Physiol* 166: 310-318.
- Le Moullac G, Klein B, Sellos D, Van Wormhoudt A (1997) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha - amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J Exp Mar Biol Ecol* 208: 107-125.
- Le Vay L, Jones DA, Puello-Cruz AC, Sangha RS, Ngamphongsai C (2001) Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp Biochem Physiol A* 128: 621-628.
- Le Vay L, Rodriguez A, Kamarudin MS, Jones DA (1993) Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture* 118: 287-297.
- Markwardt F, Drawert J, Walsmann P (1974) Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein. *Biochem Pharmacol* 15, 23 (16): 2247-2256.
- Murthy RC, Saxena P (1979) Trypsin activity in the hepatopancreas of *Macrobrachium lamarrei* (Crustacea: Decapoda). *Experientia* 35 (6): 789-790.
- Oh CW, Hartnoll RG, Nash RDM (2001) Feeding ecology of the common shrimp *Crangon crangon* in Port Erin Bay, Isle of Man, Irish Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 214: 211-223.
- Osnes KK, Mohr V (1985) On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp Biochem Physiol B* 82: 607-619.



- Pihl L, Rosenberg R (1984) Food selection and consumption of the shrimp *Crangon crangon* in some shallow marine areas in western Sweden. *Mar Ecol Prog Ser* 15: 159-168.
- Plagmann J (1939) Ernährungsbiologie der Garnele (*Crangon vulgaris* Fabr.). *Helgol Wiss Meeresunters* 2: 113-162.
- Redant F (1984) An indexed bibliography on the common shrimp, *Crangon crangon* (L.), complementary to Tiews, 1967. *Int Counc Explor Sea Comm Meet (Shellfish Comm) K:2*: 1-34.
- Rehm H (2002) Bradford-Test. In: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*: p 5. Spektrum Akad Verl, Heidelberg-Berlin.
- Reise K (1978) Experiments on epibenthic predation in the Wadden Sea. *Helgol Wiss Meeresunters* 31: 55-101.
- Shaw E, Glover G (1970) Further observation on substrat-derived chloromethyl ketones that inactivate trypsin. *Arch Biochem Biophys* 139 (2) : 298-305:
- Speck U, Ulrich K (1969) Der Abbau körpereigener Substanzen in dem Flusskrebs *Orconectes limosus* während des Hungerns. *Z Vergl Physiol* 63: 410-414.
- Spilliaert R, Gudmundsdóttir A (1999) Atlantic cod trypsin Y-member of a novel trypsin group. *Mar Biotechnol* 1: 598-607.
- Stryer L (1996) *Biochemie*. Spektrum Akad Verl, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1125 pp.
- Tiews K (1970) Synopsis of biological data on the common shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758). *FAO Fish.Rep* 4, 57: 1167-1224.
- Tsai I, Chuang K, Chuang J (1986) Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp Biochem Physiol B* 85: 235-239.
- van der Veer HW, Feller RJ, Weber A, Witte JI (1989) Importance of predation by crustaceans upon bivalve spat in the intertidal zone of the Dutch Wadden Sea as revealed by immunological assays of gut contents. *J Exp Mar Biol Ecol* 231 (1): 139-157.
- van Wormhoudt A, Chevalier P, Sellos D (1992) Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine. protease with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol B* 103: 675-680.
- Visessanguan W, Benjakul S, An H (2003) Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. *Comp Biochem Physiol B* 134: 477-487.
- Zwilling R, Pfeleiderer G, Sonneborn H, Kraft V, Stucky I (1969) The evolution of endopeptidases. 5. Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. *Comp Biochem Physiol* 28: 1275-1287.