

**Wege der Temperaturanpassung bei marinen Crustaceen aus
verschiedenen Klimazonen:**

**Mechanismen der qualitativen und quantitativen Enzymregulation am
Beispiel der Citratsynthase**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Reinhold Müller

aus Nieder-Ramstadt

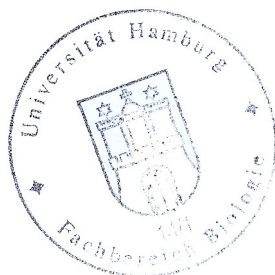
Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. F. BUCHHOLZ

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. D. SIEBERS

Tag der Disputation: 17. Januar 2003

Hamburg, den 03. Januar 2003



A handwritten signature in blue ink, reading "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Für Nele (irgendwann wirst Du hoffentlich verstehen kleine Maus)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	V
II.	Abkürzungen	IX
III.	Einleitung	1
IV.	Material und Methoden	4
IV.1	Tiermaterial	4
IV.1.3	<i>Cheirimedon femoratus</i>	4
IV.1.4	<i>Djerboa furcipes</i>	4
IV.1.2	<i>Serolis polita</i>	4
IV.1.1	<i>Euphausia superba</i>	4
IV.1.5	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)	4
IV.1.6	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (med.)	5
IV.1.7	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	5
IV.1.8	Hälterung von <i>X. kroyeri</i>	5
IV.2	Material	6
IV.2.1	Sonstige Materialien	7
IV.2.2	Chemikalien	7
IV.2.3	Enzyme	8
IV.2.4	Antikörper	8
IV.3	Methoden	9
IV.3.1	Citratsynthase-Charakterisierung	9
IV.3.1.1	Chromatographie	9
IV.3.1.2	Enzymkinetik	12
IV.3.1.3	Proteinfällung und Proteinbestimmung	13
IV.3.2	Elektrophoresetechniken (Davis, 1964; Andrews, 1992)	14
IV.3.2.1	Puffer und Lösungen	14
IV.3.2.2	Zusammensetzung der Gele	15
IV.3.2.3	Molekulargewichtsmarker:	15
IV.3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Ornstein, 1964)	16
IV.3.3	Proteinfärbungen	17
IV.3.3.1	Coomassie Blue Färbung (Wilson, 1979)	18
IV.3.3.2	Silberfärbung (Wray, 1981)	18
IV.3.4	Proteintransfer mittels Elektroblob (Western Blotting)	19
IV.3.4.1	Lösungen:	19
IV.3.4.2	Ausgangssituation vor dem Elektroblob	20
IV.3.4.3	Durchführung des Elektroblobs	20

IV.3.5	Immunoblot (Towbin, 1984)	21
IV.3.5.1	Puffer und Lösungen	21
IV.3.5.2	Durchführung des Immunoblots	21
IV.3.6	Dot-Blot (Hawkes, 1982; Moeremans, 1984; Towbin, 1984).....	22
IV.3.6.1	Durchführung des Dot-Blots	22
IV.3.7	Gewinnung von Antikörpern (Harlow, 1988; Peters, 1990).....	22
IV.3.7.1	Immunisierung von Kaninchen.....	22
IV.3.7.2	Beeinflussung der Immunantwort durch Adjuvantien.....	22
IV.3.7.3	Klassische Adjuvantien: cFA/iFA	23
IV.3.7.4	Immunisierungsschema	23
IV.3.8	SAS-Fällung (gesättigte Ammoniumsulfatfällung)	23
IV.3.8.1	Vorgehen bei der SAS-Fällung.....	24
IV.3.9	ELISA (Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test)	25
IV.3.9.1	Puffer und Lösungen	25
IV.3.9.2	Verdünnungen	25
IV.3.9.3	Vorgehen beim ELISA	26
IV.3.10	HSP-Aufarbeitung bei <i>X. kroyeri</i>	26
IV.3.11	Statistische Auswertung.....	27
V.	Ergebnisse	28
Teil I:	Qualitative Bestimmung der Citratsynthase	28
V.1	Charakterisierung der Citratsynthase.....	28
V.1.1	Aufreinigung der Citratsynthase über FPLC-Säulen	28
V.1.1.1	QSepharoseHP-Lauf von <i>E. superba</i>	29
V.1.1.2	Superdex-Lauf von <i>E. superba</i>	30
V.1.1.3	ResourceQ-Lauf von <i>M. norvegica</i> (med. und katt.)	31
V.1.1.4	Superdex-Lauf von <i>M. norvegica</i> (med. und katt.).....	32
V.1.1.5	ResourceQ-Lauf von <i>X. kroyeri</i>	33
V.1.1.6	Superdex-Lauf von <i>X. kroyeri</i>	34
V.1.1.7	ResourceQ-Lauf von <i>C. femoratus</i>	35
V.1.1.8	Superdex-Lauf von <i>C. femoratus</i>	36
V.1.1.9	ResourceQ-Lauf von <i>D. furcipes</i>	37
V.1.1.10	Superdex-Lauf von <i>D. furcipes</i>	38
V.1.1.11	ResourceQ-Lauf von <i>S. polita</i>	39
V.1.1.12	Superdex-Lauf von <i>S. polita</i>	40
V.2	Molekulargewichtsbestimmung der Citratsynthase der untersuchten Crustaceen mit Hilfe der Eichkurve der Superdex-Säule	42

V.3	Molekulargewichtsbestimmung der Citratsynthase anhand der R_f -Werte nach SDS-PAGE (Neville, 1971).....	44
V.4	Enzymkinetiken	46
V.4.1	Aktivierungsenergie und Kinetiken	46
V.4.1.1	Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A	47
V.4.1.2	Bestimmung der Kinetiken.....	47
V.4.1.2.1	Bestimmung der maximalen Substratumsatzrate V_{max}	47
V.4.1.2.2	Bestimmung der Inhibitor kinetik K_i	48
V.4.1.2.3	Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik K_M	49
V.4.1.2.4	Bestimmung des Temperaturoptimums	51
V.4.1.2.5	Hitzestabilitätsuntersuchungen der CS aller untersuchten Crustaceen	53
V.4.2	Lineweaver-Burk- und Michaelis-Menten-Diagramme der CS-Kinetiken unter dem Einfluß von ATP der untersuchten Crustaceen	55
Teil II:	Quantitative Bestimmung der Citratsynthase	58
V.5	Resultate der Immunisierung eines Kaninchens mit aufgereinigter CS von <i>E. superba</i>	58
V.5.1	Immunisierungseffizienz	58
V.5.2	IgG-Aufreinigung	59
V.5.3	Dot-Blot der einzelnen Fraktionen der Protein A-Säule	60
V.5.4	Immunoblot nach SDS-PAGE verschiedener getesteter CS	61
V.6	ELISA zur Bestimmung der CS-Mengen	62
V.6.1	Bestimmung der Enzymmenge der CS.....	62
Teil III:	Untersuchung des Hälterungsstress bei <i>X. kroyeri</i> mittels HSP 70-Bestimmung	64
V.7	Bestimmung der HSP 70-Menge bei <i>X. kroyeri</i>	64
V.7.1	Bestimmung des Molekulargewichtes des HSP 70 mit Hilfe der R_f -Werte nach der SDS-PAGE.....	67
V.8	Vergleich der HSP 70-Menge mit der CS-Menge und V_{max} von <i>X. kroyeri</i>	68
V.9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
VI.	Diskussion	75
VI.1	Methodendiskussion	76
VI.1.2	Vergleichsansatz.....	81

VI.2	Biologischer Vergleich	83
VI.2.1	Untersuchte Crustaceen	83
VI.3	Diskussion der Ergebnisse des biologischen Vergleiches	86
VI.4	Schlußbetrachtung.....	96
VII.	Zusammenfassung	97
VIII.	Literaturverzeichnis.....	100
	Danksagung	100
	Wissenschaftlicher Werdegang	112

II. Abkürzungen

Ø	Durchmesser
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)] Diammoniumsalz
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AgNO ₃	Silbernitrat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserum Albumin)
cFA	komplettes Freundsches' Adjuvans
CH ₃ OH	Methanol
Cl ⁻ -Ionen	Chlorid-Ionen
CS	Citratsynthase
CW	Küstennahe Wassermassen
DTNBA	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreit
E _A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
g	Erdbeschleunigung 9,81 ms ⁻²
G ₂₅	G ₂₅ -PD10-FPLC-Säulen
GaR	Ziege gegen Kaninchen (Goat anti Rabbit)
Gly ⁺ -Ionen	Glyzinat-Ionen
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	Doppelt destilliertes Wasser
HCl _{konz.}	Konzentrierte Salzsäure (37 %)
HMW	Molekulargewichtsmarker (High Molecular Weight)
HSP	Hitzeschockprotein (Heat Shock Protein)
iFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
K _i	inhibitorische Michaelis-Konstante
K _M	Michaelis-Konstante
kn	Knoten
LMW	Molekulargewichtsmarker (Low Molecular Weight)
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere

min	Minute
M_r	Relatives Molekulargewicht
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
$NaCl$	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
Na_2HPO_4	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaN_3	Natriumazid
$NaOH$	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH_3	Ammoniaklösung
NH_4NO_3	Ammoniumnitrat
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RaCS	Kaninchen gegen Citratsynthase (Rabbit anti Citratesynthase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SACW	Zentrale Wassermassen des Südatlantik
SAS	Ammoniumsulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyle Sulfate)
sec	Sekunde
sm	Seemeilen
TEMED	N,N,N',N' -Tetraethylethylendiamin
Tricin	N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TW	Tropische Wassermassen
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VF	Verdünnungsfaktor
V_{max}	Maximale Enzymsatzgeschwindigkeit

III. Einleitung

Die Temperatur spielt in der Biologie als abiotischer Faktor eine Schlüsselrolle, da sie entscheidenden Einfluß auf den Geschwindigkeitsablauf biochemischer Reaktionen hat. Tiere, die unter ständig wechselnden oder extremen Temperaturbedingungen leben (gemäßigte Breiten, bzw. Antarktis, Tropen), müssen besondere Anpassungsmechanismen entwickelt haben, um diese Bedingungen tolerieren zu können. Vor allem poikilotherme Tiere müssen ihren Stoffwechsel entsprechend den jeweils vorherrschenden Temperaturen anpassen.

Eine Möglichkeit der Anpassung besteht darin, die Effekte niedriger Temperaturen zu kompensieren. So ist ein Indikator für den Stoffwechselumsatz bei Tieren die Respirationsrate. Es ist bekannt, daß Fische aus unterschiedlichen Klimazonen einen annähernd gleichen Sauerstoffverbrauch bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen aufweisen (Hochachka & Somero, 1984). Dies bedeutet sowohl für tropische als auch für polare Tiere, daß sie bei ihren ambienten Temperaturen annähernd die gleichen physiologischen Leistungsfähigkeiten besitzen.

Eine solche Anpassung kann nur über Stoffwechselvorgänge ablaufen, die durch Enzyme katalytisch reguliert werden. Um einzelne Stoffwechselvorgänge genauer zu untersuchen, befaßt man sich am besten mit denjenigen Enzymen, die in den Stoffwechselwegen Schlüsselrollen einnehmen. Ein solches Enzym ist die Citratsynthase (CS, EC 4.1.3.7), als ein essentielles Enzym des aeroben Stoffwechsels. Die CS leitet den Citratzyklus ein (Krebs, 1970; Srere, 1972) und katalysiert die Aldolkondensation von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat zu Citrat (Wiskich, 1980).

In verschiedenen Studien wurde die CS (Vetter, 1995a/b; Vetter und Buchholz, 1997; Buchholz und Saborowski, 2000; Salomon und Buchholz, 2000; Saborowski und Buchholz, 2002) untersucht, um genauere Informationen über die Kinetik und das Temperaturverhalten des Enzyms bei Tieren aus verschiedenen Klimazonen zu erhalten.

Die Aktivität der CS wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Es sind dies die kompetitive Inhibition durch Adenosin 5' Triphosphat (ATP) (Greenblatt, 1973) bzw. bei einigen Organismen die Aktivierung durch ATP. ATP ist maßgeblich beteiligt an der Kontrolle des Energiegehaltes der Zelle indem die CS-Acetyl-CoA-Reaktion reguliert wird (Hofmann, 1979). Desweiteren wird die CS über die Variation der Aktivierungsenergie (E_A), die Enzym-Substrat-Affinität und die spezifische Aktivität des Enzyms (Vetter, 1995a/b) reguliert.

Eine Regulation der spezifischen Aktivität geschieht dabei entweder über Veränderungen am Enzym selbst, um die Katalyserate zu erhöhen oder über die Variation der Enzymmenge. Die Enzymmenge müßte dann bei niedriger Umgebungstemperatur erhöht werden, um dieselbe Leistungsfähigkeit wie bei höherer Umgebungstemperatur zu erreichen. Somit läßt sich auch umgekehrt, über die Enzymaktivität, ein entsprechender Leistungsbedarf ermitteln.

Um solche Regulationsmechanismen und die Leistungsfähigkeit beispielhaft feststellen zu können, wurden Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen ausgewählt. Dazu wurden drei Extreme nämlich gemäßigte, polare und tropische Tiere direkt miteinander verglichen. Als zusätzliches Auswahlkriterium für die Leistungsfähigkeit der Krebse galt ihre unterschiedliche Lebensweise benthisch, benthopelagisch und pelagisch, um ein möglichst breites Vergleichsspektrum zu erhalten. Dadurch war es möglich die Effekte verschiedener Lebensweisen und Temperaturregime zu untersuchen.

Im einzelnen handelte es sich um folgende Crustaceen:

Pelagisch: Der antarktische Krill *Euphausia superba* sowie der nordische Krill *Meganyctiphanes norvegica* aus dem Kattegat und aus dem Mittelmeer.

Benthopelagisch: Die subtropische penaeide Garnele *Xiphopenaeus kroyeri*.

Benthisch: Der antarktische Isopode *Serolis polita* sowie die antarktischen Amphipoden *Djerboa furcipes* und *Cheirimedon femoratus*.

Als gemäßigter benthopelagischer Vergleichsorganismus wurde der von Salomon (2000) untersuchte Isopode *Idotea baltica* herangezogen (s. VI.2).

In den bisherigen Arbeiten über die Enzymkinetik von Crustaceen und deren Metabolismus (z. B.: Vetter, 1995a/b; Vetter und Buchholz, 1997; Salomon und Buchholz, 2000; Saborowski und Buchholz 2002) wurden wegen der fehlenden Methodik keine quantitativen Enzymbestimmungen der CS durchgeführt. Um dieses fehlende Glied in den bisher nur qualitativen CS-Untersuchungen zu schließen, wurde zur Bestimmung der Enzymmenge in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Antikörper-Antigen-Detektionssystem auf der Basis einer enzymgekoppelten Untersuchung (ELISA) eingeführt. Mit dieser Methode wurde geklärt, ob die spezifische Enzymaktivität der CS über die Menge des Enzyms an klimatisch bedingte Veränderungen angepaßt wird.

Dazu wurde ein polyklonaler Antikörper (pAk), gerichtet gegen die CS von *E. superba*, hergestellt, indem ein Kaninchen mit aufgereinigter CS von *E. superba* immunisiert wurde. Die von dem Kaninchen produzierten Antikörper, gerichtet gegen die CS von *E. superba*, wurden durch Blutentnahme gewonnen und chromatographisch aufgereinigt. Die so erhaltenen IgG wurden zur quantitativen Ausfällung der einzelnen CS aus den unterschiedlichen Crustaceenarten verwendet. Mit Hilfe von Standard-CS wurde die exakte Enzymmenge anhand der ausgefällten CS bestimmt.

In einem weiteren Ansatz wurden die temperaturabhängigen Charakteristika der CS untersucht. Dazu wurde das Enzym extrahiert, chromatographisch getrennt und angereichert. Die Bestimmung der kinetischen Parameter, Temperaturoptima und der spezifischen Aktivität diente wiederum zum intra- als auch interspezifischen Vergleich der untersuchten Crustaceenarten.

Die exakte Bestimmung der Enzymmengen der CS ermöglichte es festzustellen, ob bei den untersuchten Crustaceen bei niedrigeren Temperaturen eine Regulation durch Erhö-

hung der Enzymmenge erfolgte (quantitative Strategie) oder das vorhandene Enzym in seinen katalytischen Eigenschaften verändert wurde (qualitative Strategie).

Zusätzlich zu den kinetischen Parametern wurde bei *X. kroyeri* die Menge an HSP 70 bestimmt, das in direkter Korrelation zum Temperaturstreß steht. Bei den Euphausiiden, Amphipoden und Isopoden war dies nicht möglich, da keiner der getesteten Antikörper HSP detektieren konnte.

HSP 70 übernimmt gemeinsam mit ATP die Schutzfunktion für hitzestressierte Peptide und löst die Faltung eines denaturierten Peptides unter Verbrauch von ATP aus (Minami, 1996; Koziol, 1997).

ATP wird von HSP 70 wie in einem Schutzmantel (Chaperonfunktion des HSP 70) vor thermischer Denaturierung geschützt und spielt eine entscheidende Rolle bei der kompetitiven Hemmung und damit der Regulation der CS.

Insbesondere stellt sich die Frage, inwieweit der Hitzestreß und der allgemeine Streß bei den Hälterungsversuchen einen Einfluß auf die Einstellung der $V_{\max}$ von *X. kroyeri* ausübt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Temperaturanpassung bei marinen Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen unter Berücksichtigung sowohl qualitativer als auch quantitativer Strategien und Mechanismen der Enzymregulation am Beispiel der Citratsynthase darzustellen.

IV. Material und Methoden

IV.1 Tiermaterial

Die folgenden antarktischen, tropischen und aus den gemäßigten Breiten stammenden Crustaceen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Tiere wurden sofort nach dem Fang bzw. nach den entsprechenden Hälterungsexperimenten bei -80°C eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt.

IV.1.3 *Cheirimedon femoratus*

Der benthisch lebende, antarktische Amphipode *Cheirimedon femoratus* Pfeffer (Crustacea, Amphipoda, Lysianassidae), aus der Admiralty Bay, King George Island, Süd-Shetland-Inseln. Er wurde im Südsommer 1991/1992 an der Arctowski Pier der polnischen Antarktisstation mit einer Reuse gefangen.

IV.1.4 *Djerboa furcipes*

Der ebenfalls benthisch lebende, antarktische Amphipode *Djerboa furcipes* Chevreux (Crustacea, Amphipoda, Eusiridae), aus der Admiralty Bay, King George Island, Süd-Shetland-Inseln. Er wurde im Südsommer 1991/1992 an der Arctowski Pier der polnischen Antarktisstation mit einer Reuse gefangen.

IV.1.2 *Serolis polita*

Der benthisch lebende, antarktische Isopode *Serolis polita* Pfeffer (Crustacea, Isopoda, Fabellifera), stammte ebenfalls aus der Admiralty Bay, King George Island, Süd-Shetland-Inseln. Er wurde im Südsommer 1991/1992 bei der brasilianischen Antarktisstation „Commandante Ferraz“ von Tauchern aus 2-4 m Tiefe per Hand gesammelt.

IV.1.1 *Euphausia superba*

Der antarktische Krill *Euphausia superba* Dana (Crustacea, Euphausiacea, Euphausiidae), wurde im Südsommer 1991/1992 in der Admiralty Bay, King George Island, Süd-Shetland-Inseln gefangen. Als Fanggerät diente ein Ringtrawl mit einer Öffnung von 1 m^2 und einer Maschenweite von $500\text{ }\mu\text{m}$, das von einem kleinen Stationsboot mit 0,8-1 kn geschleppt wurde.

IV.1.5 *Meganyctiphanes norvegica* (katt.)

Der nordische Krill *Meganyctiphanes norvegica* (katt.) M. Sars (Crustacea, Euphausiacea, Euphausiidae) wurde im nördlichen Kattegat südöstlich der Insel Læsø im Juli 1993 während einer Forschungsreise mit „FS Heincke“ mittels eines Ringtrawls (1 m^2 Öffnung und $500\text{ }\mu\text{m}$ Maschenweite) gefangen.

IV.1.6 *Meganctiphanes norvegica* (med.)

Der mediterrane Vertreter des nordischen Krills *Meganctiphanes norvegica* (med.) M. Sars (Crustacea, Euphausiacea, Euphausiidae) stammt aus der Ligurischen See. Er wurde im Mai 1994 während einer Forschungsreise mit „FS Poseidon“ im Mittelmeer 5-20 sm vor der Küste Südfrankreichs, mittels eines Ringtrawls mit einer Öffnung von 1 m² und einer Maschenweite von 500 µm gefangen.

IV.1.7 *Xiphopenaeus kroyeri*

Die subtropische Garnele *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae) wurden im November 1993 und 1997, während eines Forschungsaufenthalts an der Meeresstation des Instituto Ozeanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) in Ubatuba an der Südküste Brasiliens, mit dem dortigen Forschungskutter „FS Veliger“ gefangen. Als Fanggerät diente ein Grundschieppnetz mit einer Öffnung von 3 m² und einer Maschenweite von 24 mm, das mit 1 kn für 10 min geschleppt wurde.

IV.1.8 *Hälterung von X. kroyeri*

Die Tiere wurden nach dem Fang in 200 l fassenden Wassertanks mit filtriertem (0,2 µm Porengröße) Seewasser gehältert, um ihnen eine Erholung vom Fangstreß zu ermöglichen. Nach 4 h wurde dann mit den eigentlichen Hälterungsversuchen begonnen. Dabei wurden Hälterungsserien bei 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C und 32 °C (t16, t20, t24, t28, t32) durchgeführt. Als Zeitpunkt t0 wurde der Beginn der Versuchstierentnahme gewählt.

Für die Hitzeschockexperimente wurden die Tiere nach der Erholungsphase für 24 h in jeweils 16 °C, 20 °C, und 24 °C warmem Wasser adaptiert und danach Hälterungsserien in 28 °C warmem Wasser durchgeführt (t1628, t2028 und t2428), um zu untersuchen, inwieweit ein Temperaturstreß zu verzeichnen war.

Die Streßtemperaturen wurden den in der natürlichen Umgebung vorkommenden Wassertemperaturen angepaßt. *X. kroyeri* folgt dabei nach Pires (1992) stets den warmen Wassermassen, wenn es zu einem Einstrom von kaltem Atlantikwasser zu Beginn des Sommers kommt.

IV.2 Material

Brutschrank	WTC BINDER
Centriplus Konzentrator	AMICRON
Centriprep Konzentrator	AMICRON
Elektroblotkammer	PHARMACIA
Elektrophoreseapparatur	HOEFER
Folienschweißgerät	KRUPS
FPLC-Säule (PD10/G25)	PHARMACIA
FPLC-Säule (Protein A)	PHARMACIA
FPLC-Säule (QSepharoseHP)	PHARMACIA
FPLC-Säule (Superdex)	PHARMACIA
FPLC-System	PHARMACIA
Kühlschrank	AEG
Magnetrührer IKA-Combimag	JANKE & KUNKEL
Mikrowelle	PANASONIC
Mikrotiterplattenphotometer	DYNATECH
pH-Meter	WTW
Schüttler	JULABO
Spannungsquellen	PHARMACIA
Spektralphotometer	BECKMANN
Spektralphotometer	PERKIN ELMER
Tiefkühltruhe (-20 °C)	AEG
Tiefkühltruhe (-40 °C)	LINDE
Tiefkühltruhe (-70 °C)	BARKA
Tischzentrifuge	EPPENDORF
Tischzentrifuge	HERAEUS
Ultraturrax	JANKE & KUNKEL
Ultrazentrifuge	SORVALL DUPONT
Wasserbad	JULABO

IV.2.1 Sonstige Materialien

Blottingpapier GB 002	SCHLEICHER & SCHÜLL
Coreldraw	COREL
Einmalspritzen	SARTORIUS
Injektionskanülen	ENOSU
Injektionskanülen	MICROLANCE
Injektionskanülen	STERICAN
Leonora	CORNISH-BOWDEN
Mikrotiterplatten	NUNC
Multipette	EPPENDORF
Personal Computer	C & P
PVDF-Membranen (Immobilon-P)	MILLIPORE
Quattro Pro	BORLAND
Reaktionsgefäße 1,5 ml	EPPENDORF
Reaktionsgefäße 2,0 ml	EPPENDORF
SigmaPlot	JANDEL
SigmaStat	JANDEL
Sterilfilter	SCHLEICHER & SCHÜLL
SW-Filme AGFA Ortho DIN 25	AGFA
Variopipetten	EPPENDORF
Variopipetten	GILSON
Word	MICROSOFT

IV.2.2 Chemikalien

Acrylamid 2 x kristallisiert	SERVA
Amberlite Ionenaustauschharz	SERVA
Ammoniumperoxodisulfat	SIGMA
Bromphenolblau	SERVA
BSA	SERVA
Coomassie Brilliant Blue R-250	SERVA
Fotochemikalien	ILFORD
Glyzin	SERVA
Harnstoff	SERVA
Immunogold-Kit	AURION
Molekulargewichtsmarker	PHARMACIA
Mucosol	MERZ
N,N'-Methylenbisacrylamid	SERVA
Natriumazid (Sodium azide)	SERVA
Oxalacetat	SERVA

IV.3 Methoden

IV.3.1 Citratsynthase-Charakterisierung

IV.3.1.1 Chromatographie

Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer (pH8,0)

50 mM Tris/HCl

100 mM KCl

1 mM EDTA

QSepharoseHP-Säule bzw. ResourceQ-Säule

QSepharoseHP-Puffer (pH 7,0)

Puffer A: 40 mM Tris/HCl

20 mM KCl

4 mM MgSO₄

Puffer B: 40 mM Tris/HCl

20 mM KCl

4 mM MgSO₄

1 M NaCl

Superdex-Säule

Superdex-Puffer (pH 6,8)

Puffer A: 10 mM Imidazol

150 mM NaCl

Protein A-Säule

Protein A-Puffer

Puffer A (pH 7,0): 20 mM Na₂HPO₄

Puffer B (pH 2,7): 100 mM Glyzin/HCl

Durchführung

Extrahierung

Es wurden Ganztier-Extrakte hergestellt. Die Crustaceen (*C. femoratus*, *D. furcipes*, *S. polita*, *E. superba*, *M. norvegica*, *X. kroyeri*) wurden gewogen, in ein im Eisbad vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt, mit Extraktionspuffer versetzt und mit dem Ultraturrax 3 x 15 sec homogenisiert. Die Extrakte wurden auf Zentrifugenröhrchen verteilt und anschließend bei 80.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Mit Hilfe der G₂₅-Säulen wurde der Überstand in QSepharoseHP-Puffer umgepuffert und das Eluat durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Ø filtriert.

QSepharoseHP-Lauf

Die QSepharoseHP-Säule wurde vor dem Lauf mit entgastem QSepharoseHP-Puffer äquilibriert und die Proben mit einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgetragen.

Der Proteindurchfluß wurde mit einer UV-Lampe bei 280 nm kontinuierlich mit einem Schreiber aufgezeichnet. Mit dem in Puffer B enthaltenen NaCl wurde ein linearer Gradient von 30-365 ml aufgebaut und die an die Ionenaustauschsäule gebundenen Proteine wieder eluiert.

Die Fraktionen wurden in Röhrchen eines mit Eis gekühlten Fraktionssammlers á 4,3 ml und 95 Röhrchen aufgefangen (Die ResourceQ-Säule funktionierte nach demselben Prinzip, ermöglichte aber, durch die hohen Packungsdichten, unter höherem Druck schnellere Auftrennungen. Die Zeitersparnis lag bei bis zu 2 h.).

Aktivitätsbestimmung des Citratsynthase

Die CS-Aktivitätsprofile des FPLC-Laufs wurden im Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm nach folgendem Auftragsschema gemessen:

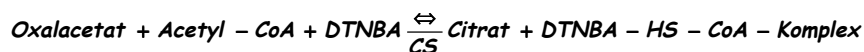
Extraktionspuffer pH 8,0:	150 µl
DTNBA (6,7 mM):	10 µl
Acetyl-CoA (2,5 mM):	10 µl
Probe:	50 µl

Reaktionsstart (Zugabe im Photometer):

Oxalacetat (5,0 mM):	10 µl
-----------------------------	--------------

Die CS-Aktivität wurde nach Stitt, 1984 über die Freisetzung von Coenzym A bestimmt. Das freie Coenzym A bindet mit der Sulfhydrylgruppe an das Hilfssubstrat DTNBA. Der entstehende gelbe Farbkomplex konnte im Photometer kontinuierlich verfolgt werden ($\epsilon_{412} = 13,61 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (nach Dawson, 1987)).

Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema:



Die höchsten Aktivitäten des Laufes wurden in einer Küvette im Spektralphotometer nachgemessen und 3 max. 4 Fraktionen wurden zu einem „Pool“ vereinigt (1 U Enzymaktivität entspricht 1 µmol Substratumsatz (DTNBA)/min). Dieser „Pool“ wurde für die weitere Aufreinigung verwendet.

Auftragsschema zur Bestimmung der CS-Aktivität in der Küvette bei 412 nm:

Extraktionspuffer pH 8,0:	X μl (535-555 μl)
DTNBA (6,7 mM):	15,0 μl
Acetyl-CoA (5,0 mM):	10,0 μl
Probe:	Y μl (10-30 μl)

Reaktionsstart (Zugabe im Photometer):

Oxalacetat (10 mM):	10,0 μl
----------------------------	-------------------------------

Mit Hilfe der Centriprep™- bzw. Centriplus™-Konzentratoren wurden der QSepharoseHP-„Pool“ eingengt und in Superdex-Puffer umäquilibriert.

Superdex-Lauf

Die Superdex-Säule wurde vor dem Lauf mit entgastem Superdex-Puffer äquilibriert und die Proben über eine 2 ml Probenschleife auf die Säule aufgetragen.

Der Proteindurchfluß wurde mit einem UV-Monitor bei 280 nm gemessen und kontinuierlich auf einem Schreiber aufgezeichnet.

Die Fraktionen (90 á 1,0 ml) wurden in Röhrchen eines mit Eis gekühlten Fraktionsammlers aufgefangen.

Die CS-Aktivitätsprofile des FPLC-Laufs wurden dann im Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm gemessen.

Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden in der Küvette nachgemessen und 5-8 Fraktionen wurden zu einem „Pool“ vereinigt, der für die weitere Untersuchung verwendet wurde.

Da die Superdex-Säule eine Gelfiltration durchführt, konnten die Superdex-Läufe gleichzeitig zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der einzelnen CS verwendet werden. Mit Hilfe der Elutionsvolumina der Standardproteine Thyroglobulin ($M_r = 669$ kD), Ferritin ($M_r = 440$ kD), Aldolase ($M_r = 158$ kD), BSA ($M_r = 67$ kD), Ovalbumin ($M_r = 43$ kD), Chymotrypsinogen A ($M_r = 25$ kD), Ribonuclease A ($M_r = 13,7$ kD), wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer das Molekulargewicht ermittelt werden konnte.

Protein A-Lauf

Die verwendete Protein A-Säule hatte eine IgG-Bindekapazität von 20 mg IgG pro ml und diente somit der Aufkonzentrierung der IgG. Mit dem Startpuffer wurde über eine 2 ml Probenschleife die Antikörperlösung nach der SAS-Fällung (s. IV.3.8) und Umpufferung über die G₂₅-Säulen in den Startpuffer für die Protein A-Säule aufgetragen. Mit dem Elutionspuffer wurden dann die an die Säule gebundenen IgG wieder eluiert und in dem angeschlossenen, mit 1 M Tris beschickten, Fraktionssammler mit einer Fraktionsgröße von 0,4 ml, aufgefangen. Die so erhaltenen 40 Fraktionen wurden mit Hilfe des Dot-Blot-Tests auf ihren IgG-Gehalt überprüft.

Nach jedem Reinigungsschritt, dem Extrakt nach der Ultrazentrifugation, dem Eluat aus der Umpufferung über die G₂₅-Säulen, dem „Pool“ des QSepharoseHP- und des Superdex-Laufes, sowie dem IgG-„Pool“, wurden je 100 µl Probe in ein beschriftetes Eppendorf-Cap für die Proteinbestimmung aufgenommen.

IV.3.1.2 Enzymkinetik

Es wurden der K_M-, K_i-Wert und V_{max} der enzymatischen Reaktion der Citratsynthase von *C. femoratus*, *D. furcipes*, *S. polita*, *E. superba*, *M. norvegica* (katt., med.) und *X. kroyeri* bestimmt. Dazu wurden verschiedene Acetyl-CoA- Konzentrationen im Reaktionsansatz (0,43; 0,85; 17; 43; 85 und 170 µM) und konstant 170 µM Oxalacetat verwendet. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten in der Küvette als Doppelbestimmung mit je 10 und 20 µl Probe. Die Werte wurden graphisch als Lineweaver-Burk-Diagramme und als Michaelis-Menten-Kinetiken dargestellt.

Die Berechnung der K_i-Werte (Dixon, 1953) der CS erfolgte mit Hilfe des Programmes Leonora (A. Cornish-Bowden, Marseille/Frankreich), das mit Hilfe aller Einzelmessungen folgende Funktion berechnete:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

v = Enzymaktivität

[S] = Substratkonzentration

[I] = Inhibitorkonzentration

Die Iteration der Werte V_{max}, K_M und K_i wurde solange fortgesetzt, bis die Summe der Abweichungsquadrate $[\sum (\text{Meßwert} - \text{kalkulierter Wert})^2]$ ein Minimum erreichte (Wilkinson, 1961).

Die Aktivierungsenergie E_A der einzelnen CS wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse aus der linearen Steigung der Temperaturprofile von 0 °C bis zum Temperaturoptimum der CS berechnet. Die Daten wurden aus wiederholten Messungen verschiedener Extrakte berechnet, wobei die Tiere aus denselben Größenklassen aber ohne Berücksichtigung ihres Alters oder Geschlechtes verwendet wurden.

IV.3.1.3 Proteinfällung und Proteinbestimmung

Acetonfällung

Die Probenlösungen für die Elektrophorese wurden mit dem doppeltem Volumen Aceton versetzt, für 30 min bis 12 h bei -20 °C inkubiert, und die Proteine anschließend für 30 min bei 4 °C und 19.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Proteine im Pellet getrocknet und anschließend im Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen.

Proteinbestimmung (modifiziert für Mikrotiterplatten nach Bradford, 1976)

Die folgende Abbildung zeigt die Plattenbelegung für die Proteinbestimmung:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1/0	S1/0	S2/1	S2/1	S3/2	S3/2	S4/3	S4/3	S5/4	S5/4	S6/5	S6/5
B	T1/1	T1/1	T1/1	T7/1	T7/1	T7/1	T13/1	T13/1	T13/1	T19/1	T19/1	T19/1
C	T2/2	T2/2	T2/2	T8/2	T8/2	T8/2	T14/2	T14/2	T14/2	T20/2	T20/2	T20/2
D	T3/3	T3/3	T3/3	T9/3	T9/3	T9/3	T15/3	T15/3	T15/3	T21/3	T21/3	T21/3
E	T4/1	T4/1	T4/1	T10/1	T10/1	T10/1	T16/1	T16/1	T16/1	T22/1	T22/1	T22/1
F	T5/2	T5/2	T5/2	T11/2	T11/2	T11/2	T17/2	T17/2	T17/2	T23/2	T23/2	T23/2
G	T6/3	T6/3	T6/3	T12/3	T12/3	T12/3	T18/3	T18/3	T18/3	T24/3	T24/3	T24/3
H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

S = Standard; T = Test. Als Standardkonzentrationen (S1/0-S6/5) wurden 0; 1; 2; 3; 4; 5 µg BSA eingesetzt und doppelt bestimmt

Die Testkonzentrationen wurden dreifach bestimmt. Die eingesetzten Mengen betrugen 10, 20 und 30 µl (T1/1-T24/3) Probe.

Einige Proteinproben mußten vor der Proteinbestimmung noch mit H₂O_{dd} verdünnt werden. Für den CS-Extrakt und das G₂₅-Eluat wurde 1:100, für den QSepharoseHP-„Pool“ 1:10 verdünnt. Der Superdex-„Pool“ und die IgG-Fraktionen wurden unverdünnt verwendet.

1 : 5 verdünntes BIORAD-Reagenz wurde als Starter-Reagenz zugegeben. Nach 20 min Inkubationszeit erfolgte die Messung mit dem Mikrotiterplattenphotometer bei 600 nm. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\mu\text{g Testkonzentration}}{\mu\text{l Testeinsatz}} \times VF \text{ ergibt } (\mu\text{g} / \mu\text{l})$$

(VF = Verdünnungsfaktor)

IV.3.2 Elektrophoresetechniken (Davis, 1964; Andrews, 1992)

IV.3.2.1 Puffer und Lösungen

Probenpuffer

187,5 mM Tris/HCl pH 6,8
6,0 % SDS (20 %)
30,0 % Glyzerol (100 %)
78,0 mM DTT
0,003 % Bromphenolblau (2 %)

Trenngel-Stammlösung: Separationspuffer (4 x): 1,5 M Tris/HCl pH 8,9

Acrylamidlösung: (Trenn- und Sammelgele) 30,0 % Acrylamid
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Zur Entfernung der freien Acrylsäure wurde die Lösung mit Ionenaustauschharz über Nacht im Kühlraum (4 °C) gerührt. Die Flasche wurde dabei mit Alufolie abgedunkelt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe und eines Porzellanfilters filtriert, um das Ionenaustauschharz wieder zu entfernen.

SDS-Lösung:

20,0 % Natriumdodecylsulfat

APS-Lösung:

40,0 % Ammoniumperoxodisulfat

Sammelgel-Stammlösung:

Sammelgelpuffer (4 x):

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Laufpuffer für die SDS-PAGE (Laemmli, 1970):

192,0 mM Glyzin
25,0 mM Tris
0,1 % SDS

Laufpuffer für die SDS-PAGE (Schägger, 1987):

100,0 mM Tricin
25,0 mM Tris
0,1 % SDS

Trenn- und Sammelgele wurden aus den entsprechenden Stammlösungen wie folgt zusammengestellt:

IV.3.2.2 Zusammensetzung der Gele

Trenngel 10 % (22 ml für ein Minigel 100 x 80 x 1,5 mm):

Separationspuffer	5,6 ml
H ₂ O _{dd}	9,1 ml
SDS (20 %)	75,0 µl
Acrylamidlösung	7,5 ml
TEMED	23,0 µl
APS (40%)	180,0 µl

(APS als Polymerisationsstarter wurde erst unmittelbar vor der Füllung der Gelkassette zugegeben.)

Sammelgel 3 % (10 ml für ein Minigel 100 x 80 x 1,5 mm):

Spacerpuffer	2,5 ml
H ₂ O _{dd}	6,1 ml
SDS (20 %)	50,0 µl
Acrylamidlösung	1,3 ml
TEMED	10,0 µl
APS (40 %)	60,0 µl

(APS als Polymerisationsstarter wurde erst unmittelbar vor der Füllung der Gelkassette zugegeben.)

IV.3.2.3 Molekulargewichtsmarker:

„HMW-Marker

212 kD	Myosin
170 kD	α ₂ -Makroglobulin
116 kD	β-Galactosidase
76 kD	Transferrin
53 kD	Glutamatdehydrogenase
94 kD	Phosphorylase b

„LMW-Marker“

67 kD	BSA
43 kD	Ovalbumin
30 kD	Carboanhydrase
20 kD	Saubohnentrypsininhibitor
14 kD	Lactalbumin

IV.3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Ornstein, 1964)

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte im elektrischen Feld durch die SDS-PAGE (Laemmli, 1970; Schägger, 1987). Diese ermöglichte die Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht der Proteine, unabhängig von der Eigenladung des jeweiligen Polypeptides. Es handelte sich hierbei um eine sogenannte diskontinuierliche Elektrophorese mit folgenden Diskontinuitäten (Davis, 1964):

- 1) Unterschiedlicher Acrylamidgehalt in Trenn- und Sammelgel und damit unterschiedliche Porengröße (10 %/3 %)
- 2) Unterschiedliche Mobilität der verwendeten Ionen (schnelle Cl^- -, langsame $\text{Gly}^\oplus$ -Ionen)
- 3) Unterschiedliche Molarität des Tris-Puffers in Trenn- und Sammelgel (0,375 M/0,125 M)
- 4) Unterschiedlicher pH-Wert von Trenn- und Sammelgel (8,9/6,8)

Bei der vorliegenden Auftrennung handelt es sich um eine sogenannte Isotachophorese, die wie folgt abläuft:

- 1) Im Sammelgel kommt es zu einer Stapelung der Proteine, da sich ein Gleichgewicht zwischen den schnell laufenden Cl^- -Ionen und den langsam laufenden $\text{Gly}^\oplus$ -Ionen einstellt, ohne daß es zu einem Abriß des Stromflusses kommt.
- 2) Durch die Großporigkeit des Sammelgels werden die Proteine hier nicht voneinander getrennt.
- 3) Am Übergang vom Sammel- zum Trenngel kommt es zu einem pH-Schock. Die $\text{Gly}^\oplus$ -Ionen laufen zuerst in das Trenngel, der pH-Wert steigt kurzfristig auf 9,1 an. Durch die engmaschigen Poren des Trenngels werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (je höher das Molekulargewicht, desto geringer die Wanderstrecke).
- 4) Da hier nur Proteine mit einem Molekulargewicht von deutlich über 10 kD gesucht wurden, konnte als Marker für den Frontverlauf der Proteine Bromphenolblau verwendet werden (Proteine < 10 kD laufen schneller als Bromphenolblau. Für solche Proteine müßte Orange G verwendet werden).

Durch die reduzierende Substanz β -Mercaptoethanol werden die Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen infolge der Spaltung der Disulfidbrücken zerstört. Wegen der leichten Flüchtigkeit und der damit verbundenen extrem hohen Gesundheitsschädlichkeit von β -Mercaptoethanol, wurde es durch DTT (Dithiothreitol) ersetzt, das dieselbe Wirkung besitzt, aber eine kovalente -SH-Bindung ausbildet, und so die Disulfidbrücken besser vor der Renaturierung schützt. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) linearisiert die Proteine, indem es an die hydrophoben Regionen der Proteine bindet.

Außerdem führt es stark negative Ladungen ein. Die Polypeptide wandern daher, unabhängig von ihrer Eigenladung, im elektrischen Feld stets zur Anode.

Die Wanderstrecke in der stark vernetzten Polyacrylamidmatrix ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. In dem Gel entstehen so eine Reihe diskreter Proteinbanden, die entsprechend ihrer molaren Masse angeordnet sind. Dies ermöglicht die Molekulargewichtsbestimmung über die R_F -Werte.

Herstellung des SDS-Polyacrylamidgeles

Die in Reinigungslösung (MUCASOL, Merz) aufbewahrten Glasplatten, Spacer und Kämme wurden vor Gebrauch mit H_2O_{dd} gespült, mit 70 % Ethanol geputzt, nochmals mit H_2O_{dd} gereinigt und getrocknet.

Je eine Glas- und Aluplatte (10 x 8 cm) wurden durch zwei 1 mm dicke Spacer getrennt und in einer Gelgießkammer fixiert.

In die Gelgießkammer wurde die Trenngellösung mit APS bis 2,5 cm unter den oberen Plattenrand eingefüllt. Um die Ausbildung eines geraden, glatten Übergangs zum Sammelgel zu gewährleisten, wurde die Lösung mit 10 % Isopropanol überschichtet. War das Trenngel auspolymerisiert, wurde das Isopropanol dekantiert, mit H_2O_{dd} und 1 ml Sammelgellösung ohne APS gespült, das Sammelgel mit APS eingefüllt und der Probenkamm eingeführt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Gelplatten aus der Gelgießkammer herausgenommen, überschüssige Gelreste und die Kämme entfernt, und mit H_2O_{dd} gespült. Die so gefertigten Gelplatten konnten dann in die Gelkassette der Elektrophoreseapparatur eingebaut werden.

Start der Elektrophorese

Die Probentaschen der Gele und die Kammer wurden mit dem jeweiligen Laufpuffer gefüllt, die mit Probenpuffer (IV.3.2.1) behandelten, und 3 min gekochten Proben und Standardmarker aufgetragen und der Lauf gestartet.

Zum langsamen Eindringen der Proteine in das Sammelgel wurde der Lauf 30 min mit einer konstanten Spannung von 70 mV gestartet und nach 30 min mit einem konstanten Strom von 20 mA pro Gel für weitere 60 min die Proteinauftrennung durchgeführt.

IV.3.3 Proteinfärbungen

Um die Proteinbanden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden alternativ zwei Färbemethoden angewendet.

IV.3.3.1 Coomassie Blue Färbung (Wilson, 1979)

Empfindlichkeit 0,1-0,5 µg Protein/Bande

a) Färbung: Die Gele wurden zuerst 30 min in Methanol/Eisessig (40 %/10 %) gelegt. Danach wurden die Gele mindestens 20 min bis 2 h in folgender Lösung inkubiert.

Färbelösung: 40,00 % Methanol
10,00 % Eisessig
0,04 % Coomassie Brilliant Blue R-250

b) Entfärbung: Die gefärbten Gele wurden in einer Methanol/Eisessig Lösung (40 %/10 %) unter mehrfachem Wechsel der Lösung solange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden eine Blaufärbung zeigten.

Als Lösung zur Aufbewahrung der Gele diente eine 20 % Glyzerollösung.

IV.3.3.2 Silberfärbung (Wray, 1981)

Empfindlichkeit: 1-5 ng Protein/Bande

Lösungen:

Fixierlösung: (5 % Formaldehyd in 50 % CH₃OH)

Waschlösung: (50 % CH₃OH)

Wray Färbelösung: (AgNO₃/NaOH/NH₃)

A: 1,20 M Silbernitrat

B: 0,37 % NaOH

3,60 % NH₃

Lösung A wurde unmittelbar vor der Färbung unter ständigem Rühren tropfenweise zu Lösung B gegeben und die Lösung mit H₂O_{dd} auf 150 ml Endvolumen angehoben.

Entwickler: (Zitronensäure/Formaldehyd)

0,52 mM Zitronensäure

3,70 % Formaldehyd

Nachfixierungslösung: (CH₃OH/Eisessig)40,00 % CH₃OH

10,00 % Eisessig

4,00 % Glyzerol

Vorgehensweise bei der Silberfärbung:

1. Das Gel wurde 1 h in der **Fixierlösung** geschüttelt,
2. 30 min in der **Waschlösung I** inkubiert,
3. 3-4 mal in H₂O_{dd} für 15 min gewaschen,
4. in der **Färbelösung** 15 min inkubiert (die Lösung durfte sich nicht verfärben),
5. 2 mal für 5-10 min in H₂O_{dd} gewaschen,
6. im **Entwickler** solange inkubiert, bis Banden sichtbar wurden (ca. 5 min),
7. und für mindestens 30 min in der **Nachfixierungslösung** gewaschen.

Um die starke Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurde das Gel entfärbt:

Entfärbelösung:0,3 % Kalium Ferricyanid [K₃F(CN)₆]0,6 % Natrium Thiosulfat [Na₂S₂O₃]0,1 % Natrium Bicarbonat [NaHCO₃]

Es wurde solange in der Entfärbelösung inkubiert bis die Banden verschwunden waren und erneut bei Punkt 3 der Vorgehensweise begonnen.

IV.3.4 Proteintransfer mittels Elektrophoret (Western Blotting)

Mit dieser Methode wurden Polypeptide aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran mit hoher Proteinbindungskapazität (PVDF-Membran) transferiert (Towbin, 1979; Burnette, 1981).

Auf der Membran konnten Polypeptide mit Hilfe polyklonaler Antikörper eindeutig detektiert werden (Immunoblot).

IV.3.4.1 Lösungen:**Blottinglösung 1 (pH 10,4):**

300 mM Tris/HCl 20 % Methanol

Blottinglösung 2 (pH 10,4):

25 mM Tris/HCl 20 % Methanol

Blottinglösung 3 (pH 7,6):

40 mM 6-Amino-Capronsäure

20 % Methanol

Defixierungslösung:

6,0 M Harnstoff

25,0 mM Tris

192,0 mM Glyzin

0,2 % SDS

IV.3.4.2 Ausgangssituation vor dem Elektroblob

- a) Ungefärbte SDS-Polyacrylamidgele mit den elektrophoretisch aufgetrennten Peptiden, oder
- b) Coomassie Blue gefärbte Gele, die noch viermal je 30 min in Defixierungslösung inkubiert werden mußten.
- c) Die PVDF-Membran wurde für 10 sec in Methanol gewaschen und anschließend in H_2O_{dd} überführt (Methanol, um die Affinität der PVDF-Membran für die Proteine zu erhöhen).
- d) 15 Blottingpapiere (GB 002, Schleicher & Schuell), von denen je 6 Stück in Blottinglösung 1 bzw. 3 und 3 Stück in Blottinglösung 2 eingeweicht wurden.

Sowohl die Blottingpapiere als auch die PVDF-Membran wurden zuvor auf die Gelgröße zugeschnitten.

IV.3.4.3 Durchführung des Elektroblobs

Der Blot wurde in einer Multiphor II Elektrophoresekammer (PHARMACIA) durchgeführt. Um einen einwandfreien Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu gewährleisten, wurden beim Beschicken der Kammer die einzelnen Schichten luftblasenfrei aufgebracht. Die Graphitelektroden wurden vor und nach der Benutzung mit H_2O_{dd} gewaschen.

Die Kammer wurde nach folgendem Schema aufgebaut und zusammengesetzt:

- Kathode $^-$ oben
- 6 Blottingpapiere mit Blottinglsg. 3
- Gel
- PVDF-Membran
- 3 Blottingpapiere mit Blottinglsg. 2
- 6 Blottingpapiere mit Blottinglsg. 1
- Anode $\oplus$ unten

Der Blot wurde während 1,5 bis 2,5 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (ungefärbte Gele) oder $1,0 \text{ mA/cm}^2$ (zuvor Coomassie gefärbte Gele) durchgeführt.

IV.3.5 Immunoblot (Towbin, 1984)

IV.3.5.1 Puffer und Lösungen

Immunoblotpuffer (pH8,2):

20,00 mM Tris
5,00 mM NaN_3
150,00 mM NaCl
0,01 % BSA

Waschpuffer: Immunoblotpuffer/0,1 % Tween 20

Absättigungspuffer: 5,0 % BSA/0,1 % Tween 20 in Immunoblotpuffer

1. Antikörperlösung: 10,0 % RaCS-Serum in Immunoblotpuffer

bzw. bei HSP: 5,0 ng/10 ml Immunoblotpuffer

2. Antikörperlösung: 2,0 % GAR-Au (AURION) in Immunoblotpuffer

bzw. bei HSP: 2,0 % GAM-Au (AURION) in Immunoblotpuffer

Antikörperverdün-

nungslösung: 3,0 % BSA/0,03 % NaN_3 in Immunoblotpuffer

Entwickler-

& Verstärkerlösung: Fertigreagenzien (AURION)

IV.3.5.2 Durchführung des Immunoblots

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Inkubationen erfolgten unter Schütteln. Die Antikörperlösungen konnten bis zu 1:100 verdünnt werden. Zur Einsparung der Antikörperlösungen wurde die PVDF-Membran mit der Antikörperlösung in Folie eingeschweißt (Müller, 1993).

Die PVDF-Membran wurde nach dem Elektrobplot zur Absättigung der freien Bindungskapazitäten für 2 h in Absättigungspuffer inkubiert, dreimal je 5 min in Waschpuffer gewaschen und 2 h in der ersten Antikörperlösung inkubiert.

Nach einem zweimaligen je 5 min Waschschrift in Waschpuffer wurde die Membran für 2 h in der zweiten Antikörperlösung inkubiert. Dieser Ziegenantikörper war gegen Kaninchenantikörper gerichtet und goldgekoppelt. Das Gold wirkte bei der nachfolgenden Entwicklung des Blots, als Kristallisationskeim für die in der Verstärkerlösung (als $\text{Ag}^\oplus$) enthaltenen und durch den Entwickler reduzierten Ag-Atome.

Zur Entwicklung wurde die Membran in Waschpuffer und zweimal kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen. Anschließend wurde sie für 5-30 min in Entwickler- & Verstärkerlösung (1:1) bis zum Erscheinen der detektierten Antigene inkubiert. Der Entwicklungsprozeß wurde durch Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ beendet.

IV.3.6 Dot-Blot (Hawkes, 1982; Moeremans, 1984; Towbin, 1984)

IV.3.6.1 Durchführung des Dot-Blots

Die Durchführung eines Dot-Blots diente der schnellen Überprüfung eines Antikörpers auf seine Detektionsfähigkeit gegenüber dem verwendeten Antigen, bzw. zur Überprüfung der Immunisierungseffizienz. Dazu wurde, nach Beendigung der Immunisierung des Kaninchens, diesem Blut abgenommen und das Serum als 1. Antikörper eingesetzt.

- 1) Hierzu wurde kein Elektrobplot vorgeschaltet, sondern das zu testende Antigen wurde direkt auf die PVDF-Membran aufgetragen, die zuvor für 10 sec in Methanol gewaschen und anschließend in H_2O_{dd} überführt worden war (Methanol erhöht die Affinität der PVDF-Membran für die Proteine).
- 2) Die PVDF-Membran wurde leicht angetrocknet, damit die Proteinlösung beim Auftropfen nicht zu sehr verläuft.
- 3) Anschließend wurde die Proteinlösung (das Antigen, hier Citratsynthase vom Schwein) in max. 40 Fraktionen à 10 µl aufgetragen, um entweder die Immunisierungseffizienz oder die IgG-Aufreinigung zu testen.
- 4) Nach einer Inkubation von 1 h in einer feuchten Kammer, wurde die Membran je dreimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann 1 h in Absättigungspuffer inkubiert.
- 5) Es wurde erneut dreimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen und mit je 10 µl des Serumüberstandes aus Kaninchenblut bzw. der aufgereinigten Antikörperfraktionen für 2 h inkubiert.
- 6) Der Auftrag des 2. Antikörpers und die weiteren Wasch- und Entwicklungsschritte erfolgten dann wie bei der Durchführung des Immunoblots bereits beschrieben.

IV.3.7 Gewinnung von Antikörpern (Harlow, 1988; Peters, 1990)

IV.3.7.1 Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung erfolgte jeweils durch subkutane Injektion mit einer 1 ml Einwegspritze und einer 24 G Kanüle.

IV.3.7.2 Beeinflussung der Immunantwort durch Adjuvantien

Adjuvantien dienen zur Verstärkung der Immunantwort. Durch die Verwendung von Adjuvantien kann die notwendige Antigendosis bzw. die Anzahl von Injektionen reduziert oder überhaupt erst eine meßbare Immunantwort induziert werden.

IV.3.7.3 Klassische Adjuvantien: cFA/iFA

Wenn getrocknete, hitzeinaktivierte *Mycobacterium tuberculosis* Organismen in die Ölphase der Wasser-in-Öl Emulsion inkorporiert werden, spricht man vom kompletten Freundschens Adjuvans (cFA). Seine Verwendung bewirkt eine stärkere Immunantwort als die eines Antigens, das in einer einfachen Wasser-in-Öl Emulsion injiziert wird. Die Herstellung dieser Adjuvantien ist relativ einfach und wurde ausführlich von Herbert und Kristensen (1986) beschrieben.

Einfache Wasser-in-Öl Emulsionen werden inkomplettes Freundsches Adjuvans (iFA) genannt (iFA enthält nur Mineralöl und keine Mycobakterien). cFA wurde nur für die Erstimmunisierung gegeben, der erste Boost erfolgte mit iFA und dann bis zur Blutentnahme nur noch in Puffer.

IV.3.7.4 Immunisierungsschema

Tag	Injektion (subkutan)	Dosis (µg)	cFA (µl)	iFA (µl)	0,9 %NaCl/ Antigen (µl)
1	Priming	100	250	-----	250
43	Boost	100	-----	250	250
71	Boost	100	-----	-----	250
98	Boost	100	-----	-----	250
136	Boost	100	-----	-----	250

Tab.1: Immunisierungsschema eines Kaninchens behandelt mit CS von *E. superba*

Abkürzungen: cFA/iFA: komplettes/inkomplettes Freundsches Adjuvans

Priming: Erstimmunisierung des Kaninchens

Boost: Immunisierungen des Kaninchens nach der Erstimmunisierung

IV.3.8 SAS-Fällung (gesättigte Ammoniumsulfatfällung)

Die meisten Kaninchenantikörper fallen bei einer SAS-Sättigung von 40 % aus. Bei 50 %-SAS-Sättigung ist die gesamte Immunglobulinbreite mit eingeschlossen. Höhere SAS-Konzentrationen führen zu der ungewollten Ausfällung von Transferrin und Albumin (Goding, 1987). Bei der Reinigung von IgG aus Serum wäre eine vorgeschaltete 28 % SAS-Fällung der IgM angezeigt gewesen. Eine solche fraktionierte Fällung hat sich allerdings bei dem hier vorliegenden polyklonalen Kaninchenserum als ungeeignet erwiesen. Nach der Fällung mit 28 % SAS befanden sich nach der Zentrifugation bei 20.000 g zu viele IgG im Pellet, die sich laut Literatur (s. o.) eigentlich im Überstand befinden sollten. Die Fällung mit 50 % SAS dagegen hatte den Nachteil, daß relativ viel IgM mit ausgefällt wurden, jedoch waren nach der 50 % SAS-Fällung und der Zentrifugation bei 20.000 g sämtliche Immunglobuline im Pellet, die sich mit Hilfe der Protein A-Säulenchromatographie, die für IgG spezifisch ist, weiter auftrennen ließen.

Berechnungsformel der Menge an gesättigter Ammoniumsulfatlösung (SAS):

$$V_x = \frac{C_x - C_0}{1 - C_x} \times V_0$$

V_x = Volumen der gesättigten SAS-Lösung (ml)

V_0 = Volumen der eingesetzten SAS-Lösung (ml)

C_x = Endkonzentration an SAS

C_0 = Anfangskonzentration an SAS

Bei 50 % SAS-Fällung ist $C_x = 0,5$ und $C_0 = 0$. Bei vorheriger 28 %-SAS-Fällung war $C_0 = 0,28$

IV.3.8.1 Vorgehen bei der SAS-Fällung

- 1) Zuerst wurde das Serumvolumen bestimmt und bei 3.000 g 30 min und dann bei 10.000 g 10 min zentrifugiert. Evtl. vorhandene Gerinnsel, Zellrückstände und Fettfilme konnten so entfernt werden.

Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

- 2) Für die Fällung wurde das Serum, der Überstand, nach der Zentrifugation in ein Becherglas im Eisbad mit Magnetrührer überführt.
- 3) Die Lösung wurde dann auf Eis bei 4 °C 6 h oder über Nacht gerührt.
- 4) Es folgte eine Zentrifugation bei 20.000 g für 20 min bei 4 °C. Das Pellet wurde zur weiteren Aufreinigung der IgG verwendet.
- 5) Das Pellet wurde im Puffer für die Protein A-Säule aufgenommen und mit Hilfe der G₂₅-Säulen entsalzt und umgepuffert.
- 6) Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde der IgG-Gehalt der Fällungsschritte überprüft.
- 7) Danach erfolgte die weitere Aufreinigung der IgG mittels Protein A-Säulenchromatographie.
- 8) Die aus der Chromatographie erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe der Dot-Blot-Technik überprüft.
- 9) Eine weitere Überprüfung der Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE, bei der die einzelnen aufgefangenen Fraktionen aufgetragen wurden.
- 10) Die Fraktionen mit den stärksten Reaktionen wurden an der intensivsten Dunkelfärbung erkannt. Diese wurden zu einem „Pool“ vereinigt und zur weiteren immunologischen Bearbeitung der Proben verwendet.

IV.3.9 ELISA (Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test)

Der ELISA (Kenny, 1983) beruht auf der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion und ermöglicht die Erkennung selbst geringer Mengen an Antigen. Als Antikörper diente der selbst hergestellte, gegen die CS von *E. superba* gerichtete, polyklonale Antikörper RaCS-Müller (Kaninchen gegen CS). Die Auswertung erfolgte mittels Mikrotiterplattenphotometer.

IV.3.9.1 Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer (pH 9,4-9,7):

0,2 M NaHCO_3 (Lsg. A)
0,2 M Na_2CO_3 (Lsg. B)
74,0 ml Lsg. A + 26 ml Lsg. B

Nachbeschichtungspuffer (pH 7,5):

50,0 mM Tris
150,0 mM NaCl
1,0 % BSA
0,03 % NaN_3

Waschpuffer (pH 7-7,5):

0,9 % NaCl
0,1 % Tween 20

AK-Verdünnungspuffer (pH 7,5):

50,0 mM Tris
150,0 mM NaCl
0,5 % BSA
0,05 % Tween 20

IV.3.9.2 Verdünnungen

Extrakt: Nach der Aufreinigung über die QSepharoseHP-Säule wurde pro 0,1 mg/ml Protein mit Beschichtungspuffer 1 : 10 verdünnt.

1. AK: pro 0,6 mg/ml AK-Lsg. wurde nach der Protein A-Säule mit AK-Verdünnungspuffer 1 : 100 verdünnt

2. AK: 10 μl des gekauften AK wurden auf 5 ml mit dem AK-Verdünnungspuffer aufgefüllt. Dies war ausreichend für eine 96 Well Mikrotiterplatte und ergab 0,2 μg pro Well.

ABTS: Eine Tablette à 50 mg ABTS wurde in 5 ml ABTS-Puffer und 45 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst.

Standardverdünnungen:

Als Standard wurde CS vom Schwein verwendet. Die Konzentration von 8,6 mg/ml der gekauften Lösung wurde so mit Beschichtungspuffer verdünnt, daß im Test 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt werden konnten.

IV.3.9.3 Vorgehen beim ELISA

Proben und Standards (Antigen) wurden mit Beschichtungspuffer, wie beschrieben, verdünnt, jeweils 500 µl pro Well aufgetragen und 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

- 1) Die Platten wurden ausgeschüttet, ausgeklopft und dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gespült und nach jedem Waschschrift erneut ausgeklopft.
- 2) Mit 200 µl/Well Nachbeschichtungspuffer wurde 15 min bei RT auf dem Schüttler nachbeschichtet.
- 3) Siehe 1)
- 4) Es folgte die Inkubation mit dem 1. AK à 50 µl/Well für 1 h bei RT auf dem Schüttler.
- 5) Siehe 1)
- 6) Danach wurde mit dem 2. AK wieder mit 50 µl/Well bei RT für 1 h auf dem Schüttler inkubiert.
- 7) Siehe 1)
- 8) Anschließend erfolgte die Substratreaktion mit ABTS und ebenfalls 50 µl/Well und 1 h auf dem Schüttler bei RT.
- 9) Auswertung mit dem Mikrotiterplattenphotometer und dem Computer

IV.3.10 HSP-Aufarbeitung bei *X. kroyeri*

Es wurden verschiedene Puffer zur HSP-Aufarbeitung getestet. Als am geeignetsten erwies sich der HS I-Puffer. Die Homogenisation wurde jeweils mit dem zehnfachen Volumen des Tiergewichtes durchgeführt.

Die Puffer hatten folgende Zusammensetzung:

(Hofmann, 1995):

HS I: 5,0 mM Tris/HCl pH 7,6
0,1 mM PMSF
5,0 mM Jodacetamid
2,0 mM EDTA
1,0 ml Aprotinin/l

(Hofmann, 1996):

HS II: 30,0 mM Tris/HCl pH 6,8
70,0 mM SDS
0,10 mM PMSF
1,00 ml Aprotinin/l

(Sanders, 1991):

San: 67 mM Tris/HCl pH 7,2
1,0 % Nonidet P-40
0,1 mM PMSF

(Minami, 1996):

Min: 20,0 mM Tris/HCl pH 7,5
20,0 mM NaCl
1,00 mM EDTA
0,10 mM PMSF

Die Homogenisation erfolgte mit einem Ultraturrax für 30 sec pro Tier. Danach wurde bei 100.000 g für 30 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde einer Acetonfällung unterzogen. Dies geschah mit dem doppelten Volumen an eiskaltem Aceton bei -20°C für 24 h. Danach wurde der Überstand in Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und bei 4°C für 30 min in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in der Speed-Vac® für 3 min getrocknet. Die Pellets wurden vereinigt, in 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraturrax wieder gelöst. Die Proteinbestimmung wurde bei einer 1:10 Verdünnung durchgeführt. Pro Bahn für die Gelelektrophorese wurden 150 µg Protein eingesetzt.

Die Probe mußte so abgestimmt werden, daß nochmals $\frac{1}{3}$ 3x-Stopp-Puffer hinzukommen konnte. D. h. es konnten pro Bahn und Gel nur 25 µl Probe aufgetragen werden.

Nach einem 1,5 h Elektrophorese-Lauf wurden die Gele 30 min gefärbt und 30 min fixiert. Jetzt mußten die Gele 30 min defixiert werden, um die Proteine für den Blot wieder anzulösen. Der Elektroblot dauerte 1,5 h. Danach wurde die Membran für 1 h mit BSA abgesättigt, gewaschen und mit dem 1. Antikörper für 1 h inkubiert. Jetzt wurde erneut gewaschen und mit dem 2. Antikörper 1 h inkubiert. Anschließend wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen und mit Entwickler- und Enhancer-Lösung der Blot entwickelt. Die Entwicklung dauerte zwischen 10 und 20 min.

Gele und Blots wurden jeweils fotografiert (25 ASA, Blende 8, $\frac{1}{8}$ sec), mit einem Scanner digitalisiert und mit dem Programm Scion Image ausgewertet.

IV.3.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Verfahren wurden nach Lozán und Kausch (1998) ausgewählt.

Tests auf Normalverteilung der Daten erfolgten nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Mittelwerte wurden mit Hilfe des Student's t-Test bzw. einer ANOVA, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls Test ermittelt. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm Sigma-Stat durchgeführt.

Zusätzliche Ermittlungen von Mittelwerten, Standardabweichungen, linearen Regressionen ($p \leq 0,05$) und Korrelationskoeffizienten erfolgten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms QuattroPro.

V. Ergebnisse

Teil I: Qualitative Bestimmung der Citratsynthase

Neben der Charakterisierung der CS war es ein Hauptaspekt die für die Kinetiken benötigten CS-Mengen zu bestimmen. Dazu wurde ein ELISA (Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), mit Hilfe des selbst hergestellten pAK (RaCS-Müller), gerichtet gegen die CS von *E. superba*, entwickelt. Bei *X. kroyeri* wurden zusätzlich die Streßeffekte der Tiere bei unterschiedlichen Hälterungstemperaturen durch Bestimmung der HSP 70-Menge untersucht. Bei allen Bestimmungen, wurde mit aufgereinigten Extrakten gearbeitet. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

V.1 Charakterisierung der Citratsynthase

V.1.1 Aufreinigung der Citratsynthase über FPLC-Säulen

Beispielhaft sind in den folgenden Abbildungen die chromatographischen Aufreinigungen der CS von *E. superba* (Abb.1 und 2), *M. norvegica* (Abb.3 und 4), *X. kroyeri* (Abb.5 und 6) *C. femoratus* (Abb.7 und 8) *D. furcipes* (Abb.9 und 10) und *S. polita* (Abb.11 und 12) dargestellt.

Die Aufreinigung erfolgte über eine Anionenaustauschersäule (QSepharoseHP bzw. ResourceQ) und über die Superdex-Säule. Diese Säule funktioniert nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik und ermöglichte es mit gut aufgereinigter CS zu arbeiten. Damit sollten Verfälschungen der Tests (Kinetiken, Molekulargewichtsbestimmungen, Antikörperherstellung, ELISA, Elektrophorese, Immunoblot) durch Fremdproteine vermieden werden. Denn um die spezifische Aktivität, d. h. die Aktivität pro Enzymmolekül zu ermitteln, ist es erforderlich reines Enzym vorliegen zu haben (Cornish-Bowden, 1979).

Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden zu „Pools“ vereinigt und für die weiteren Tests verwendet.

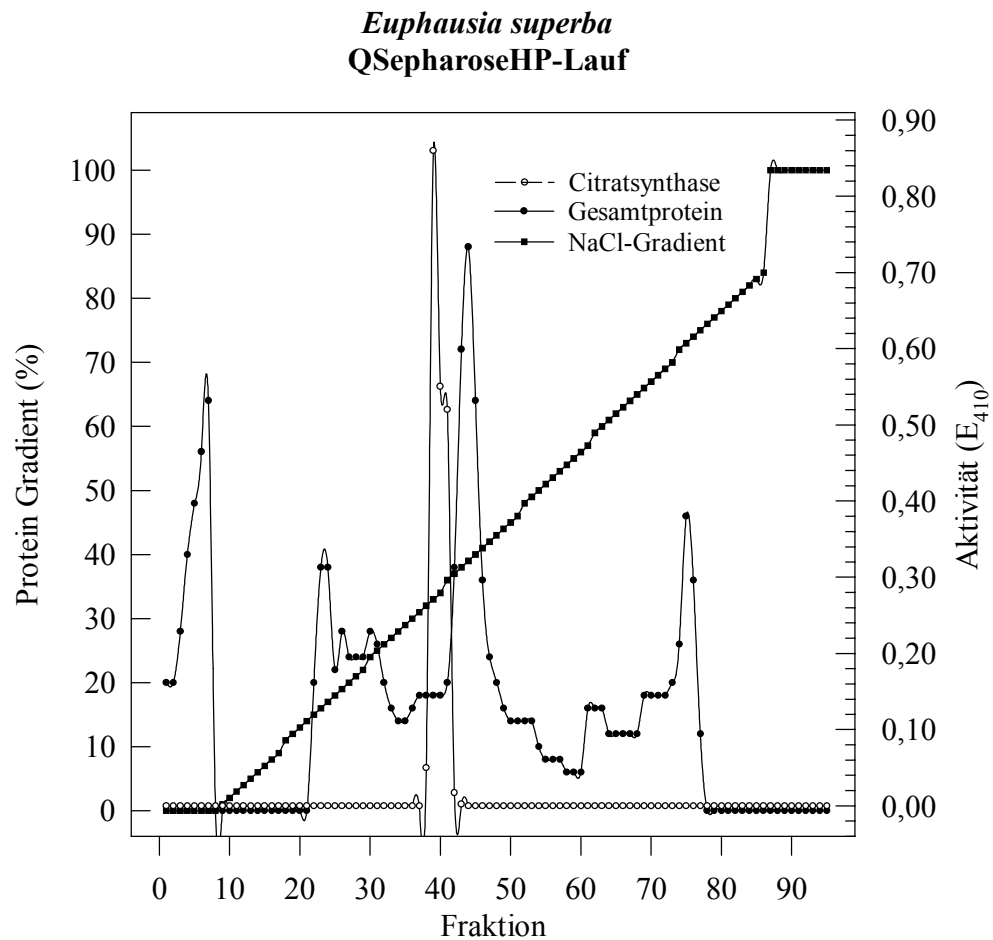
V.1.1.1 QSepharoseHP-Lauf von *E. superba*

Abb.1: Aufreinigung der CS von *E. superba* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (QSepharoseHP). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 39.

V.1.1.2 Superdex-Lauf von *E. superba*

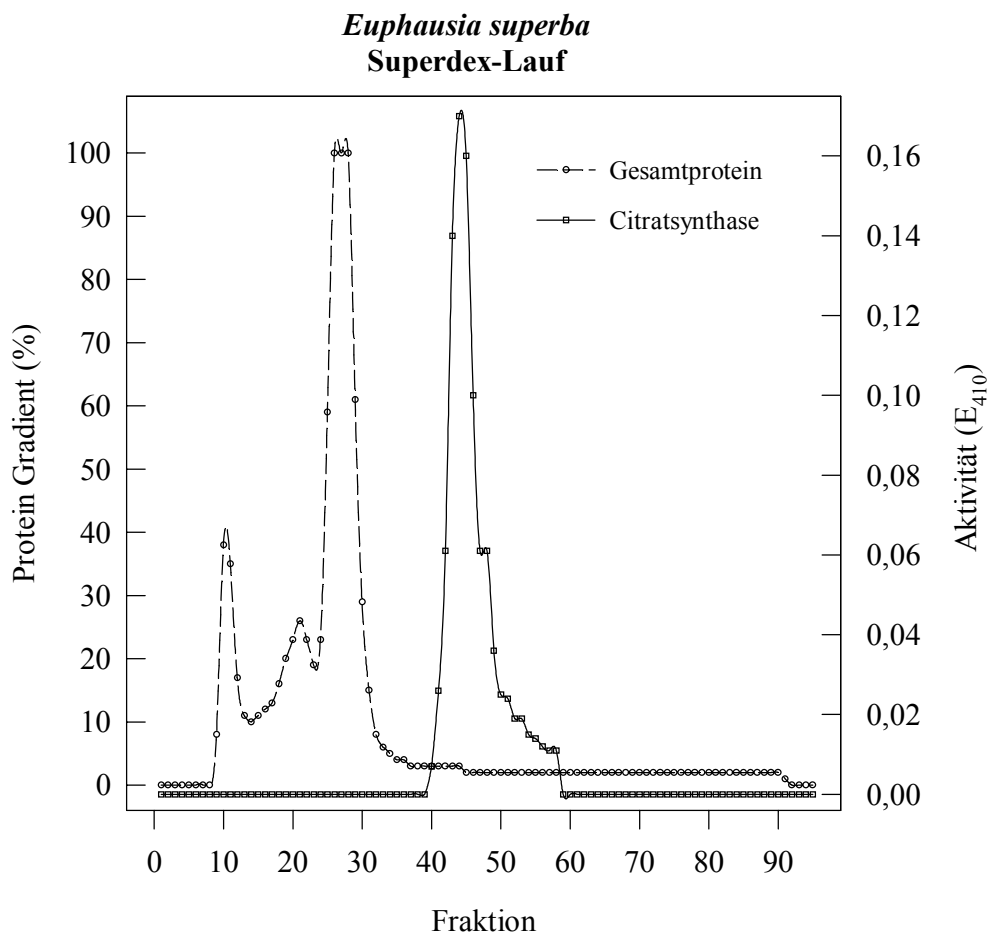


Abb.2: Aufreinigung der CS von *E. superba* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der QSepharoseHP-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen wie Kinetiken und Mengenbestimmungen verwendet. Dieser „Pool“ von *E. superba* wurde zusätzlich als Antigen für die Kaninchenimmunisierung verwendet, um den pAK, gerichtet gegen die CS von *E. superba*, zu gewinnen. Mit diesem „Pool“ wurden die Enzymmengenbestimmungen mit Hilfe des ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 44.

V.1.1.3 ResourceQ-Lauf von *M. norvegica* (med. und katt.)

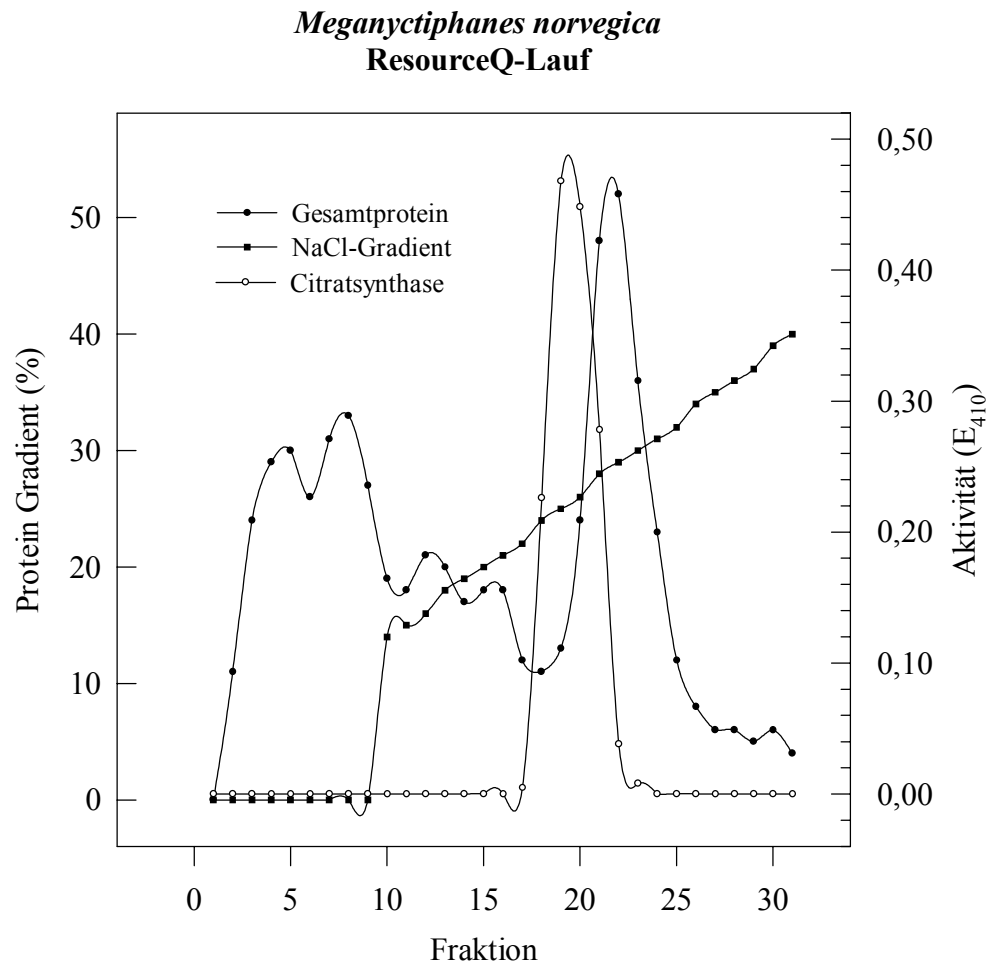


Abb.3: Aufreinigung der CS von *M. norvegica* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 19.

V.1.1.4 Superdex-Lauf von *M. norvegica* (med. und katt.)

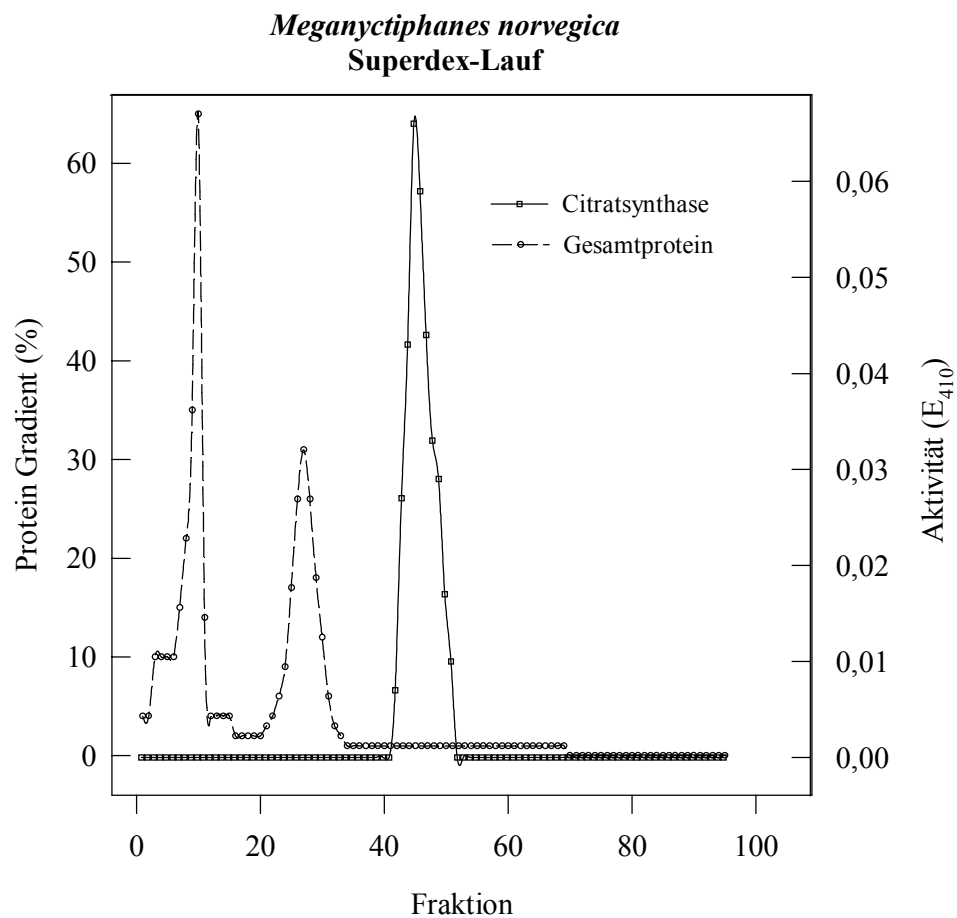


Abb.4: Aufreinigung der CS von *M. norvegica* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen wie Kinetiken und Mengenbestimmungen verwendet.

Aus diesem „Pool“ wurden auch die Enzymmengenbestimmungen im ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 45.

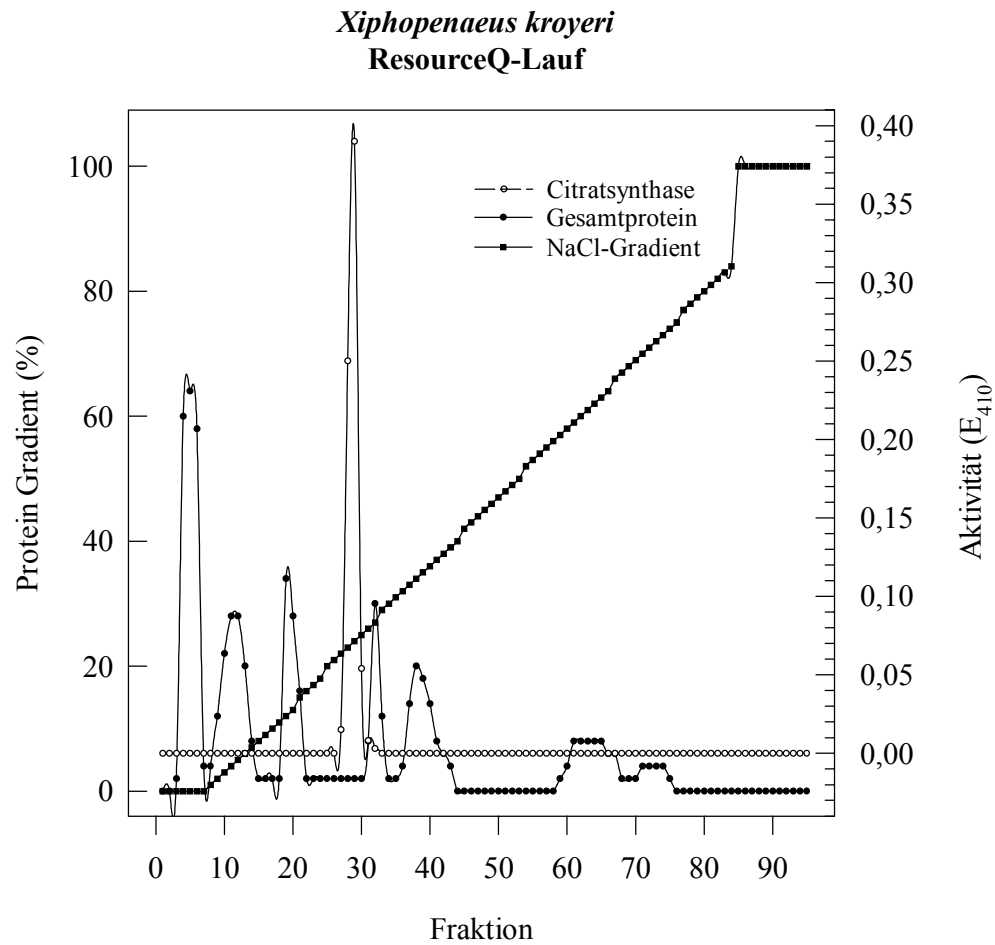
V.1.1.5 ResourceQ-Lauf von *X. kroyeri*

Abb.5: Aufreinigung der CS von *X. kroyeri* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 29.

V.1.1.6 Superdex-Lauf von *X. kroyeri*

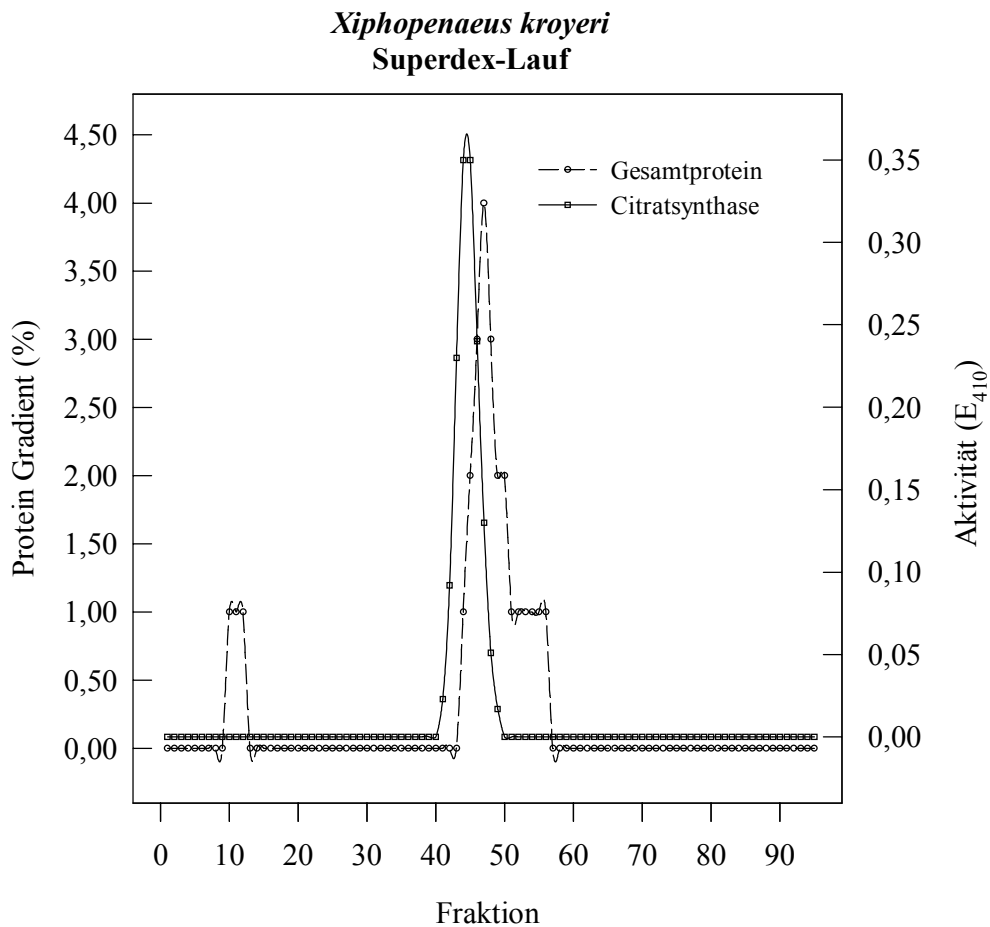


Abb.6: Aufreinigung der CS von *X. kroyeri* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen, wie Kinetiken und Mengenbestimmungen, verwendet.

Aus diesem „Pool“ wurden auch die Messungen für die Enzymmengenbestimmungen im ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 44/45.

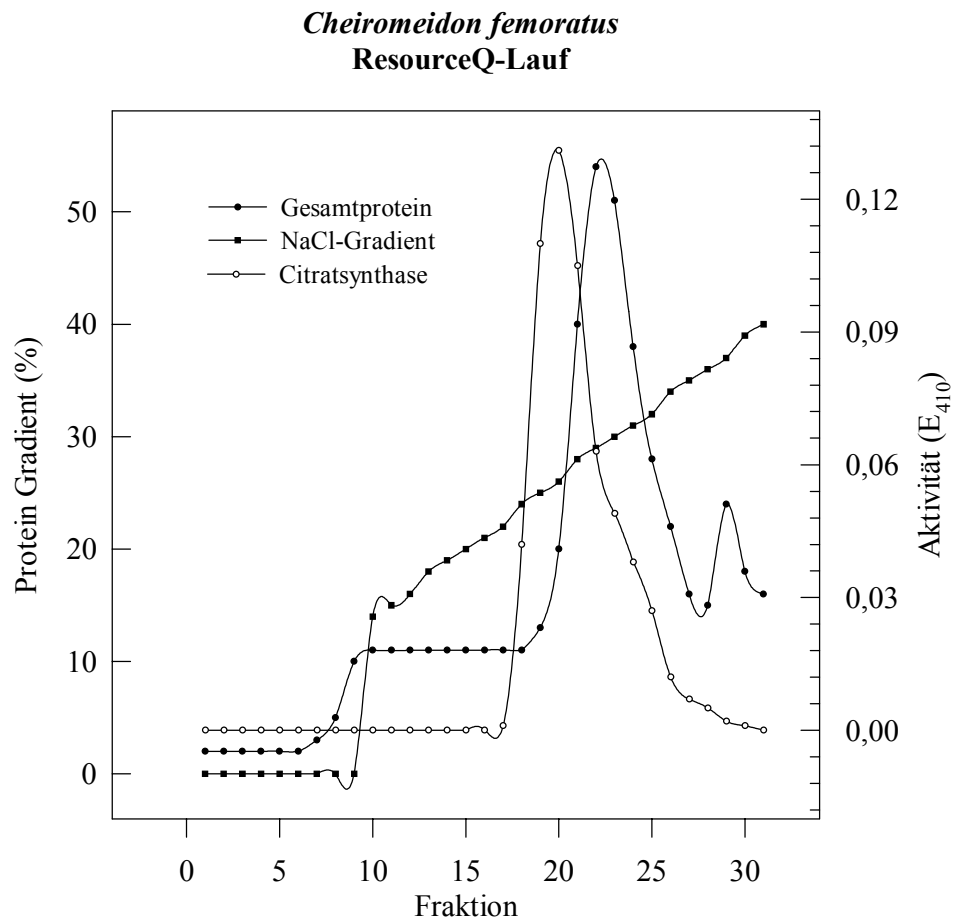
V.1.1.7 ResourceQ-Lauf von *C. femoratus*

Abb.7: Aufreinigung der CS von *C. femoratus* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 19.

V.1.1.8 Superdex-Lauf von *C. femoratus*

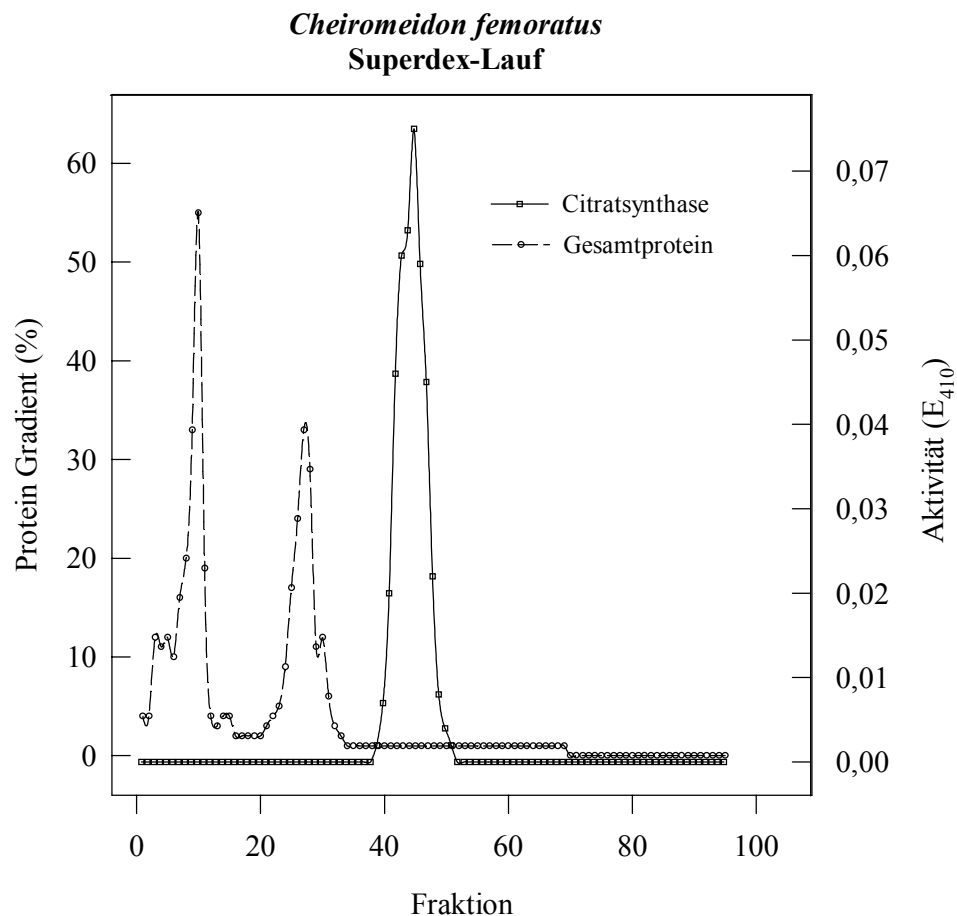


Abb.8: Aufreinigung der CS von *C. femoratus* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen wie Kinetiken und Mengenbestimmungen verwendet.

Aus diesem „Pool“ wurden auch die Enzymmengenbestimmungen im ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 45.

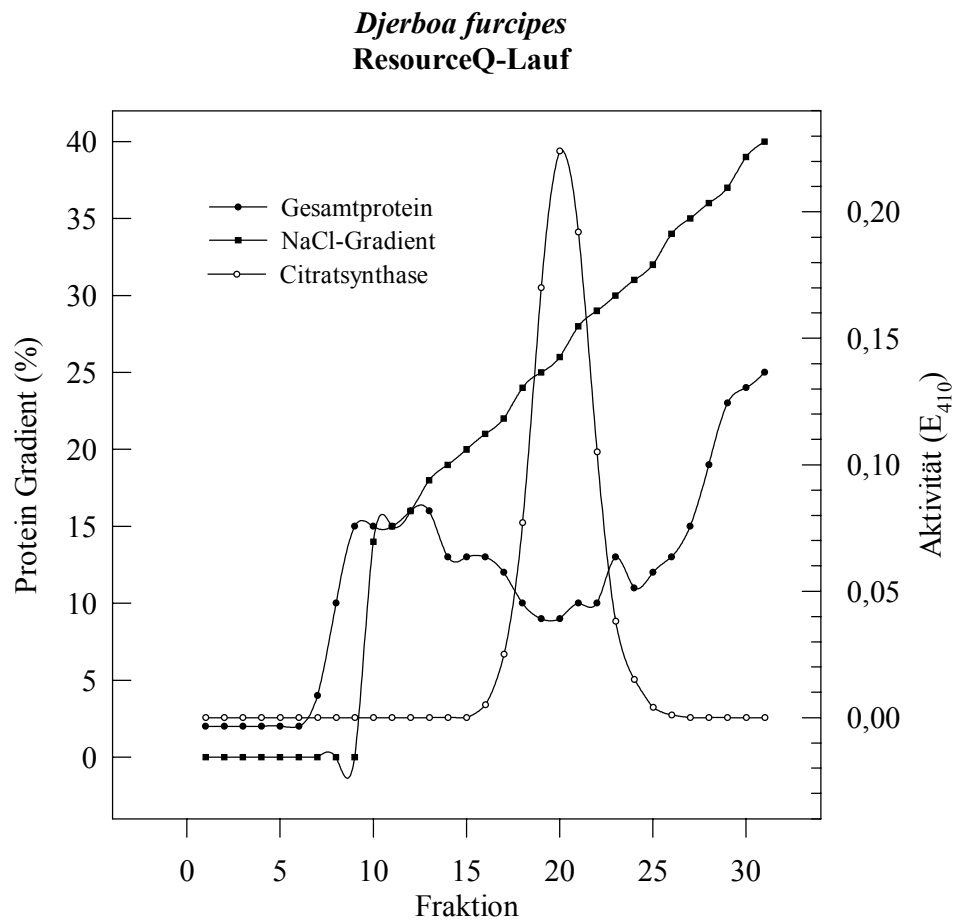
V.1.1.9 ResourceQ-Lauf von *D. furcipes*

Abb.9: Aufreinigung der CS von *D. furcipes* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 19.

V.1.1.10 Superdex-Lauf von *D. furcipes*

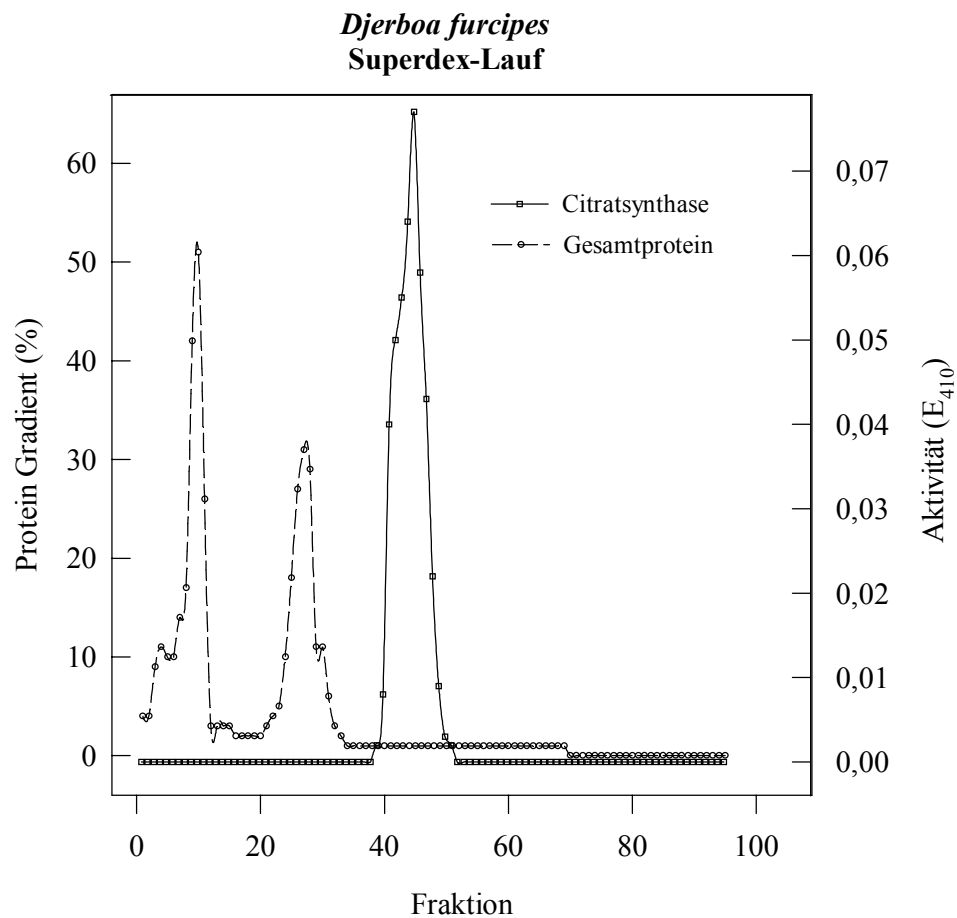


Abb.10: Aufreinigung der CS von *D. furcipes* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen wie Kinetiken und Mengenbestimmungen verwendet.

Aus diesem „Pool“ wurden auch die Enzymmengenbestimmungen im ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 45.

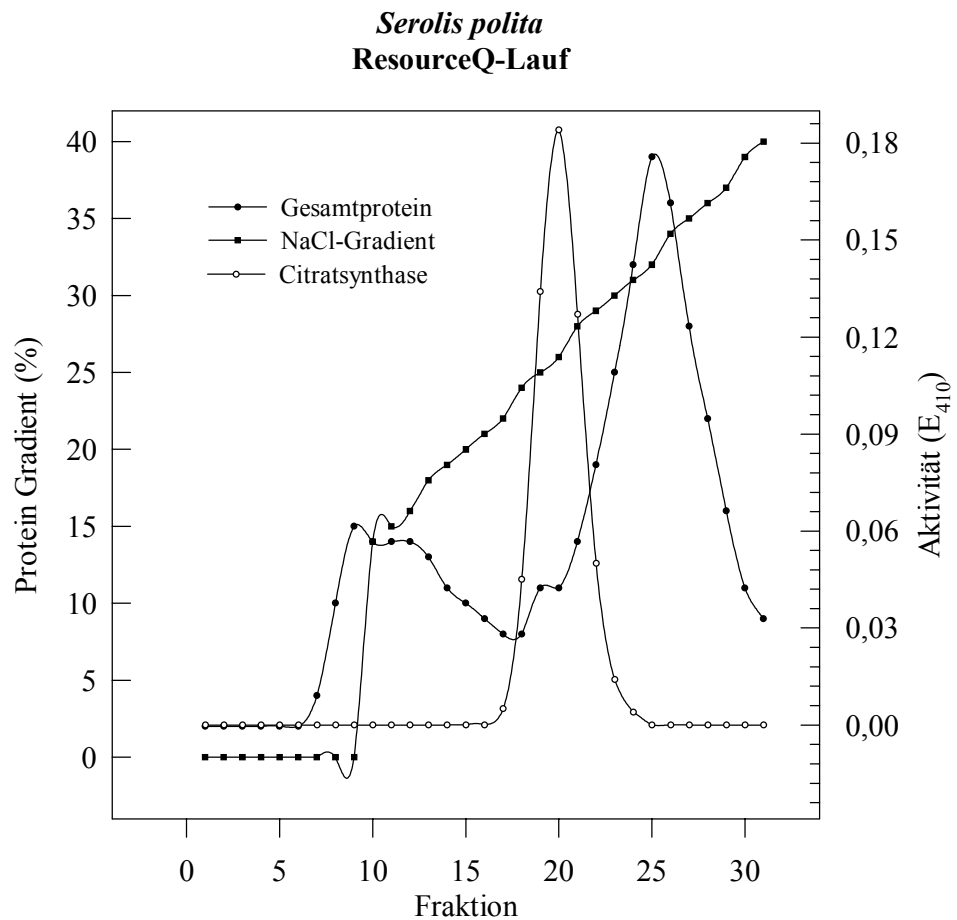
V.1.1.11 ResourceQ-Lauf von *S. polita*

Abb.11: Aufreinigung der CS von *S. polita* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die Molekularsiebsäule (Superdex) umgepuffert und verwendet.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 19.

V.1.1.12 Superdex-Lauf von *S. polita*

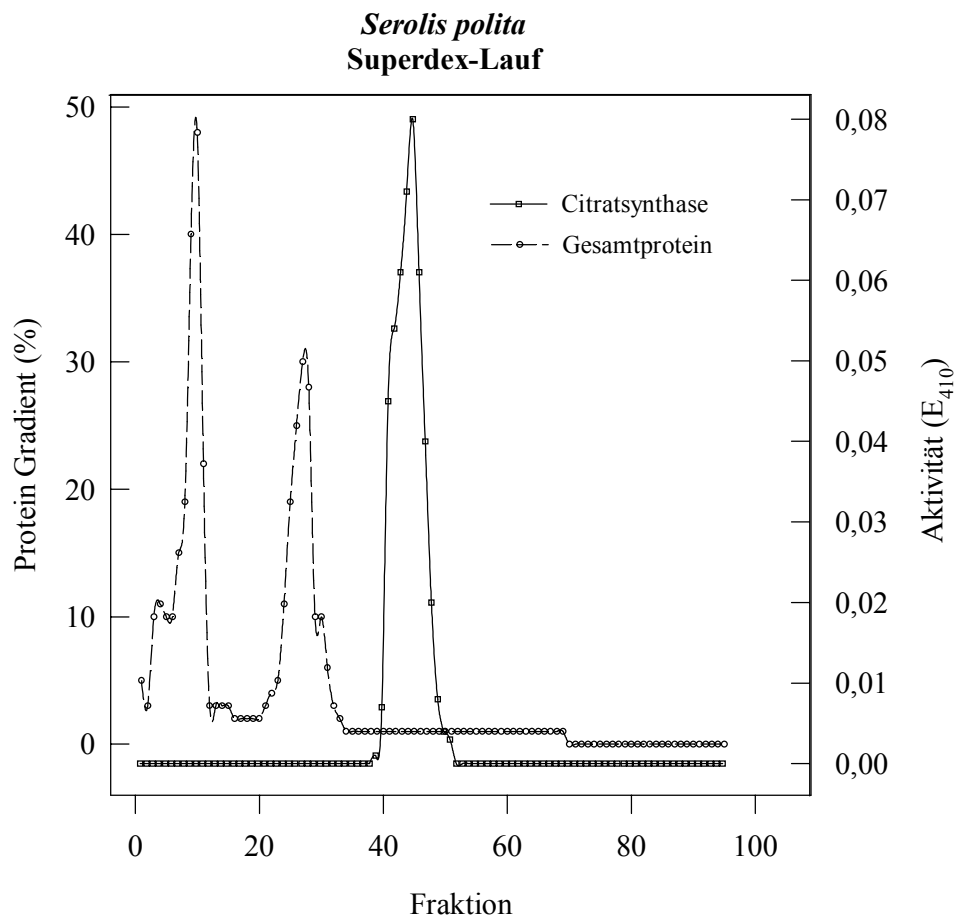


Abb.12: Aufreinigung der CS von *S. polita* über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule

Die Fraktionen mit den höchsten gemessenen Citratsynthaseaktivitäten wurden zu einem „Pool“ vereinigt, die Gesamtaktivität gemessen und für die weiteren Messungen wie Kinetiken und Mengenbestimmungen verwendet.

Aus diesem „Pool“ wurden auch die Enzymmengenbestimmungen im ELISA durchgeführt.

Die Fraktion mit der höchsten CS-Aktivität hatte die Nummer 45.

Die Aufreinigung war sehr erfolgreich. Sie betrug bei *C. femoratus*, *D. furcipes*, *S. polita*, *E. superba*, *M. norvegica* (katt.) und *M. norvegica* (med.) ca. das hundert- bis zweihundertfache und bei *X. kroyeri* das hundert- bis vierhundertfache der Ausgangsaktivität.

Berechnung der Enzymaufreinigung:

$$\frac{\text{Totalaktivität (U)}}{\text{Proteingehalt (mg/ml)}} = \text{spezifische Aktivität}$$

$$\text{Aufreinigung} = \frac{\text{spezifische Aktivität 1}}{\text{spezifische Aktivität 0}}$$

$$\text{Gesamtaufreinigung} = \frac{\text{spezifische Aktivität 3}}{\text{spezifische Aktivität 0}}$$

Spezifische Aktivität 0 = Extrakt

Spezifische Aktivität 1 = G25-„Pool“

Spezifische Aktivität 2 = QSepHP-„Pool“

Spezifische Aktivität 3 = Superdex-„Pool“

Um die Effizienz der Aufreinigung zu untersuchen wurden die aufgereinigten CS der untersuchten Crustaceenarten einer SDS-PAGE unterzogen. Das Ergebnis ist in Abb.13 zu sehen. Nach der Coomassie-Färbung der aufgereinigten Citratsynthasen ist jeweils nur eine CS-Bande zu sehen was eine sehr gute und effektive Aufreinigung anzeigt.

Aufreinigungseffizienz der CS der verschiedenen untersuchten Crustaceen

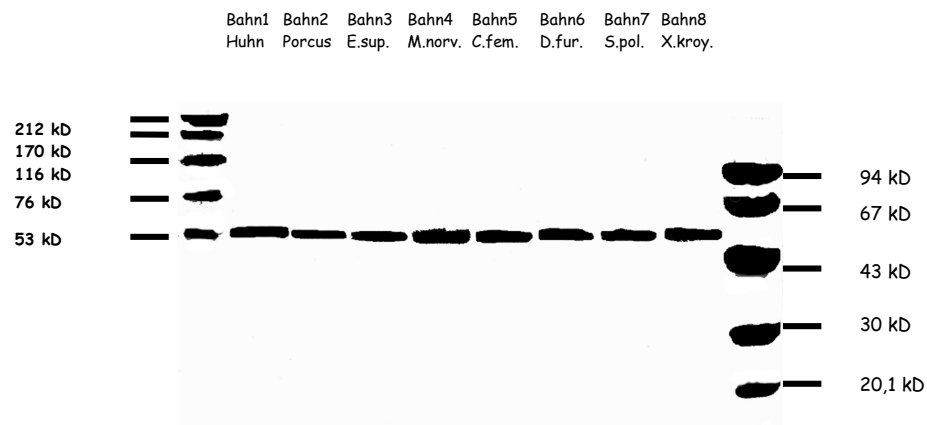


Abb.13: 10 % SDS-PAGE und Coomassie Blue-Färbung nach der Aufreinigung der CS über die FPLC- Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches und der Molekularsiebtechnik. Zur Überprüfung der Aufreinigungseffizienz der eingesetzten FPLC-Säulen. Bahn1: CS Huhn, Bahn2: CS Schwein, Bahn3: *E. superba*, Bahn4: *M. norvegica*, Bahn5: *C. femoratus*, Bahn6: *D. furcipes*, Bahn7: *S. polita*, Bahn8: *X. kroyeri* mit je 10 µg Protein pro Bahn.

Bevor mit den Kinetiken begonnen wurde, wurden zur Charakterisierung der CS das Molekulargewicht mit Hilfe der Eichung der Molekularsiebsäule (Superdex) und der R_f -Werte nach der SDS-PAGE mittels Standard-CS bestimmt.

V.2 Molekulargewichtsbestimmung der Citratsynthase der untersuchten Crustaceen mit Hilfe der Eichkurve der Superdex-Säule

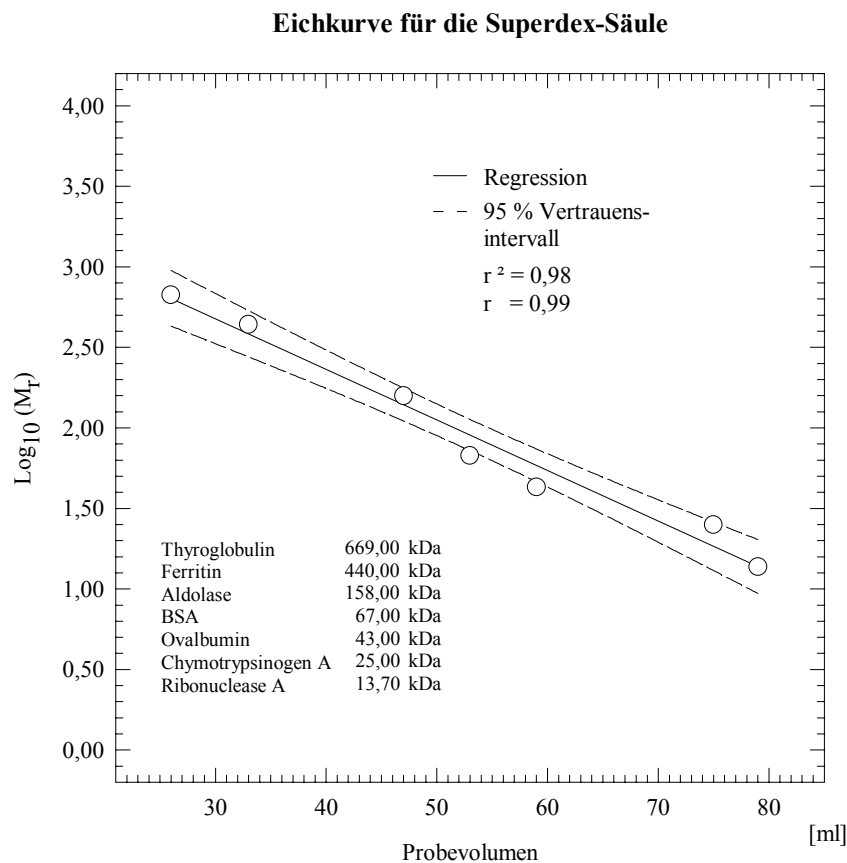


Abb.14: Eichkurve für die Superdex-Säule zur Bestimmung des Molekulargewichtes der CS verschiedener untersuchter Crustaceen

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Molekularsiebsäule (Superdex), wurde mit einer Eichkurve anhand von Standardproteinen durchgeführt. Die Berechnung erfolgte dann mit Hilfe einer linearen Regression nach folgender Formel:

$$10^{(\text{Konstante} + ((X\text{-Koeffizient}) * \text{Elutionsvolumen des Proteins}))}$$

Standardprot.	Elut. Vol. (ml)	MW (kDa)	log MW	Regressionsanalyse:	
Thyroglobulin	26	669,0	2,825	Konstante	3,62
Ferritin	33	440,0	2,643	Stdabw Y	0,11
Aldolase	47	158,0	2,199	R ²	0,98
BSA	53	67,0	1,826	Zahl der Meßwerte	7
Ovalbumin	59	43,0	1,633	Freiheitsgrade	5
Chymotrypsinogen A	75	25,0	1,398	R	0,99
Ribonuclease A	79	13,7	1,137	X-Koeffizient(en)	-0,03
				Stdabw d. Koeff.	0,0022
	Elut. Vol. (ml)	MW (kDa)	Stdabws		
<i>C. femoratus</i> (n=20)	50	112,32	29,35		
<i>D. furcipes</i> (n=20)	50	112,32	29,35		
<i>S. polita</i> (n=20)	51	104,48	27,86		
<i>E. superba</i> (n=20)	51	104,48	27,86		
<i>M. norvegica katt.</i> (n=20)	50	112,32	29,35		
<i>M. norvegica med.</i> (n=20)	50	112,32	29,35		
<i>X. kroyeri</i> (n=20)	51	104,48	27,86		
Taube (<i>Columba</i>) (n=20)	50	112,32	29,35		
Huhn (<i>Gallus</i>) (n=20)	50	112,32	29,35		
Schwein (<i>Porcus</i>) (n=20)	50	112,32	29,35		

Tab.2: Molekulargewichtsbestimmung der CS nach Eichkurve der Superdex-Säule

Die Molekulargewichte sind statistisch signifikant verschieden mit $p = 0,02$ nach Student's t-Test.

Diese auf den ersten Blick überraschende Tatsache läßt sich nur mit der Ungenauigkeit in der Bestimmung der Fraktionsvolumina erklären.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der R_f -Werte nach SDS-PAGE läßt den Schluß zu, daß die durch die Evolution hindurch hoch konservierte CS bei allen untersuchten Spezies annähernd das gleiche Molekulargewicht aufweist (Weitzmann, 1976).

V.3 Molekulargewichtsbestimmung der Citratsynthase anhand der R_f -Werte nach SDS-PAGE (Neville, 1971)

Eichkurve für die R_f -Werte

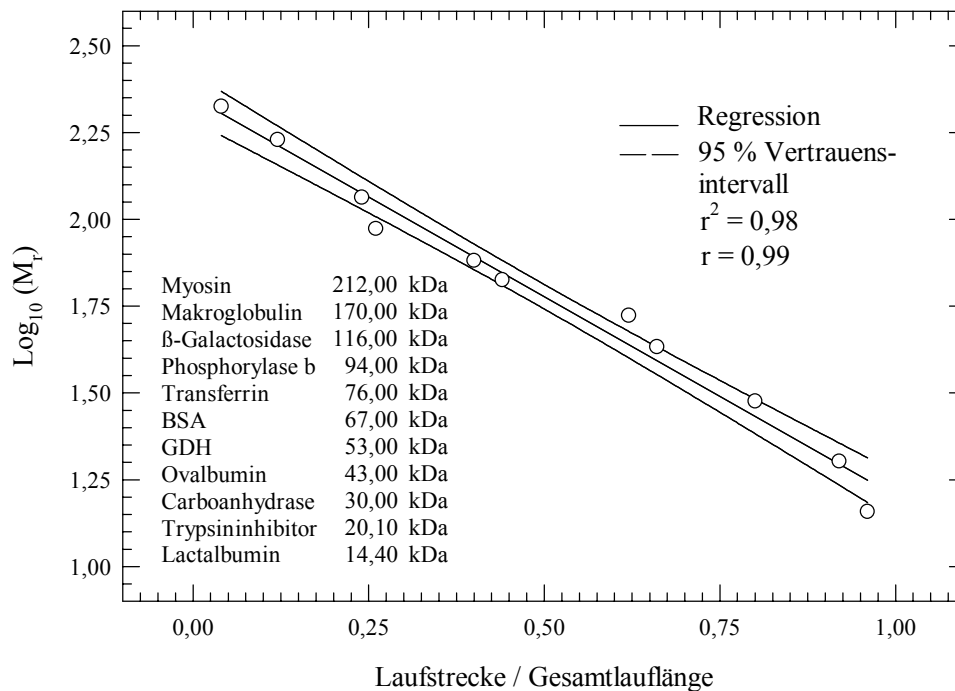


Abb.15: Eichkurve der R_f -Werte zur Bestimmung des Molekulargewichtes des CS verschiedener untersuchter Crustaceen

Die Molekulargewichtsbestimmung der SDS-PAGE erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve anhand der R_f -Werte von Standardproteinen. Als Vergleich wurden die CS von Taube, Huhn und Schwein mit aufgetragen. Die Berechnung erfolgte durch eine lineare Regression nach folgender Formel:

$$10^{(\text{Konstante} + ((X\text{-Koeffizient}) * \text{Laufstrecke Protein} / \text{Gesamtlänge Lauf}))}$$

Standardprotein	Lauf/Gesamtlänge	MW (kDa)	log MW	Gesamtlänge	Lauflänge
Myosin	0,06	212,0	2,326	5,00	0,30
Makroglobulin	0,11	170,0	2,230		0,55
β -Galactosidase	0,22	116,0	2,064		1,10
Phosphorylase b	0,26	94,0	1,973		1,30
Transferrin	0,38	76,0	1,881		1,90
BSA	0,44	67,0	1,826		2,20
GDH	0,56	53,0	1,724		2,80
Ovalbumin	0,66	43,0	1,633		3,30
Carboanhydrase	0,80	30,0	1,477		4,00
Trypsininhibitor	0,92	20,1	1,303		4,60
Lactalbumin	0,96	14,4	1,158		4,80

	Gel Probe	MW (kDa)	Stdabws.		
<i>C. femoratus</i> (n=20)	0,560	50,0	6,4		
<i>D. furcipes</i> (n=20)	0,560	50,0	6,4		
<i>S. polita</i> (n=20)	0,560	50,0	6,4	Regressionsanalyse:	
<i>E. superba</i> (n=20)	0,560	50,0	6,4	Konstante	2,35
<i>M. norvegica</i> (katt.) (n=20)	0,560	50,0	6,4	Stdabw Y	0,05
<i>M. norvegica</i> (med.) (n=20)	0,560	50,0	6,4	R ²	0,98
<i>X. kroyeri</i> (n=20)	0,560	50,0	6,4	Zahl der Meßwerte	11
Taube (<i>Columba</i>) (n=20)	0,560	50,0	6,4	Freiheitsgrade	9
Huhn (<i>Gallus</i>) (n=20)	0,560	50,0	6,4	R	0,99
Schwein (<i>Porcus</i>) (n=20)	0,560	50,0	6,4	X-Koeffizient(en)	-1,15
100 kDa-Bande	0,300	99,7	6,8	Stdabw. d. Koeff.	0,05

Tab.3: Molekulargewichtsbestimmung der CS nach R_f -Werten der SDS-PAGE

Bei der Bestimmung mit der Superdexsäule traten signifikante Unterschiede im Molekulargewicht auf. Diese Abweichungen wurden bei der R_f -Wert-Bestimmung nach der SDS-PAGE nicht gefunden. Hier lagen die Ergebnisse für alle CS bei 50 kDa. Die 100 kDa Bande, die dem nativen Molekulargewicht der CS entspricht und auch nach der SDS-Behandlung noch in Spuren vorhanden ist, wurde bei der R_f -Wert-Bestimmung mit 99,7 kDa bestimmt (Weitzmann, 1976).

Bei der SDS-PAGE zerfällt die als Dimer vorkommende CS durch die denaturierende Wirkung des Natriumdodecylsulfats (SDS) in zwei 50 kDa Monomere (Weitzmann, 1976).

V.4 Enzymkinetiken

V.4.1 Aktivierungsenergie und Kinetiken

Um die Eigenschaften der CS weiter zu charakterisieren, wurden die Michaelis Menten- und Inhibitorkinetiken sowie die Aktivierungsenergie und das Temperaturoptimum des Enzyms bestimmt. Ziel war es, die Regulationsmechanismen zur Temperaturadaptation auf der Basis von E_A , $V_{\max}$, K_i , und K_M der verschiedenen Crustaceen näher zu untersuchen und vergleichend gegenüberzustellen.

Das Resultat dieser Gegenüberstellung ist in Tab.4 dargestellt.

	E_A (KJ*mol ⁻¹)	$V_{\max}$ (mU*ml ⁻¹)	K_M (μmol*l ⁻¹)	K_i (mmol*l ⁻¹)	Tempopt.
<i>C. femoratus</i> (n=20)	31,54 ± 1,96	0,268 ± 0,004	12,1 ± 2,1	0,913 ± 0,166	40°C
<i>D. furcipes</i> (n=20)	33,15 ± 1,83	0,288 ± 0,001	11,3 ± 2,2	0,939 ± 0,132	40°C
<i>S. polita</i> (n=20)	33,59 ± 2,56	0,416 ± 0,009	12,3 ± 3,4	1,542 ± 0,315	40°C
<i>E. superba</i> (n=20)	33,63 ± 3,33	0,468 ± 0,003	16,4 ± 1,2	1,028 ± 0,018	35°C
<i>M. norvegica(katt.)</i> (n=20)	38,75 ± 0,45	0,140 ± 0,001	18,1 ± 1,3	0,889 ± 0,029	35°C
<i>M. norvegica(med.)</i> (n=20)	39,20 ± 0,65	0,168 ± 0,020	19,2 ± 1,1	0,891 ± 0,053	35°C
<i>X. kroyeri</i> (n=20)	35,34 ± 1,63	0,337 ± 0,053	11,7 ± 3,2	1,319 ± 0,427	40°C

Tab.4: $V_{\max}$, E_A , K_M , K_i und Temperaturoptimum der verschiedenen untersuchten Crustaceen

Auf den folgenden Seiten werden nun die Signifikanztests und die Auswertung der untersuchten Parameter im einzelnen dargestellt.

V.4.1.1 Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A

Die Aktivierungsenergie E_A ist ein Maß für die Energie, die notwendig ist, um Enzym und Substrat in das resultierende Produkt umzusetzen. Je geringer die benötigte E_A ist, desto energiesparender kann der Umsatz erfolgen.

Bei der Ermittlung der E_A , die zum Umsatz von Substrat mit der CS benötigt wird, wurden für die polaren und tropischen stenothermen Crustaceen annähernd gleiche Werte gefunden. Die mittleren Werte für die E_A liegen bei den polaren Crustaceen niedriger als bei den tropischen, aber vergleichende Signifikanztests ergaben bei einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ keine signifikanten Unterschiede. Signifikante Unterschiede traten beim Vergleich mit den poikilothermen Vertretern *M. norvegica katt.* und *M. norvegica med.* auf mit $p \leq 0,02$ (s. Tab.5).

Signifikanztests der E_A der untersuchten Crustaceen:

p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,45	0,97	0,34	0,003	0,001	0,24
<i>D. furcipes</i>	0,45	-----	0,53	0,24	0,02	0,004	0,10
<i>S. polita</i>	0,97	0,53	-----	0,85	0,004	0,001	0,46
<i>E. superba</i>	0,34	0,24	0,85	-----	0,01	0,005	0,13
<i>M. norv. katt.</i>	0,003	0,02	0,004	0,01	-----	0,39	0,003
<i>M. norv. med.</i>	0,001	0,004	0,001	0,005	0,39	-----	0,003
<i>X. kroyeri</i>	0,24	0,10	0,46	0,13	0,003	0,003	-----

Tab.5: Signifikanztests (t-Test mit $p \leq 0,05$) der E_A der untersuchten Crustaceen

V.4.1.2 Bestimmung der Kinetiken

V.4.1.2.1 Bestimmung der maximalen Substratumsatzrate $V_{\max}$

Der $V_{\max}$ -Wert zeigt die maximale Substratumsatzrate an. Je höher der Wert ist, desto mehr Substrat wurde vom Enzym umgesetzt.

Die Untersuchungen zeigten, daß sich *C. femoratus* bezogen auf die $V_{\max}$ außer im Vergleich mit *D. furcipes* ($p = 0,08$; s. Tab.6) signifikant von allen untersuchten Crustaceen unterscheidet ($p = 0,001-0,005$; s. Tab.6).

D. furcipes und *S. polita* unterscheiden sich im Vergleich mit *X. kroyeri* bezogen auf die $V_{\max}$ nicht signifikant ($p = 0,20$; bzw. $p = 0,30$ s. Tab.6) und sind von den anderen untersuchten Crustaceen signifikant verschieden ($p = 0,001$; s. Tab.6).

M. norvegica katt. und *M. norvegica med.* sind bezogen auf die $V_{\max}$ nicht signifikant voneinander verschieden ($p = 0,07$; s. Tab.6), unterscheiden sich aber signifikant von den anderen untersuchten Crustaceen ($p = 0,001-0,003$; s. Tab.6).

X. kroyeri ist bezogen auf die $V_{\max}$ nicht signifikant verschieden von *S. polita* ($p = 0,30$; s. Tab.6), unterscheidet sich aber signifikant von allen anderen untersuchten Crustaceen ($p = 0,03-0,006$; s. Tab.6).

Signifikanztests der $V_{\max}$ der untersuchten Crustaceen:

p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,08	0,001	0,001	0,001	0,001	0,04
<i>D. furcipes</i>	0,08	-----	0,001	0,001	0,001	0,001	0,03
<i>S. polita</i>	0,001	0,001	-----	0,001	0,001	0,001	0,30
<i>E. superba</i>	0,001	0,001	0,001	-----	0,001	0,001	0,006
<i>M. norv. katt.</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	-----	0,07	0,003
<i>M. norv. med.</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,07	-----	0,003
<i>X. kroyeri</i>	0,04	0,03	0,30	0,006	0,003	0,003	-----

Tab.6: Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) der $V_{\max}$ der untersuchten Crustaceen

V.4.1.2.2 Bestimmung der Inhibitorkinetik K_i

Der K_i -Wert ist ein Kennwert für die Hemmung der CS-Reaktion durch ATP in Form einer negativen Rückkopplung. Je höher der Wert ist, desto später setzt die Hemmwirkung von ATP ein und desto mehr Substrat kann vom Enzym umgesetzt werden.

C. femoratus unterscheidet sich bezogen auf den K_i -Wert nicht signifikant von *D. furcipes* ($p = 0,95$; s. Tab.7), *E. superba* ($p = 0,26$; s. Tab.7) und *X. kroyeri* ($p = 0,26$; s. Tab.7). Alle anderen untersuchten Crustaceen unterscheiden sich dagegen signifikant von *C. femoratus* bezogen auf den K_i -Wert ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.7).

S. polita unterscheidet sich nicht signifikant von *X. kroyeri* bezogen auf den K_i -Wert ($p = 0,52$; s. Tab.7) und ist von allen anderen untersuchten Crustaceen signifikant verschieden ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.7).

E. superba unterscheidet sich bezogen auf den K_i -Wert nicht signifikant von *C. femoratus* ($p = 0,26$; s. Tab.7), *D. furcipes* ($p = 0,17$; s. Tab.7) und *X. kroyeri* ($p = 0,34$; s. Tab.7). Von den übrigen untersuchten Crustaceen unterscheidet sich *E. superba* signifikant ($p = 0,001-0,03$; s. Tab.7).

M. norvegica katt. unterscheidet sich bezogen auf den K_i -Wert nicht signifikant von *M. norvegica med.* ($p = 0,69$; s. Tab.7) und *X. kroyeri* ($p = 0,10$; s. Tab.7). Alle anderen untersuchten Crustaceen unterscheiden sich signifikant von *M. norvegica katt.* ($p = 0,001-0,03$; s. Tab.7).

M. norvegica katt. unterscheidet sich bezogen auf den K_i -Wert nicht signifikant von *M. norvegica med.* ($p = 0,69$; s. Tab.7) und *X. kroyeri* ($p = 0,13$; s. Tab.7). Alle anderen untersuchten Crustaceen unterscheiden sich signifikant von *M. norvegica katt.* ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.7).

X. kroyeri unterscheidet sich bezogen auf den K_i -Wert signifikant von allen untersuchten Crustaceen ($p = 0,01-0,05$; s. Tab.7).

Signifikanztests der K_i der untersuchten Crustaceen:

p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,95	0,006	0,26	0,03	0,04	0,03
<i>D. furcipes</i>	0,95	-----	0,005	0,17	0,02	0,04	0,03
<i>S. polita</i>	0,006	0,005	-----	0,03	0,03	0,001	0,05
<i>E. superba</i>	0,26	0,17	0,03	-----	0,001	0,03	0,03
<i>M. norv. katt.</i>	0,03	0,02	0,03	0,001	-----	0,69	0,01
<i>M. norv. med.</i>	0,04	0,04	0,001	0,03	0,69	-----	0,01
<i>X. kroyeri</i>	0,03	0,03	0,05	0,03	0,01	0,01	-----

Tab.7: Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des K_i der untersuchten Crustaceen

V.4.1.2.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik K_M

Der K_M -Wert läßt Schlüsse über die Substrataffinität zwischen Enzym und Substrat zu. Ein niedriger Wert bedeutet eine hohe Substrataffinität des Enzyms, und ermöglicht so einen schnelleren und effektiveren Substratumsatz.

C. femoratus unterscheidet sich bezogen auf den K_M -Wert nicht signifikant von *D. furcipes* ($p = 0,13$; s. Tab.8) und *S. polita* ($p = 0,34$; s. Tab.8). Alle anderen untersuchten Crustaceen sind von *C. femoratus* signifikant verschieden ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.8).

D. furcipes unterscheidet sich bezogen auf den K_M -Wert nicht signifikant von *C. femoratus* ($p = 0,13$; s. Tab.8) und *S. polita* ($p = 0,08$; s. Tab.8). Alle anderen untersuchten Crustaceen sind bezogen auf den K_M -Wert signifikant verschieden ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.8).

S. polita unterscheidet sich bezogen auf den K_M -Wert nicht signifikant von *C. femoratus* ($p = 0,34$; s. Tab.8) und *D. furcipes* ($p = 0,08$; s. Tab.8). Alle anderen untersuchten Crustaceen sind signifikant verschieden ($p = 0,002-0,04$; s. Tab.8).

E. superba unterscheidet sich signifikant von allen untersuchten Crustaceen ($p = 0,001-0,04$; s. Tab.8).

M. norvegica katt. unterscheidet sich bezogen auf den K_M -Wert nicht signifikant von *M. norvegica med.* ($p = 0,14$; s. Tab.8). Alle anderen untersuchten Crustaceen sind signifikant verschieden ($p = 0,001-0,02$; s. Tab.8).

M. norvegica med. unterscheidet sich bezogen auf den K_M -Wert nicht signifikant von *M. norvegica katt.* ($p = 0,14$; s. Tab.8). Alle anderen untersuchten Crustaceen sind signifikant verschieden. ($p = 0,001-0,005$; s. Tab.8).

X. kroyeri unterscheidet sich bezogen auf dem K_M -Wert signifikant von *M. norvegica katt.* und *med.* ($p = 0,003$; s. Tab.8) und nicht signifikant von *C. femoratus*, *D. furcipes* und *S. polita* ($p = 0,06$; s. Tab.8).

Signifikanztests der K_M der untersuchten Crustaceen:

p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,13	0,34	0,002	0,001	0,001	0,06
<i>D. furcipes</i>	0,13	-----	0,08	0,001	0,001	0,001	0,06
<i>S. polita</i>	0,34	0,08	-----	0,04	0,003	0,002	0,06
<i>E. superba</i>	0,002	0,001	0,04	-----	0,02	0,005	0,003
<i>M. norv. katt.</i>	0,001	0,001	0,003	0,02	-----	0,14	0,003
<i>M. norv. med.</i>	0,001	0,001	0,002	0,005	0,14	-----	0,003
<i>X. kroyeri</i>	0,06	0,06	0,06	0,003	0,003	0,003	-----

Tab.8: Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des K_M der untersuchten Crustaceen

V.4.1.2.4 Bestimmung des Temperaturoptimums

Das Temperaturoptimum eines Enzyms ist die Temperatur bei der das Enzym die höchste $V_{\max}$ erreicht, also die Temperatur bei der die maximale Substratumsatzrate erreicht wird. Sie liegt bei allen untersuchten Crustaceen weit über der ambienten Temperatur, der Temperatur des Lebensraumes in der die Tiere vorkommen. Die Kurvenverläufe sind stets ansteigend und fallen bei Überschreitung des Temperaturoptimums sehr schnell steil ab.

Es wurden bei den untersuchten Crustaceen nur zwei unterschiedliche Temperaturoptima gefunden. Zum einen 35 °C bei *E. superba*, *M. norvegica katt.* und *med.* zum anderen 40 °C bei *C. femoratus*, *D. furcipes*, *S. polita* und *X. kroyeri*.

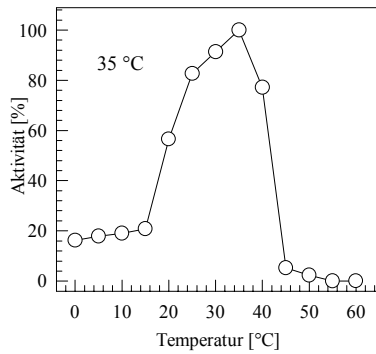
Bei allen Wiederholungsversuchen (n=20; s. Tab.4) wurden stets dieselben Temperaturoptima gefunden und die beiden Temperaturoptima sind signifikant verschieden ($p = 0,001$; s. Tab.9).

Signifikanztests der Temperaturoptima der untersuchten Crustaceen:

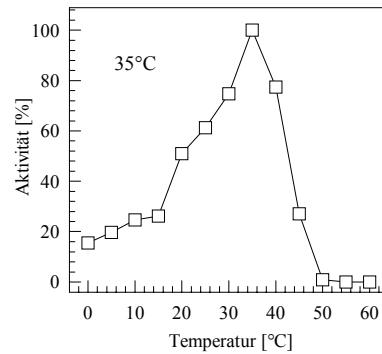
p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,969	0,969	0,001	0,001	0,001	0,969
<i>D. furcipes</i>	0,969	-----	0,969	0,001	0,001	0,001	0,969
<i>S. polita</i>	0,969	0,969	-----	0,001	0,001	0,001	0,969
<i>E. superba</i>	0,001	0,001	0,001	-----	0,969	0,969	0,001
<i>M. norv. katt.</i>	0,001	0,001	0,001	0,969	-----	0,969	0,001
<i>M. norv. med.</i>	0,001	0,001	0,001	0,969	0,969	-----	0,001
<i>X. kroyeri</i>	0,969	0,969	0,969	0,001	0,001	0,001	-----

Tab.9: Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des Temperaturoptimums der untersuchten Crustaceen

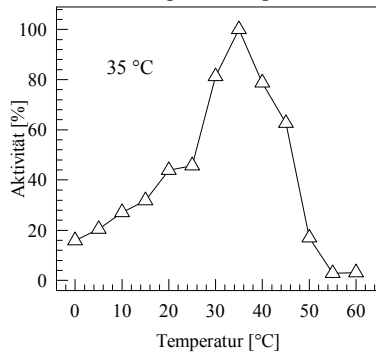
**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Meganyctiphanes norv. med.***



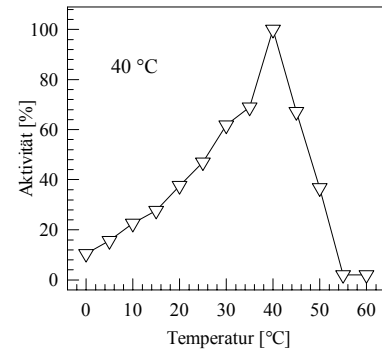
**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Meganyctiphanes norv. katt.***



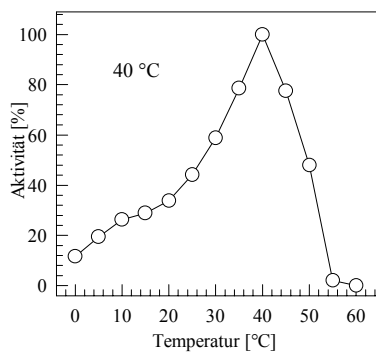
**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Euphausia superba***



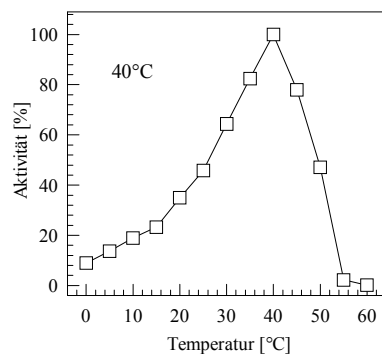
**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Xiphopenaeus kroyeri***



**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Cheirimedon femoratus***



**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Djerboa furcipes***



**Temperaturoptimum der Citratsynthase
von *Serolis polita***

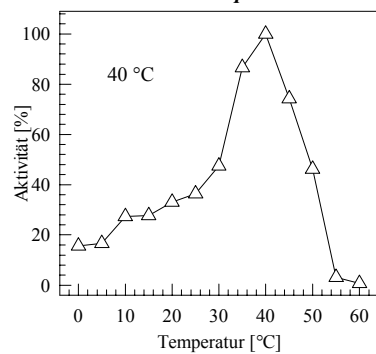


Abb.16: Temperaturoptima der CS der einzelnen untersuchten Crustaceen

V.4.1.2.5 Hitzestabilitätsuntersuchungen der CS aller untersuchten Crustaceen

Nachdem mit der Bestimmung des Temperaturoptimums die Abhängigkeit der CS-Aktivität von der Temperatur gezeigt wurde (es gab zwei Temperaturoptima eines für Krill bei 35 °C und eines für die Amphi- und Isopoden sowie die penaeide Garnele bei 40 °C), wurde die Hitzestabilität der CS näher untersucht.

Dafür gibt es zwei Möglichkeiten des Nachweises. Zum einen über eine zeitliche Komponente: Die CS-Aktivität nimmt bei Temperaturen über 30 °C und Inkubationszeiten über 30 min s. a. Vetter (1992) stark ab. Zum zweiten eine Temperaturkomponente: Die CS-Aktivität nimmt bei Temperaturen ab 5 °C über dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms und Standardinkubationszeiten von 5 min sofort um annähernd 50 % ab (s. Abb.17). Nach weiteren 5 min ist bereits noch eine meßbare CS-Aktivität nachzuweisen.

Diese Aktivitätsabnahme ist eindeutig auf die thermische Instabilität der CS zurückzuführen. Der Zusammenhang zwischen Hitzestabilität und temperaturabhängiger Aktivität gilt für alle untersuchten Spezies. Da es zwei Temperaturoptima gab, wurden auch bei den Hitzestabilitätsmessungen zwei verschiedene Inkubationstemperaturen, nämlich 40 °C bei Krill und 45 °C bei den Amphi- und Isopoden sowie der penaeiden Garnele, verwendet.

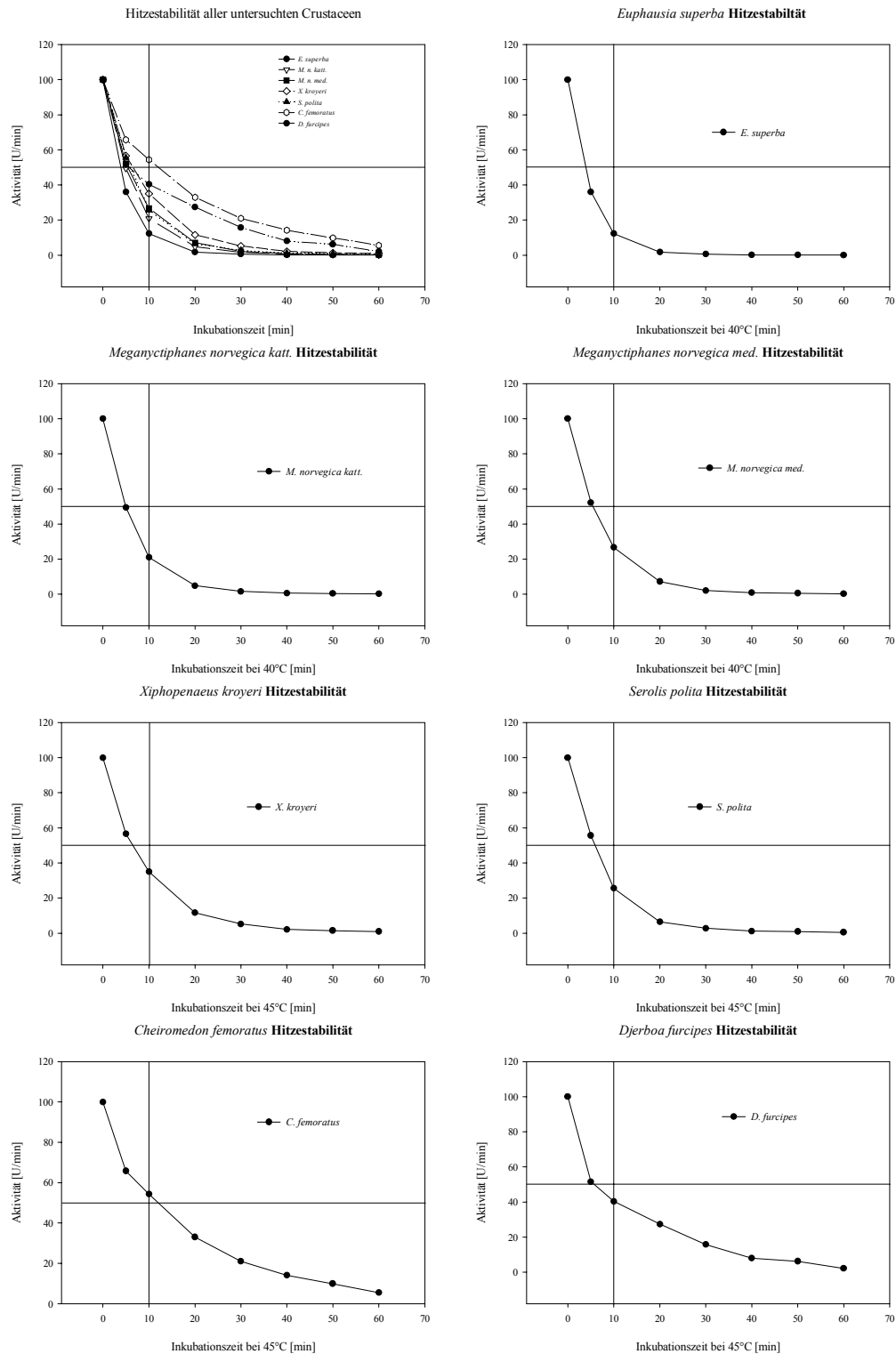


Abb.17: Hitzestabilitätsuntersuchungen der CS der einzelnen untersuchten Crustaceen. Angegeben sind eine Gesamtübersicht und die Einzelmessungen.

V.4.2 Lineweaver-Burk- und Michaelis-Menten-Diagramme der CS-Kinetiken unter dem Einfluß von ATP der untersuchten Crustaceen

Nach Stitt (1984) wird die CS durch ATP gehemmt. Um den Einfluß von ATP als Inhibitor näher zu untersuchen, wurden die für die K_M und V_{max} berechneten Werte in einem Lineweaver-Burk Diagramm aufgetragen und der Verlauf der resultierenden Geraden bei verschiedenen ATP-Konzentrationen verglichen. Bei einer kompetitiven Hemmung bleibt V_{max} dabei annähernd konstant, und die Geraden rotieren mit steigender Inhibitor-Konzentration entgegen den Uhrzeigersinn um den Punkt $1/V_{max}$. Im Fall der nicht kompetitiven Hemmung ergibt sich eine Parallelverschiebung der Geraden nach links. Vergleichend wurden dieselben Daten in einem Michaelis-Menten Diagramm aufgetragen.

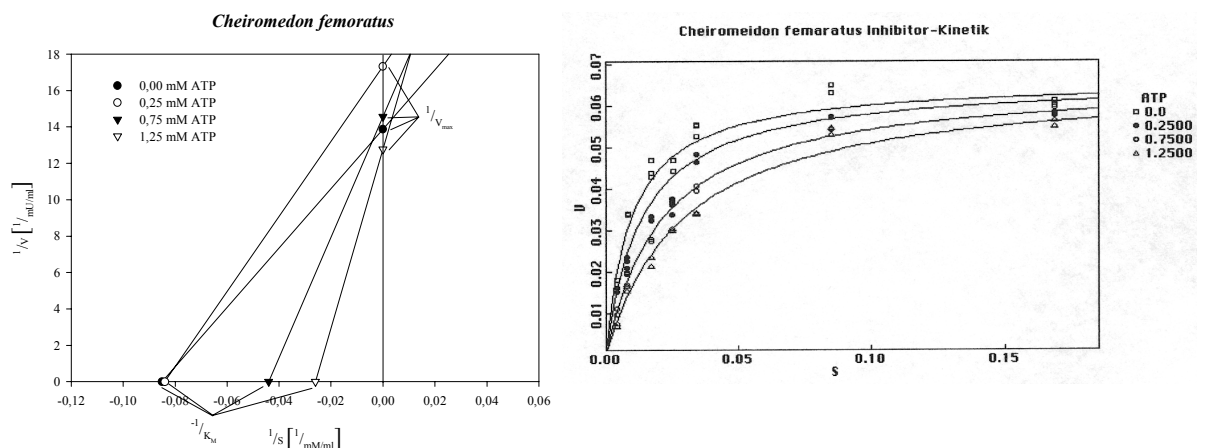


Abb.18: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *C. femoratus* unter Einfluß von ATP

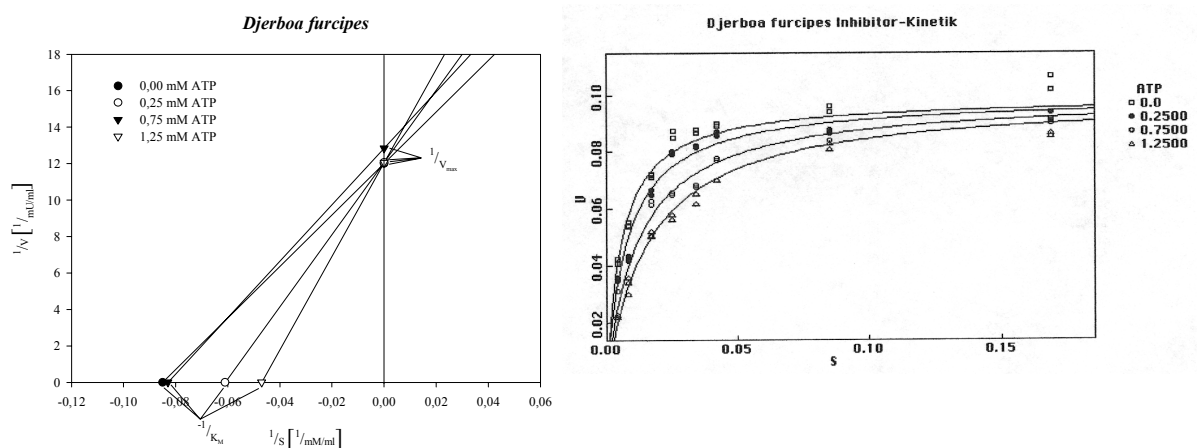


Abb.19: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *D. furcipes* unter Einfluß von ATP

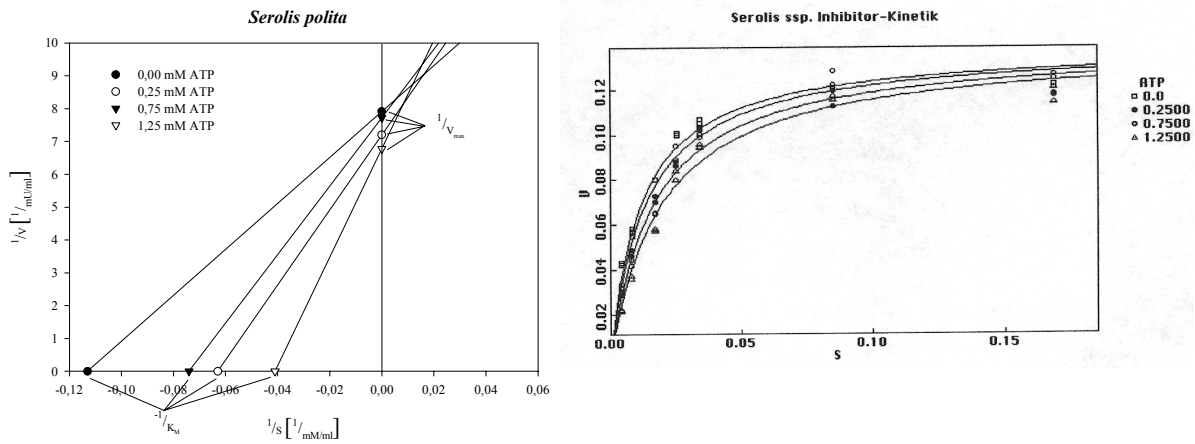


Abb.20: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *S. polita* unter Einfluß von ATP

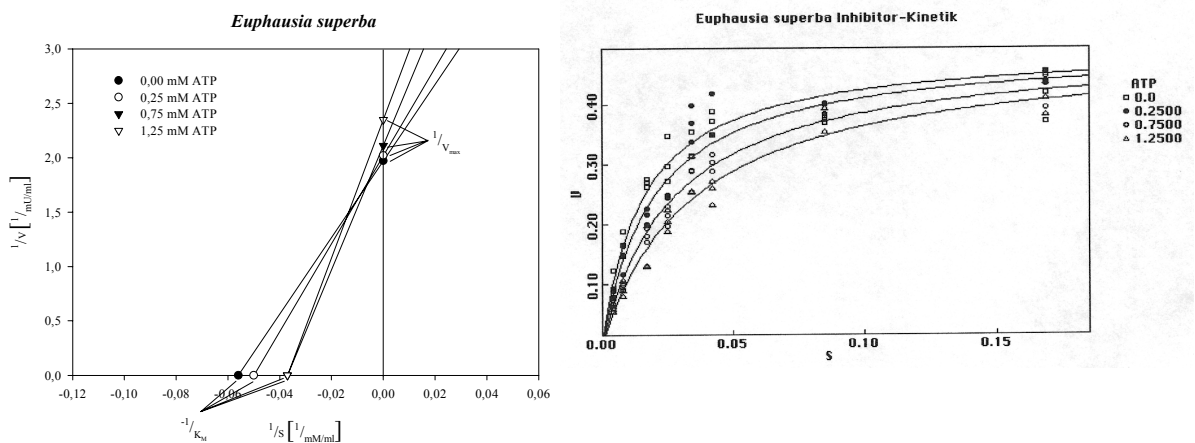


Abb.21: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *E. superba* unter Einfluß von ATP

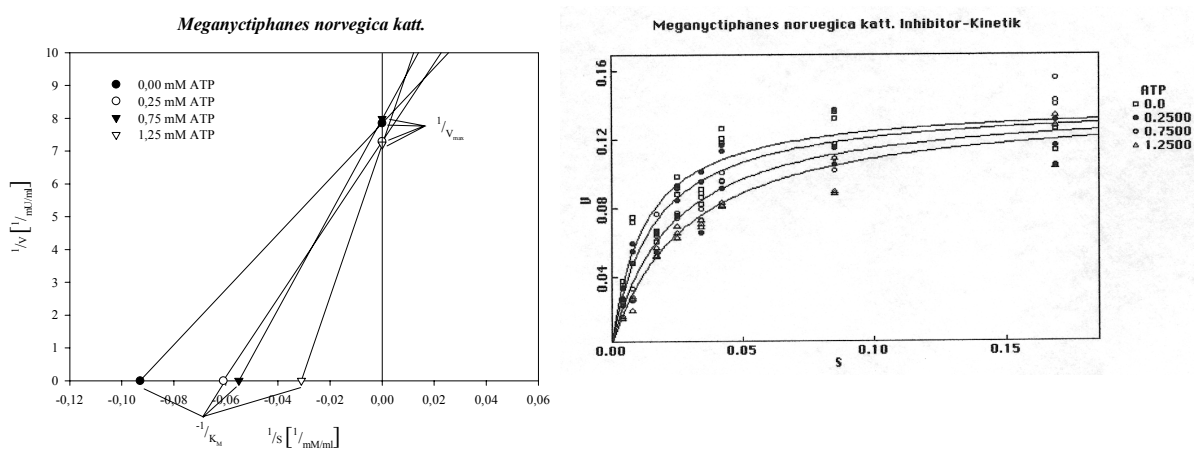


Abb.22: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *M. norvegica* (katt.) unter Einfluß von ATP

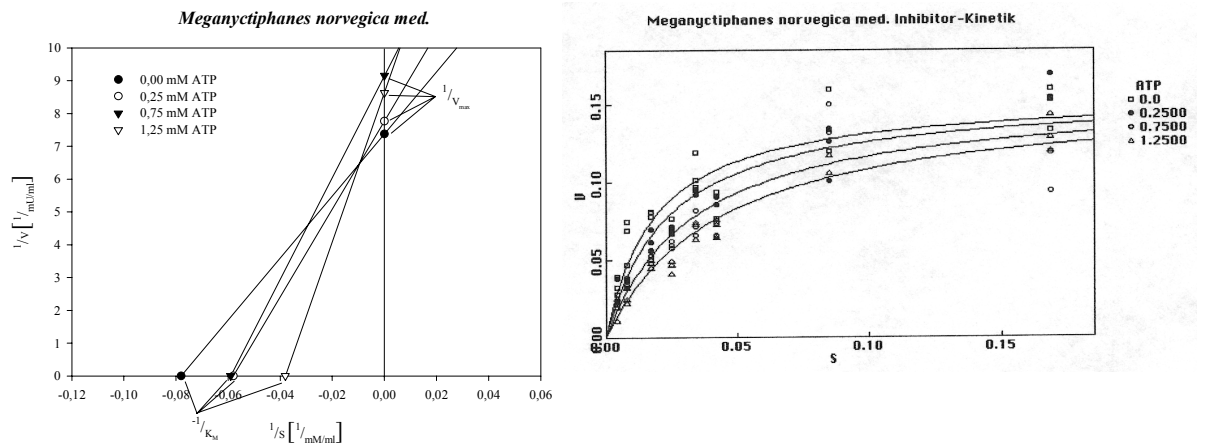


Abb.23: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *M. norvegica* (med.) unter Einfluß von ATP

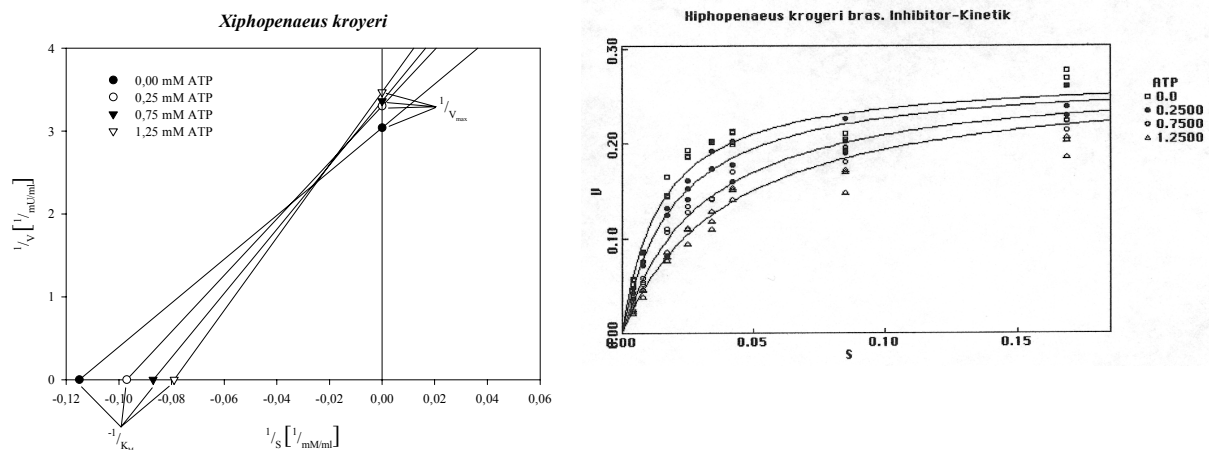


Abb.24: Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von *X. kroyeri* unter Einfluß von ATP

Als Ergebnis der Darstellung läßt sich trotz einer gewissen Streuung um den V_{max} -Wert sagen, daß es sich wie bei Stitt (1984) beschrieben, auch hier um eine kompetitive Hemmung der jeweiligen CS der untersuchten Crustaceen handelt. Die bei Vetter (1992) beschriebene anfängliche Aktivierung der CS durch geringe ATP-Mengen erkennbar durch eine Parallelverschiebung der Lineweaver-Burk Geraden bei 0,20 mM ATP im Vergleich zu 0,00 mM ATP ließ sich anhand der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen nicht nachvollziehen. Es wurden keine ATP-Konzentrationen unter 0,25 mM für die K_i -Bestimmung eingesetzt, wodurch alle bei den Messungen erhaltenen Werte für die K_i -Bestimmung mit einbezogen werden konnten. Dies erleichterte auch die Durchführung der Iterationen bei der Bestimmung der einzelnen kinetischen Parameter mit Hilfe des Programmes Leonora (Cornish Bowden, Marseille Frankreich) aus den Michaelis Menten Diagrammen.

Teil II: Quantitative Bestimmung der Citratsynthase

V.5 Resultate der Immunisierung eines Kaninchens mit aufgereinigter CS von *E. superba*

V.5.1 Immunisierungseffizienz

Um mit Hilfe eines selbst entwickelten ELISA die Quantifizierung der CS-Menge durchführen zu können, mußte ein AK hergestellt werden, der gegen die CS gerichtet war. Dazu wurde am Anatomischen Institut der Universität Kiel ein Kaninchen mit aufgereinigter CS von *E. superba* immunisiert (s. IV.3.7.4). Das aus dem Blut des Kaninchens gewonnene polyklonale Serum wurde auf Spezifität gegen Citratsynthase getestet, indem 0,1 µg/µl aufgereinigte CS von *E. superba* auf eine Blotmembran aufgebracht und das Serum als 1. AK mit Verdünnungen von 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200 verwendet wurde. Als 2. AK diente ein goldgekoppelter Ziegen-anti-Kaninchen (GaR) Antikörper, der die Erkennung von positiven Antigen-Antikörper Reaktionen mittels Entwickler und Enhancer-Lösung (Aurion) ermöglichte. Das Resultat ist in Abb. 25 zu sehen.

Dot-Blot-Test bei *E. superba*

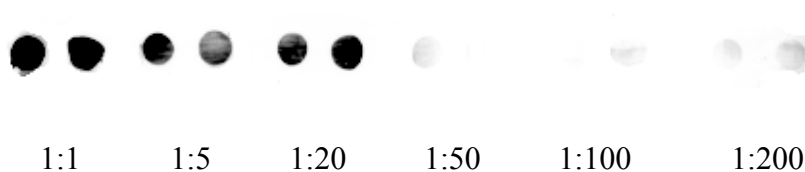


Abb.25: Dot-Blot des Kaninchenserums mit dem polyklonalen AK (pAK) RaCS-Müller. Aufgetragen wurde 0,1 µg/µl CS von *E. superba* und Verdünnungen des AK-Serums mit 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200.

Wie anhand des Dot-Blots in Abb.25 zu erkennen ist, war die Immunisierung erfolgreich. Die CS wurde selbst bei Verdünnungen von 1:200 des AK-Serums noch erkannt. Um die stärkste Immunreaktion bei den durchzuführenden Immunoblots zu erreichen, wurde anschließend noch eine IgG-Aufreinigung durchgeführt.

Zu bedenken ist bei den Dot-Blots, daß es sich um einen Schnelltest handelt, um grob die Spezifität des Antikörpers und die möglichen Verdünnungen auszutesten. Es ist also nicht unbedingt zu erwarten, daß entsprechend den Verdünnungen eine regelmäßige Abnahme in der Schwarzfärbung aufgezeigt wird. Zu bedenken ist auch, daß bei längeren Entwicklungszeiten auch die stärker verdünnten Proben eine intensivere Dunkeltönung annehmen, was dann aber zu einer unverhältnismäßigen Überzeichnung der geringeren Verdünnungen führen würde.

V.5.2 IgG-Aufreinigung

Die Aufreinigung des AK-Serums ermöglichte die Gewinnung der IgGs, die als Sekundärantwort auf die wiederholte Immunisierung mit dem Antigen, hier die CS, produziert werden und eine stärkere Immunantwort hervorrufen (s. S. 2). Für die Aufreinigung wurde eine Protein A-Säule verwendet, an deren Säulenmaterial speziell γ -Globuline (IgG) binden.

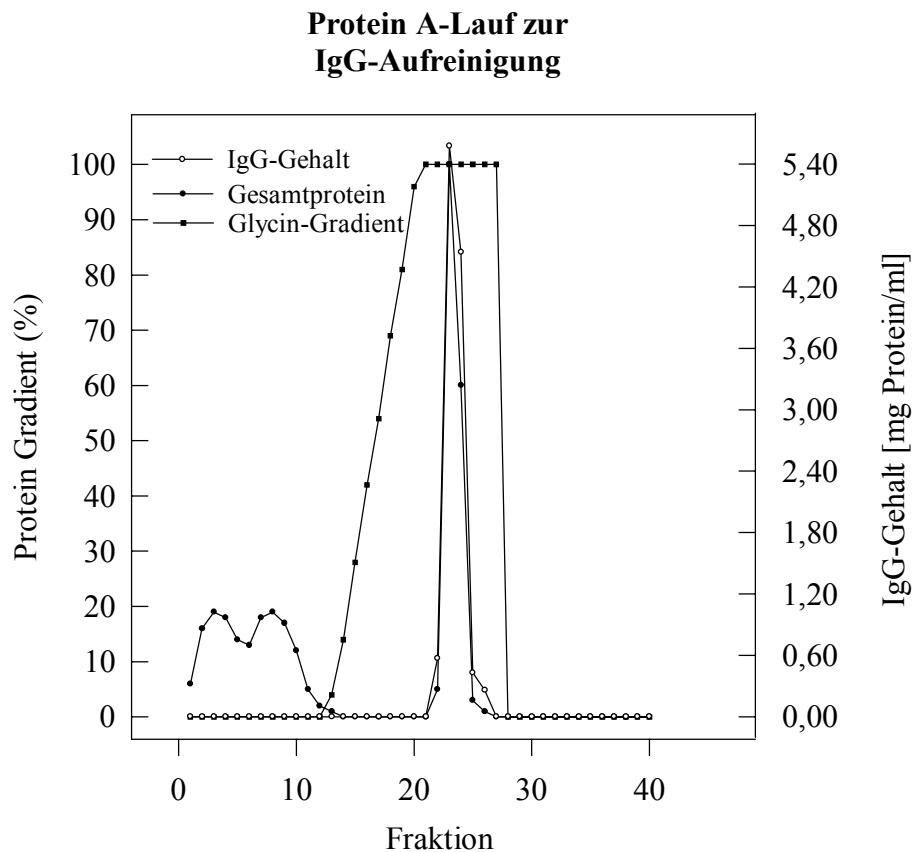


Abb.26: Aufreinigung der γ -Globuline (IgG) des selbst hergestellten polyklonalen Antikörpers (pAK) RaCS-Müller (gerichtet gegen die CS von *E. superba*) über eine Protein A-Säule

Das resultierende Laufprofil (Abb. 26) zeigte die extrem gute Auftrennungseffizienz der Protein A-Säule, mit den spezifisch gebundenen IgGs, während andere Immunglobuline und Albumin bereits früh von der Säule eluierten.

V.5.3 Dot-Blot der einzelnen Fraktionen der Protein A-Säule

Alle Läufe über die Protein A-Säule zeigten das selbe Laufprofil. Mit Hilfe der Dot-Blot-Technik wurden alle gewonnenen Fraktionen auf die stärksten Immunantworten hin getestet (Abb.21). Die Fraktionen 22-25 wiesen die stärksten Immunantworten auf. Dies entsprach der Elution der IgGs, die an die Protein A-Säule gebunden hatten. Die starken Reaktionen bei den Fraktionen 12 und 13 waren auf die frühe Elution von IgMs zurückzuführen (Abb.27). Es wurden jeweils 0,1 µg/µl CS von *E. superba* und 10 µl des Fraktionseluats aufgetragen

Dot-Blots der Fraktionen nach Protein A Aufreinigung

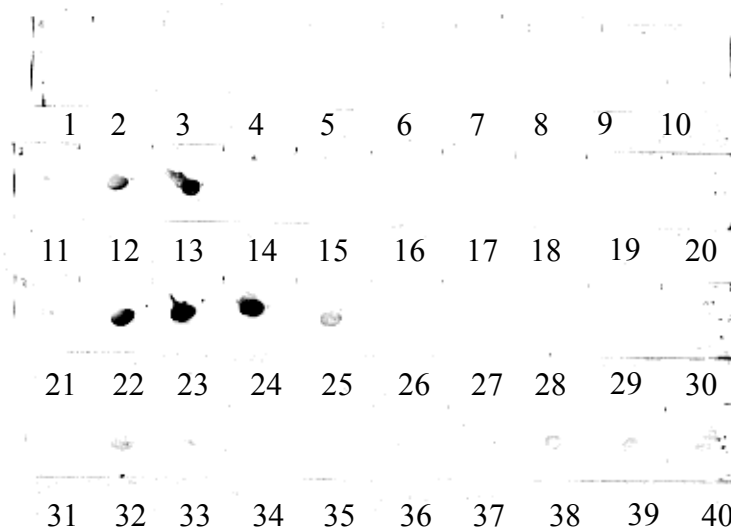


Abb.27: Dot-Blot der Fraktionen 1-40 nach der Protein A-Säule. Die Fraktionen 22-25 zeigten die stärksten Reaktionen bei der Immunantwort. Es wurden 0,1 µg/µl CS als Substrat und 10 µl Fraktionseluat als 1. AK eingesetzt.

V.5.4 Immunoblot nach SDS-PAGE verschiedener getesteter CS

Der Spezifitätstest des pAK gerichtet gegen die CS, wurde mit verschiedenen CS von Taube, Huhn, Schwein, *E. superba*, *M. norvegica* und *X. kroyeri* über SDS-Gel, Elektro- und Immunoblot mit den gewonnenen IgGs durchgeführt.

Immunoblot nach SDS-PAGE mit pAK RaCS-Müller



Abb.28: Immunoblot nach 10 % SDS-PAGE zum Test auf Spezifität des pAK RaCS-Müller auf CS. Entwickelt mit goldgekoppeltem 2. AK und Entwickler & Enhancer Lösung für 10 min.

Bahn1: CS Taube, Bahn2: CS Huhn, Bahn3: CS Schwein, Bahn4: *E. superba*,
Bahn5: *M. norvegica*, Bahn6: *X. kroyeri* mit je 10 µg Protein pro Bahn.

Wie in Abb.28 zu erkennen ist, hat der pAK RaCS-Müller alle getesteten CS einwandfrei bei 50 kD erkannt. Die vielen Banden bei *E. superba* lassen sich damit erklären, daß der AK aus eben diesem zum Probenauftrag verwendeten Extrakt von *E. superba* als Antigen hergestellt worden ist und daher auch weitere Proteine erkennen konnte.

Dies läßt sich damit erklären, daß es sich um das Serum eines polyklonalen Antikörpers und nicht um einen mit wesentlich höherem Aufwand herzustellenden monoklonalen Antikörper handelte.

Dadurch läßt sich auch Bahn 4 (Abb.28) der Proteindetektion von *E. superba* erklären, da gegen die Proteine von *E. superba* der polyklonale Antikörper hergestellt wurde. Hier werden auch die im Serum (ursprünglichen Antigen) mit vorhandenen Proteine erkannt, was sich im Immunoblot-Bild von Bahn 4 (Abb.28) zeigt.

Die bei Bahn 3 (Abb.28) auftretenden weiteren Banden unterhalb der 50 kD Bande zeigen, daß die käuflich erworbene Probe der Schweine-CS nicht so rein war wie der Hersteller sie ausgewiesen hat. Es sind zwar hier mit Sicherheit auch durch die Behandlung mit SDS und reduzierenden Agenzien wie β -Mercaptoethanol und Jodacetamid Abbauprodukte der CS zu erwarten, aber nicht in dem Maße wie dies bei Bahn 3 (Abb.28) zu sehen ist. Wären dies alles Abbauprodukte, müßten diese auch bei den sehr reinen Proben von Taube und Huhn in Bahn 1 und 2 (Abb.28) zu sehen sein.

V.6 ELISA zur Bestimmung der CS-Mengen

Um die Menge der CS der in verschiedenen Klimazonen lebenden Crustaceen bestimmen zu können, wurde ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay oder Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test) mit Hilfe von Standard-CS und dem selbst hergestellten pAK RaCS-Müller entwickelt.

Die Berechnung der CS-Menge mittels ELISA erfolgte nach der Formel:

$$10^{(Konstante + ((X-Koeffizient) * Laufstrecke Protein / Gesamtlänge Lauf)}$$

V.6.1 Bestimmung der Enzymmenge der CS

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Temperaturanpassung um eine Regulation der spezifischen Aktivität über Veränderungen am Enzym selbst, zur Erhöhung der Katalyserate oder aber über die Variation der Enzymmenge handelt, wurde die Enzymmenge der CS mit Hilfe des ELISA quantitativ bestimmt.

Die Mengenbestimmungen der CS ergeben folgendes Bild. Zum einen fällt deutlich die bis zu hundertfach höhere Menge an CS bei *E. superba* im Vergleich zu den anderen untersuchten Crustaceen auf. Als nächstes folgen die fünf- bis siebenfach geringen CS-Mengen bei *M. norvegica* katt. und *M. norvegica* med. Danach folgen die 25fach geringeren CS-Mengen der beiden Amphipoden *C. femoratus* und *D. furcipes* sowie die bei 24 °C gehälterten tropischen Garnelen *X. kroyeri*. Daraufhin folgen der Isopode *S. polita* und die bei 28 und 32 °C gehälterten tropischen Garnelen *X. kroyeri*. Am Schluß liegen die bei 16 und 20 °C gehälterten tropischen Garnelen *X. kroyeri*.

Als Interpretationsmöglichkeit bietet sich zunächst die pelagische Lebensweise der Euphausiiden an, die einen höheren Energie- und somit Umsatzbedarf an CS erfordert. Bei *E. superba* kommt der auszugleichende zusätzliche Kälteeffekt hinzu, den es zu überwinden gilt, um die gleiche Leistungsfähigkeit zu erreichen wie, z. B. die Vertreter der verwandten Gattung aus den gemäßigten Breiten, *M. norvegica*.

Bei der Auswertung der Signifikanztests zeigten sich nur zwischen den beiden Amphipoden *C. femoratus* und *D. furcipes* ($p = 0,643$; s. Tab.11) und zwischen dem Isopoden *S. polita* und der penaeiden Garnele *X. kroyeri* ($p = 0,881$; s. Tab.11) keine signifikanten Unterschiede. Alle anderen untersuchten Crustaceen unterschieden sich bezogen auf die Enzymmenge der CS signifikant voneinander. Die höchsten Werte für die Enzymmenge der CS wurden bei *E. superba* mit über 500 µg Gesamt-CS*g Tier⁻¹ gemessen. Damit lagen die Werte um das 5-50 fache höher als bei allen anderen untersuchten Crustaceen. Die niedrigsten Werte mit 5-7 µg Gesamt-CS*g Tier⁻¹ wurden bei den unphysiologisch niedrigen Hälterungstemperaturen von 16-20 °C von *X. kroyeri* gefunden.

Tab. 10 zeigt die mit dem Test bestimmten CS-Mengen von *C. femoratus*, *D. furcipes*, *S. polita*, *E. superba*, *M. norvegica* (katt.), *M. norvegica* (med.) und *X. kroyeri*.

µg/µl Standard	Extinktion	Regressionsanalyse		µg Gesamt-CS/mg Protein	
0,000	0,064	Konstante	0,096	<i>C. femoratus</i> (n=20)	94,45 ± 19,71
0,100	0,108	Stdabw Y	0,024	<i>D. furcipes</i> (n=20)	95,73 ± 10,28
0,200	0,140	R ²	0,997	<i>S. polita</i> (n=20)	82,88 ± 11,73
0,500	0,221	Meßwerte	6,000	<i>E. superba</i> (n=20)	411,77 ± 22,83
1,000	0,335	FG	4,000	<i>M. norvegica</i> (katt.) (n=20)	118,62 ± 2,69
5,000	1,149	R	0,999	<i>M. norvegica</i> (med.) (n=20)	73,90 ± 6,28
		X-Koeff.	0,212	<i>X. kroyeri</i> (n=20)	107,49 ± 11,79
		Stabw. Koeff	0,006		
µg Gesamt-CS/g Tier					
<i>C. femoratus</i> (n=20)		19,68 ± 4,11			
<i>D. furcipes</i> (n=20)		18,79 ± 2,19			
<i>S. polita</i> (n=20)		11,52 ± 1,63			
<i>E. superba</i> (n=20)		502,87 ± 27,88			
<i>M. norvegica</i> (katt.) (n=20)		97,52 ± 11,67			
<i>M. norvegica</i> (med.) (n=20)		72,12 ± 6,13			
<i>X. kroyeri</i> (n=20)		11,13 ± 1,62			

Tab.10: Bestimmung der CS-Menge der verschiedenen untersuchten Crustaceen

Signifikanztests der Enzymmenge der untersuchten Crustaceen:

p	<i>C. femoratus</i>	<i>D. furcipes</i>	<i>S. polita</i>	<i>E. superba</i>	<i>M. norv. katt.</i>	<i>M. norv. med.</i>	<i>X. kroyeri</i>
<i>C. femoratus</i>	-----	0,643	0,001	0,008	0,001	0,001	0,001
<i>D. furcipes</i>	0,643	-----	0,001	0,008	0,001	0,001	0,001
<i>S. polita</i>	0,001	0,001	-----	0,008	0,001	0,001	0,881
<i>E. superba</i>	0,008	0,008	0,008	-----	0,001	0,001	0,001
<i>M. norv. katt.</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	-----	0,001	0,001
<i>M. norv. med.</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	-----	0,001
<i>X. kroyeri</i>	0,001	0,001	0,881	0,001	0,001	0,001	-----

Tab.11: Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) der Enzymmenge der untersuchten Crustaceen

Teil III: Untersuchung des Hälterungsstress bei *X. kroyeri* mittels HSP 70-Bestimmung

V.7 Bestimmung der HSP 70-Menge bei *X. kroyeri*

HSP 70 übernimmt gemeinsam mit ATP die Schutzfunktion für hitzestressierte Peptide und löst die Faltung eines denaturierten Peptides unter Verbrauch von ATP aus (Minami, 1996; Koziol, 1997).

ATP wird von HSP 70 wie in einem Schutzmantel (Chaperonfunktion des HSP 70) vor thermischer Denaturierung geschützt und spielt eine entscheidende Rolle bei der kompetitiven Hemmung der CS.

Bei allen untersuchten Crustaceen war nur bei *X. kroyeri* eine immunologische Reaktion auf die HSP 70 Antikörper zu beobachten.

Es stellt sich die Frage, inwieweit der Hitzestress und der allgemeine Stress bei den Hälterungsversuchen einen Einfluß auf die $V_{\max}$ von *X. kroyeri* ausübt. Dies sollte im Verlauf dieser Arbeit mit untersucht werden.

Daher wurde bei *X. kroyeri* zusätzlich zur Bestimmung der Aktivierungsenergie, der Kinetiken und des Molekulargewichtes, die HSP-Menge als Stressindikator bestimmt.

Um dies durchführen zu können, wurden die Krebse verschiedenen Stresstemperaturen ausgesetzt, die denen im natürlichen Lebensraum annähernd entsprechen.

Die Krebse werden nämlich, beim Eindringen von kalten Wassermassen in die Bucht vor Ubatuba, Temperaturunterschieden von bis zu 10 °C ausgesetzt, vor denen sie durch Abwandern in die flachen, warmen Küstengewässer ausweichen (s. a. VI.4., Pires, 1992).

Die Temperaturen, bei denen die Krebse überwiegend vorkommen liegen bei 26-28 °C. Geht man von einem 10 °C Temperaturunterschied durch einströmendes kaltes Atlantikwasser aus, kommt man auf 16 °C als kälteste Temperatur, der die Tiere kurzfristig ausgesetzt werden.

Um den Stressgrad kontinuierlich zu verfolgen, wurden daher drei Temperaturen 16, 20 und 24 °C gewählt, die diesen einströmenden, kalten Wassermassen annähernd entsprechen sollten.

Da die Krebse meist im Sand vergraben liegen, benötigen sie eine gewisse Vorlaufzeit, um auf diesen Kaltwassereinstrom zu reagieren. Dann setzen sie sich in Bewegung und wandern in die flachen, warmen Küstengewässer ab.

Dies wurde simuliert, indem die Krebse nach 24 h Vorinkubation im kalten Wasser wieder in 28 °C eingesetzt wurden, was dem warmen Küstenwasser entsprechen sollte.

Damit die Anpassung von der „Kälte“ hin zum „Warmen“ genau verfolgt werden konnte, wurden Zeitserien zum Hitzestress durchgeführt, dem die Krebse dabei ausgesetzt waren.

Es wurde also die Temperaturanpassung kontinuierlich über vier Tage hinweg verfolgt und zu definierten Zeitpunkten Tiere entnommen, sofort auf Trockeneis zur späteren HSP 70-Bestimmung eingefroren.

Somit bedeutet beispielsweise 1628t12, daß die Tiere bei 16 °C 24h vorinkubiert wurden, danach in 28 °C warmes Wasser eingesetzt worden sind und schließlich nach 12 h die Tiere entnommen und eingefroren wurden.

Immunoblot nach SDS-PAGE mit Anti-HSP 70 Antikörper

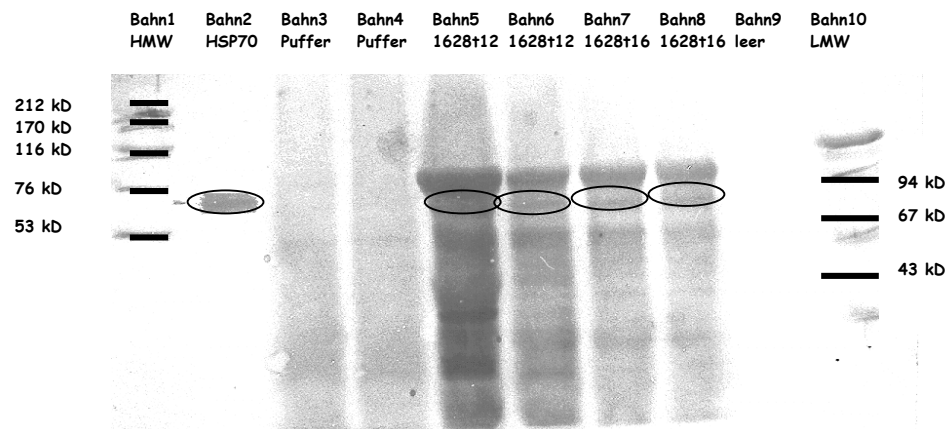


Abb.29: Immunoblot nach SDS-PAGE mit Anti-HSP 70 Antikörper. Entwickelt mit goldgekoppeltem 2. AK und Entwickler & Enhancer Lösung für 10 min. Bahn1 und 10: HMW- bzw. LMW-Marker, Bahn2: HSP 70-Standard, Bahn3 und 4: nur Puffer, Bahn5 und 6: 16/28t12, Bahn7 und 8: 16/28t16, Bahn9: ohne alles. Die in der Ellipse markierten Färbungen geben zur besseren Kenntlichmachung die jeweiligen HSP 70 Banden an.

In Abb.29 ist beispielhaft der entwickelte Immunoblot der bei 16 °C vorinkubierten und danach in 28 °C eingesetzten Tiere gezeigt. Aufgetragen wurden Molekulargewichtsmarker, die vor dem „Blotten“ (Entfärbung des Coomassie durch Blottingpuffer) mit Bleistift markiert wurden, HSP 70-Standard in definierter Menge, Bahnen mit nur Puffer als Negativkontrolle und jeweils Doppelbestimmungen der einzelnen Inkubationszeiten bei 28 °C (12 h und 16 h Inkubationszeit). Nach einer Entwicklungszeit von 10 min zeigten sich deutliche HSP 70 Banden (○) im Bereich der 70 kDa. Die weiteren Banden, die im Blot auftraten, sind auf „Background“ (Eigenfärbung der Goldpartikel) zurückzuführen.

Die bestimmten HSP 70-Mengen sind in der folgenden Tabelle 6 einzeln aufgeführt.

Es zeigte sich, daß die größten HSP 70-Mengen zwischen 10 und 20 h auftraten. Dies korreliert mit der Aussage von Sanders (1993), daß die HSP-Exprimierung bei Crustaceen später und nicht in den ersten Stunden erfolgt.

Die höchsten HSP 70-Werte sind in Tab.12 zur besseren Übersicht jeweils fett markiert.

Zeit (h)	t1628 (μg)	t2028 (μg)	t2428 (μg)
0	3,35 $\pm$ 0,28	4,72 $\pm$ 0,95	3,12 $\pm$ 0,71
0,5	5,35 $\pm$ 0,60	6,83 $\pm$ 1,26	3,92 $\pm$ 0,38
1	4,24 $\pm$ 0,94	5,50 $\pm$ 2,18	3,92 $\pm$ 0,14
2	6,94 $\pm$ 1,27	5,00 $\pm$ 0,63	4,81 $\pm$ 0,58
4	6,81 $\pm$ 1,27	7,29 $\pm$ 0,72	2,41 $\pm$ 1,12
6	6,85 $\pm$ 0,58	5,31 $\pm$ 0,31	2,45 $\pm$ 0,09
8	8,98 $\pm$ 1,43	3,85 $\pm$ 0,95	1,67 $\pm$ 0,09
10	12,50 $\pm$ 2,50	6,67 $\pm$ 1,25	3,53 $\pm$ 0,44
12	12,33 $\pm$ 2,54	6,67 $\pm$ 1,50	3,08 $\pm$ 0,19
16	12,50 $\pm$ 2,45	8,50 $\pm$ 0,87	6,67 $\pm$ 1,03
20	9,17 $\pm$ 2,89	7,67 $\pm$ 0,58	6,31 $\pm$ 1,25
24	5,95 $\pm$ 1,09	6,98 $\pm$ 0,18	5,62 $\pm$ 1,13
48	4,31 $\pm$ 1,26	6,15 $\pm$ 0,36	4,27 $\pm$ 0,65
72	3,89 $\pm$ 0,87	5,71 $\pm$ 0,94	3,89 $\pm$ 0,38
96	3,61 $\pm$ 0,64	5,12 $\pm$ 0,74	3,44 $\pm$ 0,25

Tab.12: HSP 70-Menge der bei verschiedenen Temperaturen (s. IV.1.8) gehälterten bzw. gestreßten und zu verschiedenen Zeiten entnommenen *X. kroyeri*

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß nach jeweils 16 h die maximale HSP 70 Exprimierung erfolgt ist und die Reaktion auf den „Hitze-“ bzw. Temperaturschock bei der größten Temperaturdifferenz t1628 (also 24 h Vorinkubation bei 16 °C, danach Hälterungsserien bei 28 °C) am größten und fast doppelt so hoch ist wie bei der geringsten Temperaturdifferenz t2428. Die mittleren Werte wurden auch bei der Stressung t2028 mit 8 °C Temperaturdifferenz erhalten. Folglich ist die Temperaturdifferenz ausschlaggebend für die ermittelte Höhe der Streßantwort. Aber unabhängig voneinander tritt bei allen drei Streßtemperaturen die maximale HSP 70-Expression nach 16 h auf.

V.7.1 Bestimmung des Molekulargewichtes des HSP 70 mit Hilfe der R_f -Werte nach der SDS-PAGE

Die Gele und Immunoblots wurden gefärbt und vermessen. Mit Hilfe der Standardmolekulargewichtsmarker, einer linearen Regression und der R_f -Werte wurde das Molekulargewicht des untersuchten HSP 70 bestimmt. Es ergab sich ein Molekulargewicht von $78,5 \pm 10,7$ kDa (Tab.13). Die Abweichungen von 70 kDa (da HSP 70) und ermittelten 78,5 kDa lassen sich durch Meßungenauigkeiten erklären, da Ablesungen auf dem Lineal unter 1 mm mit größeren Schwierigkeiten verbunden sind.

Die Berechnung des Molekulargewichtes der HSP 70 erfolgte nach der Formel:

$$10^{(Konstante + ((X\text{-Koeffizient}) * \text{Laufstrecke Protein} / \text{Gesamtlänge Lauf}))}$$

MW-Marker	Lauf/Gesamtlänge	MW (kDa)	log MW	Gesamtlänge (cm)	Lauflänge
Myosin	0,08	212,0	2,326	5,00	0,42
Makroglobulin	0,11	170,0	2,230		0,57
β -Galactosidase	0,17	116,0	2,064		0,86
Phosphorylase b	0,23	94,0	1,973		1,17
Transferrin	0,26	76,0	1,881		1,32
BSA	0,31	67,0	1,826		1,54
GDH	0,38	53,0	1,724		1,89
Ovalbumin	0,44	43,0	1,633		2,20
Carboanhydrase	0,63	30,0	1,477		3,15
Trypsininhibitor	0,78	20,1	1,303		3,90
Lactalbumin	0,95	14,4	1,158		4,75

	Gel Probe	MW (kDa)	MW SD	Regr. Analyse:	
HSP 70-Standard	0,308	78,5	10,7	Konstante	2,29
<i>X. kroyeri</i> t1628	0,308	78,5	10,7	Stdabw Y	0,08
<i>X. kroyeri</i> t1628	0,308	78,5	10,7	R^2	0,96
<i>X. kroyeri</i> t2028	0,308	78,5	10,7	Zahl der Meßwerte	11
<i>X. kroyeri</i> t2028	0,308	78,5	10,7	Freiheitsgrade	9
<i>X. kroyeri</i> t2428	0,308	78,5	10,7	R	0,98
<i>X. kroyeri</i> t2428	0,308	78,5	10,70	X-Koeffizient(en)	-1,28
				Stdabw. d. Koeff.	0,092

Tab.13: Molekulargewichtsbestimmung des HSP 70 mittels R_f -Werten nach der SDS-PAGE

V.8 Vergleich der HSP 70-Menge mit der CS-Menge und $V_{\max}$ von *X. kroyeri*

	HSP 70	$V_{\max}$
Zeit (h)	t1628 (μg)	16°C
0	3,35 $\pm$ 0,28	0,300 $\pm$ 0,060
0,5	5,35 $\pm$ 0,60	0,344 $\pm$ 0,037
1	4,24 $\pm$ 0,94	0,305 $\pm$ 0,021
2	6,94 $\pm$ 1,27	0,464 $\pm$ 0,130
4	6,81 $\pm$ 1,27	0,364 $\pm$ 0,012
6	6,85 $\pm$ 0,58	0,351 $\pm$ 0,030
8	8,98 $\pm$ 1,43	0,478 $\pm$ 0,052
10	12,50 $\pm$ 2,50	0,361 $\pm$ 0,071
12	12,33 $\pm$ 2,54	0,340 $\pm$ 0,062
16	12,50 $\pm$ 2,45	0,349 $\pm$ 0,008
20	9,17 $\pm$ 2,89	0,336 $\pm$ 0,029
24	5,95 $\pm$ 1,09	0,303 $\pm$ 0,015
48	4,31 $\pm$ 1,26	0,363 $\pm$ 0,022
72	3,89 $\pm$ 0,87	0,368 $\pm$ 0,046
96	3,61 $\pm$ 0,64	0,289 $\pm$ 0,007

Tab.14: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 16 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 16 °C

Vergleich HSP (μg) mit $V_{\max}$ der Hälterungsreihen bei 16°C

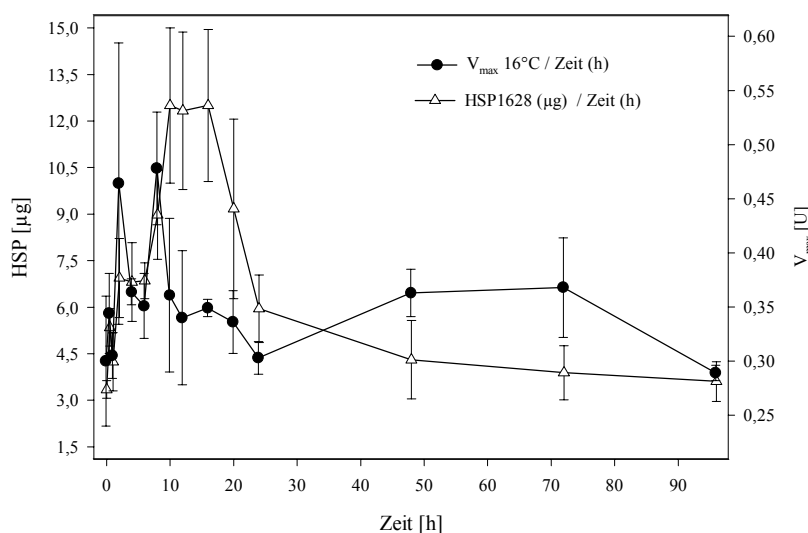


Abb.30: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 16 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 16 °C

	HSP 70	$V_{\max}$
Zeit (h)	t2028 (μg)	20°C
0	$4,72 \pm 0,95$	$0,300 \pm 0,060$
0,5	$6,83 \pm 1,26$	$0,324 \pm 0,023$
1	$5,50 \pm 2,18$	$0,356 \pm 0,023$
2	$5,00 \pm 0,63$	$0,307 \pm 0,004$
4	$7,29 \pm 0,72$	$0,347 \pm 0,026$
6	$5,31 \pm 0,31$	$0,274 \pm 0,061$
8	$3,85 \pm 0,95$	$0,382 \pm 0,149$
10	$6,67 \pm 1,25$	$0,394 \pm 0,036$
12	$6,67 \pm 1,50$	$0,381 \pm 0,053$
16	$8,50 \pm 0,87$	$0,317 \pm 0,015$
20	$7,67 \pm 0,58$	$0,393 \pm 0,026$
24	$6,98 \pm 0,18$	$0,312 \pm 0,031$
48	$6,15 \pm 0,36$	$0,347 \pm 0,009$
72	$5,71 \pm 0,94$	$0,314 \pm 0,014$
96	$5,12 \pm 0,74$	$0,324 \pm 0,054$

Tab.15: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 20 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probenahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 20 °C

Vergleich HSP (μg) mit $V_{\max}$ der Hälterungsserien bei 20°C

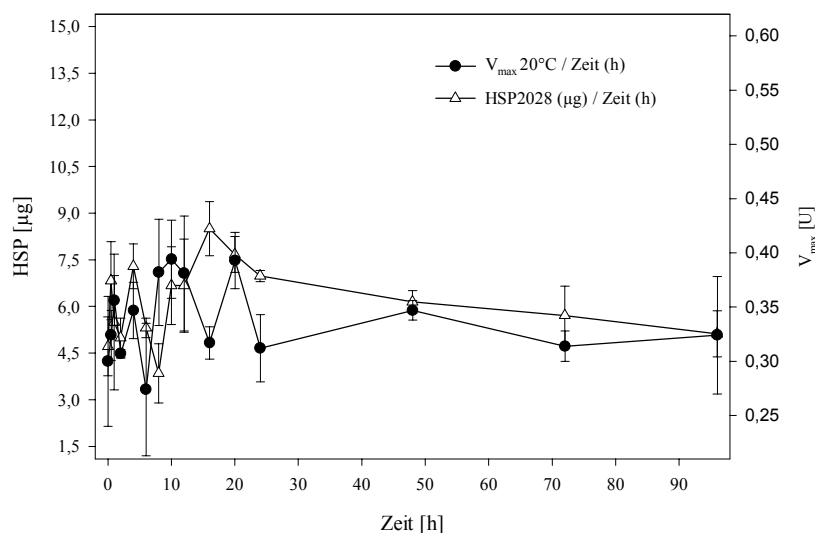


Abb.31: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 20 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probenahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 20 °C

	HSP 70	$V_{\max}$
Zeit (h)	t2428 (μg)	24°C
0	$3,12 \pm 0,71$	$0,300 \pm 0,060$
0,5	$3,92 \pm 0,38$	$0,379 \pm 0,015$
1	$3,92 \pm 0,14$	$0,442 \pm 0,046$
2	$4,81 \pm 0,58$	$0,452 \pm 0,100$
4	$2,41 \pm 1,12$	$0,380 \pm 0,021$
6	$2,45 \pm 0,09$	$0,332 \pm 0,037$
8	$1,67 \pm 0,09$	$0,413 \pm 0,074$
10	$3,53 \pm 0,44$	$0,371 \pm 0,051$
12	$3,08 \pm 0,19$	$0,322 \pm 0,088$
16	$6,67 \pm 1,03$	$0,321 \pm 0,051$
20	$6,31 \pm 1,25$	$0,359 \pm 0,038$
24	$5,62 \pm 1,13$	$0,282 \pm 0,069$
48	$4,27 \pm 0,65$	$0,305 \pm 0,025$
72	$3,89 \pm 0,38$	$0,381 \pm 0,033$
96	$3,44 \pm 0,25$	$0,304 \pm 0,019$

Tab.16: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 24 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probenahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 20 °C

Vergleich HSP (μg) mit $V_{\max}$ der Hälterungsreihen bei 24°C

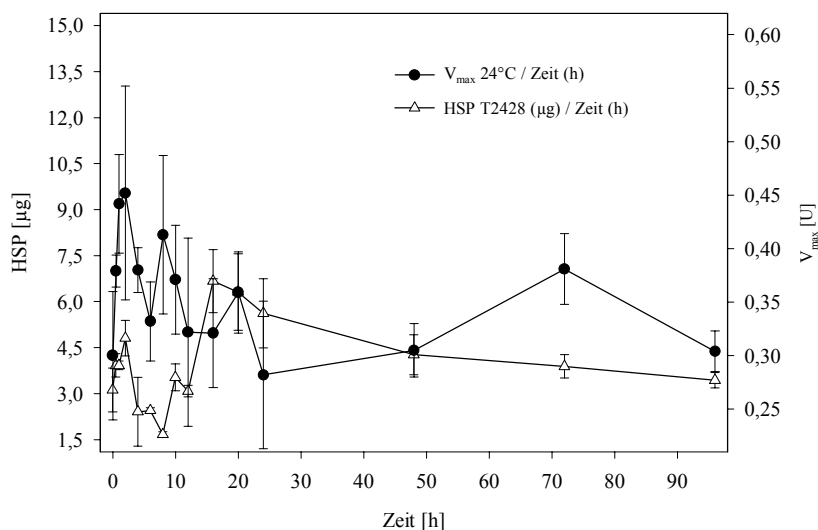


Abb.32: Vergleich HSP 70-Menge von *X. kroyeri* vorinkubiert bei 24 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probenahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ bei 24 °C

Bei den Hälterungsreihen von 16 °C Vorinkubation und danach Stressung bei 28 °C verlaufen die untersuchten Kurven von HSP 70 und $V_{\max}$ bis zu 8 h Probenahme annähernd synchron. Danach pendelt sich die $V_{\max}$ der CS auf einem relativ stabilen Wert ein, ohne weiteren Einfluß auf die abnehmende HSP-Menge auszuüben.

Ähnliches, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt, zeigt sich bei den 20 °C Hälterungsreihen.

Bei den 24 °C Hälterungsreihen mit den geringsten Temperaturunterschieden war ein annähernd synchroner Kurvenverlauf bis zu 12 h zu verzeichnen. Dannach pendelte sich die $V_{\max}$ auch hier auf einem relativ stabilen Wert ein.

Da die Tiere bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert und anschließend bei derselben Temperatur gehältert wurden, ist zu erwarten, daß nach einer Zeit der Anpassung die $V_{\max}$ annähernd die gleichen Werte erreicht. Dies ist auch aus den jeweiligen Tabellen ersichtlich. Ein statistischer Vergleich der einzelnen $V_{\max}$ -Werte ergab keine signifikanten Unterschiede bei einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ (s. Tab.17).

Verglichene Hälterungszeiten	Wahrscheinlichkeit p
t16/28 mit 20/28	0,331
t16/28 mit 24/28	0,723
t20/28 mit 24/28	0,276

Tab.17: Vergleich der Hälterungszeiten nach Temperaturstressung auf signifikante Unterschiede bezogen auf $V_{\max}$ und HSP 70 bei den untersuchten Temperaturen

V.9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Immunisierungsschema eines Kaninchens behandelt mit CS von <i>E. superba</i>	23
Tab.2:	Molekulargewichtsbestimmung der CS nach Eichkurve der Superdex-Säule	43
Tab.3:	Molekulargewichtsbestimmung der CS nach R_f -Werten der SDS-PAGE	45
Tab.4:	V_{max} , E_A , K_M , K_i und Temperaturoptimum der verschiedenen untersuchten Crustaceen	46
Tab.5:	Signifikanztests (t-Test mit $p \leq 0,05$) der E_A der untersuchten Crustaceen	47
Tab.6:	Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) der V_{max} der untersuchten Crustaceen.....	48
Tab.7:	Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des K_i der untersuchten Crustaceen.....	49
Tab.8:	Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des K_M der untersuchten Crustaceen	50
Tab.9:	Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) des Temperaturoptimums der untersuchten Crustaceen.....	51
Tab.10:	Bestimmung der CS-Menge der verschiedenen untersuchten Crustaceen	63
Tab.11:	Signifikanztest (t-Test mit $p \leq 0,05$) der Enzymmenge der untersuchten Crustaceen.....	63
Tab.12:	HSP 70-Menge der bei verschiedenen Temperaturen (s. IV.1.8) gehälterten bzw. gestreßten und zu verschiedenen Zeiten entnommenen <i>X. kroyeri</i>	66
Tab.13:	Molekulargewichtsbestimmung des HSP 70 mittels R_f -Werten nach der SDS-PAGE.....	67
Tab.14:	Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 16 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 16 °C	68
Tab.15:	Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 20 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 20 °C	69
Tab.16:	Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 24 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 20 °C	70
Tab.17:	Vergleich der Hälterungszeiten nach Temperaturstressung auf signifikante Unterschiede bezogen auf V_{max} und HSP 70 bei den untersuchten Temperaturen...	71
Abb.1:	Aufreinigung der CS von <i>E. superba</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (QSepharoseHP). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	29
Abb.2:	Aufreinigung der CS von <i>E. superba</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der QSepharoseHP-Säule	30
Abb.3:	Aufreinigung der CS von <i>M. norvegica</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	31
Abb.4:	Aufreinigung der CS von <i>M. norvegica</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule	32
Abb.5:	Aufreinigung der CS von <i>X. kroyeri</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	33

Abb.6:	Aufreinigung der CS von <i>X. kroyeri</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule.....	34
Abb.7:	Aufreinigung der CS von <i>C. femoratus</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	35
Abb.8:	Aufreinigung der CS von <i>C. femoratus</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule.....	36
Abb.9:	Aufreinigung der CS von <i>D. furcipes</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	37
Abb.10:	Aufreinigung der CS von <i>D. furcipes</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule.....	38
Abb.11:	Aufreinigung der CS von <i>S. polita</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches (ResourceQ). Mit Hilfe eines aufgebauten NaCl-Gradienten wurden die an die Säule gebundenen Proteine wieder abgelöst.	39
Abb.12:	Aufreinigung der CS von <i>S. polita</i> über eine FPLC-Säule nach dem Prinzip der Molekularsiebtechnik (Superdex). Dies war der nächste Aufreinigungsschritt nach der ResourceQ-Säule.....	40
Abb.13:	10 % SDS-PAGE und Coomassie Blue-Färbung nach der Aufreinigung der CS über die FPLC- Säule nach dem Prinzip des Anionenaustausches und der Molekularsieb-technik. Zur Überprüfung der Aufreinigungseffizienz der eingesetzten FPLC-Säulen. Bahn1: CS Huhn, Bahn2: CS Schwein, Bahn3: <i>E. superba</i> , Bahn4: <i>M. norvegica</i> , Bahn5: <i>C. femoratus</i> , Bahn6: <i>D. furcipes</i> , Bahn7: <i>S. polita</i> , Bahn8: <i>X. kroyeri</i> mit je 10 µg Protein pro Bahn.	41
Abb.14:	Eichkurve für die Superdex-Säule zur Bestimmung des Molekulargewichtes der CS verschiedener untersuchter Crustaceen	42
Abb.15:	Eichkurve der R _f -Werte zur Bestimmung des Molekulargewichtes des CS verschiedener untersuchter Crustaceen	44
Abb.16:	Temperaturoptima der CS der einzelnen untersuchten Crustaceen	52
Abb.17:	Hitzestabilitätsuntersuchungen der CS der einzelnen untersuchten Crustaceen	54
Abb.18:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>C. femoratus</i> unter Einfluß von ATP	55
Abb.19:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>D. furcipes</i> unter Einfluß von ATP	55
Abb.20:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>S. polita</i> unter Einfluß von ATP	56
Abb.21:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>E. superba</i> unter Einfluß von ATP	56
Abb.22:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>M. norvegica</i> (katt.) unter Einfluß von ATP	56
Abb.23:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>M. norvegica</i> (med.) unter Einfluß von ATP	57
Abb.24:	Lineweaver-Burk und Michaelis Menten Diagramm der CS-Kinetik von <i>X. kroyeri</i> unter Einfluß von ATP	57

Abb.25: Dot-Blot des Kaninchenserums mit dem polyklonalen AK (pAK) RaCS-Müller. Aufgetragen wurde 0,1 µg/µl CS von <i>E. superba</i> und Verdünnungen des AK-Serums mit 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200.	58
Abb.26: Aufreinigung der γ-Globuline (IgG) des selbst hergestellten polyklonalen Antikörpers (pAK) RaCS-Müller (gerichtet gegen die CS von <i>E. superba</i>) über eine Protein A-Säule	59
Abb.27: Dot-Blot der Fraktionen 1-40 nach der Protein A-Säule. Die Fraktionen 22-25 zeigten die stärksten Reaktionen bei der Immunantwort. Es wurden 0,1 µg/µl CS als Substrat und 10 µl Fraktionseluat als 1. AK eingesetzt.	60
Abb.28: Immunoblot nach 10 % SDS-PAGE zum Test auf Spezifität des pAK RaCS- Müller auf CS. Entwickelt mit goldgekoppeltem 2. AK und Entwickler & Enhancer Lösung für 10 min. Bahn1: CS Taube, Bahn2: CS Huhn, Bahn3: CS Schwein, Bahn4: <i>E. superba</i> , Bahn5: <i>M. norvegica</i> , Bahn6: <i>X. kroyeri</i> mit je 10 µg Protein pro Bahn.	61
Abb.29: Immunoblot nach SDS-PAGE mit Anti-HSP 70 Antikörper. Entwickelt mit gold- gekoppeltem 2. AK und Entwickler & Enhancer Lösung für 10 min. Bahn1 und 10: HMW- bzw. LMW-Marker, Bahn2: HSP 70-Standard, Bahn3 und 4: nur Puffer, Bahn5 und 6: 16/28+12, Bahn7 und 8: 16/28+16, Bahn9: ohne alles. Die in der Ellipse markierten Färbungen geben zur besseren Kenntlichmachung die jeweiligen HSP 70 Banden an.....	65
Abb.30: Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 16 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 16 °C	68
Abb.31: Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 20 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 20 °C	69
Abb.32: Vergleich HSP 70-Menge von <i>X. kroyeri</i> vorinkubiert bei 24 °C für 24 h, danach bei 28 °C inkubiert und Probennahme zu definierten Zeiten mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} bei 24 °C	70

VI. Diskussion

In den letzten Jahren wurden im Rahmen ökophysiologischer Untersuchungen an marinen Crustaceen Temperatureinflüsse auf Stoffwechselvorgänge mit Hilfe von Enzymen untersucht, die an zentralen Stellen des aeroben Stoffwechsels stehen (Vetter, 1995 a, b; Peters, 1999; Buchholz und Saborowski, 2000; Salomon und Buchholz, 2000; Saborowski und Buchholz, 2002).

Eines dieser Enzyme ist die Citratsynthase (CS, EC 4.1.3.7), ein regulierendes Enzym des aeroben Stoffwechsels. Die CS kann als Indikator für die aerobe Kapazität der untersuchten Crustaceen gelten. Das Enzym leitet den Citratzyklus ein (Krebs, 1970; Srere, 1972) und katalysiert die Aldolkondensation von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat zu Citrat (Wiskich, 1980).

Die ersten Erkenntnisse zur enzymatischen Temperaturanpassung stammen aus Experimenten mit Fischen. Dabei wurde entweder mit ungereinigten Enzymen aus Rohextrakten gearbeitet (Hochachka, 1984; Dittrich, 1992) oder es wurden die Isoenzymmuster unterschiedlich adaptierter Tiere bestimmt (Graves, 1982).

Später wurden dann die zu untersuchenden Enzyme mit Hilfe von schneller Flüssigkeitschromatographie (FPLC) aufgereinigt und im enzymatisch-optischen Test analysiert (s. a. Vetter, 1995 a, b).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei marinen Crustaceen, die sich hinsichtlich ihrer Lebensweise (benthisch, pelagisch), dem herrschenden Temperaturregime (polar, gemäßigt, tropisch) und der Physiologie (stenotherm, eurytherm) unterscheiden, biochemische Temperaturanpassungen auf enzymatischer Ebene vergleichend zu untersuchen.

Dies wurde in dieser Arbeit erstmalig unter besonderer Berücksichtigung von quantitativen Regulationsprozessen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde eigens ein ELISA (Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test) entwickelt, mit dem eine Enzymengenbestimmung der CS ermöglicht wurde.

Da die Crustaceen in ihren jeweiligen Lebensräumen Temperaturstreß ausgesetzt sein können, wurde zusätzlich die Produktion von Hitzeschockproteinen (HSPs) im Hinblick auf Temperaturstreß und möglicher Auswirkungen auf die Regulation der CS untersucht.

VI.1 Methodendiskussion

Tiermaterial

Einflüsse der Morphometrie auf die Enzymaktivitäten wurden beim intraspezifischen Vergleich durch die Verwendung von annähernd gleich großen und gleich schweren Tieren vermieden (Saborowski und Buchholz, 2002).

Zum interspezifischen Vergleich läßt sich sagen, daß sich dieser generell schwierig gestaltet (Hardewig, 1999). Um aber einen Überblick über Lebensweise und Temperatur zu gewinnen, wurde darauf geachtet, daß die Tiere jeweils in der produktivsten Lebensphase bzw. Jahreszeit, bezogen auf den Stoffwechsel, gehältert und untersucht wurden (s. a. Luxmore, 1981; Jadzewski, 1991; Pires, 1992; Saborowski und Buchholz, 2002).

Enzymaufreinigung

Um Einflüsse auf die Enzymaktivität durch Proteolyse sowie Kreuzreaktionen mit anderen Enzymen (Fremdproteinen) weitestgehend auszuschließen, wurden die Ganztierextrakte über verschiedene Trennsäulen aufgereinigt und umgepuffert, um eine möglichst reine CS zu erhalten. Denn zur Ermittlung der spezifischen Aktivität d. h. der Aktivität pro Enzymmolekül, ist es erforderlich reines Enzym vorliegen zu haben (Cornish-Bowden, 1979). Nur auf diese Weise können vorgetäuschte, mit dem Substratangebot veränderliche, Bindungseigenschaften ausgeschlossen werden (Levitzky und Koshland, 1976). Die Aufreinigung der CS über die FPLC-Säulen betrug dabei bis zum 400 fachen der Ausgangsaktivität. Die erzielte Reinheit der CS ließ sich in der SDS-PAGE und dem Immunoblot nachweisen (s. Abb.13/28).

Mit dieser CS wurden dann die Tests wie Immunisierung zur Antikörperherstellung, Molekulargewichtsbestimmungen, Elektrophorese, Immunoblot, Kinetiken und ELISA durchgeführt.

Als geeignete Trennsäulen erwiesen sich eine Anionenaustauschsäule (QSepharoseHP-Säule) und nachgeschaltet eine Molekularsiebsäule (Superdex[®]). Für die CS konnten so bis zu 400 fache Aufreinigungen erzielt werden.

Um Aktivitätsverluste so gering wie möglich zu halten, wurden die über die Säulen extrahierten Proben stets auf Eis (4 °C) gekühlt gehalten und sofort nach den Extraktionen für die Kinetikmessungen verwendet.

Zur Aufreinigung der CS wurden Vorversuche mit Extrakten von *E. superba* durchgeführt, um die geeigneten Trennsäulen und Puffer für die Aufreinigung zu finden. Es zeigte sich, daß eine absteigende pH-Reihe von pH 8,0 für den Extraktionspuffer, pH 7,0 für die Anionenaustauschsäule und pH 6,8 für die Molekularsiebsäule optimal waren. Die so aufgereinigte CS blieb mehrere Stunden hindurch stabil und es konnten alle kinetischen Parameter bestimmt werden.

Eine Aufbewahrung der aufgereinigten CS über Nacht bei 4°C oder auch das Einfrieren führte zu drastischen bis völligen Aktivitätsverlusten und wurde daher nicht in Betracht gezogen. D. h. die Extrahierung, Aufreinigung, Bestimmung und Auswertung der kinetischen Parameter erfolgte jeweils immer an einem Tag.

Antikörperherstellung

Die dazu erforderlichen Techniken wurden ausgearbeitet und zu der Bestimmung der physiologischen Parametern hinzugezogen. Als geeignet für die Enzymmengenbestimmung erwies sich ein eigens dafür entwickelter ELISA. Der dazu notwendige polyklonale Antikörper gerichtet gegen die CS von *E. superba* wurde selbst hergestellt. Das notwendige Antigen (CS von *E. superba*) wurde mit Hilfe zweier FPLC-Säulen (vgl. Kap.V.1.1) aufgereinigt und einem Kaninchen subcutan in physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

Dazu wurde auch Komplettes Freudsches' Adjuvanz (cFA) verwendet, das die Immunantwort durch eine gesteigerte Konzentration von Wachstumsfaktoren wie Lymphokinen (meist IgG1) stimuliert und eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems bewirkt. Ein Haupteffekt von cFA liegt darin, daß dieses noch ein Mineralöl enthält, das die Antigene einschließen kann (Depotwirkung) und diese nur nach und nach freisetzt. Das Antigen wird so vor dem Stoffwechselabbau geschützt.

Aufgrund der Anregung des Immunsystems des Kaninchens werden Antikörper bzw. Immunglobuline (Ig) gebildet. Diese sind Glykoproteine und werden von B-Lymphozyten des Immunsystems der Wirbeltiere zur Abwehr körperfremder Proteine (Antigene) produziert und sekretiert (Alberts, 1990). Die für die Immunantwort interessantesten Immunglobuline sind die IgM und IgG. Die IgM werden als Primärantwort gebildet und reagieren noch relativ unspezifisch auf das Antigen, während die IgG bei der Sekundärantwort viel spezifischer auf das bereits bekannte Immunglobulin reagieren können.

Nach einer aufwendigen Impfkation, die für die Ausbildung der Immunantwort notwendig war, wurden aus dem Blut des Kaninchens Antikörper gewonnen (s. Tab.1). Diese wurden über eine Protein A-Säule aufgereinigt, um die aus der beschriebenen Sekundärantwort des Immunsystems stammenden IgGs zu gewinnen, die eine höhere Bindungsaffinität zu dem jeweiligen Antigen (CS) hatten (s. Abb.26, 27).

Mit dem so gewonnenen polyklonalen Antikörper wurde dann, mit Hilfe der Immunoblot-Technik, nachgewiesen, daß der Antikörper in der Lage ist, sämtliche hier in der Arbeit untersuchten und verwendeten CS eindeutig zu detektieren (s. Abb.28).

Struktur und Molekulargewicht der Citratsynthase (CS)

Bei Eukaryoten ist die CS ein Dimer mit einem relativen Molekulargewicht (M_r) von 90-100 kD. Die komplette CS beim Schwein besteht aus 437 Aminosäuren (AS), was einem errechneten M_r von 48,987 kD pro Monomer entspricht (Bloxham, 1981). Die von Bloxham (1981) durchgeführte Elektrophorese ergab ein M_r von 45-50 kD für die CS (s. a. Singh, 1970; Wu, 1970/1; Weitzmann, 1976; diese Arbeit).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich nach der Molekulargewichtsbestimmung über eine Molekularsiebsäule (Superdex[®]) ein Molekulargewicht für das CS-Dimer zwischen 105-112 kD für die jeweils untersuchten Crustaceen.

Die Molekulargewichte sind statistisch signifikant verschieden. ($p = 0,02$ nach Student's t-Test). D. h. der Unterschied in den Mittelwerten der zwei verglichen Gruppen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (s. Tab.2) ist größer als durch Zufall erwartet werden könnte.

Diese auf den ersten Blick überraschende Tatsache läßt sich nur mit der Ungenauigkeit der Bestimmung der Fraktionsvolumina erklären. Denn die Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der R_f -Werte nach SDS-PAGE läßt den Schluß zu, daß die durch die Evolution hindurch hoch konservierte CS bei allen untersuchten Spezies das gleiche und nicht signifikant unterschiedliche Molekulargewicht aufweist (Weitzmann, 1976).

Die Größe der nach SDS-PAGE erhaltenen CS-Monomere, wurden anhand der R_f -Werte nach SDS-PAGE und Immunoblot mit dem gewonnenen Antikörper RaCS-Müller ermittelt und ergaben bei allen untersuchten Spezies jeweils 50 kD. Die noch in Resten vorhandene 100 kD Bande des Dimers ergab bei den hier durchgeführten Messungen für alle CS einen Wert von 99,7 kD.

Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Konservierung der Molekularstruktur der CS während der Evolution. Die in dieser Arbeit untersuchten Crustaceen-CS und die immunologisch mit untersuchten Vogel- und Säuger-CS zeigen keine gravierenden Unterschiede der molekularen Größe und Sensitivität gegen den von *E. superba* gewonnenen Antikörper.

ELISA (Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test)

Die Etablierung eines funktionierenden ELISA zur Enzymmengenbestimmung der CS war mit großen Schwierigkeiten bei der Erstellung einer Standardkurve für die CS-Menge verbunden.

Für den ELISA wurden speziell beschichtete MaxiSorp®-Mikrotiterplatten verwendet, um eine hohe Bindekapazität für die zu quantifizierende CS zu gewährleisten. Bei der Oberfläche der Platten handelte es sich um Polystyren mit einer sehr hohen Affinität für Moleküle mit polaren oder hydrophilen Gruppen, was bei der wasserlöslichen CS zweifelsfrei der Fall ist. Die maximale theoretische Bindekapazität betrug bis zu ca. 600 ng/well.

Um die unspezifischen Bindungsstellen nach der Inkubation mit der CS abzusättigen und eine dadurch bedingte zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde nach der Inkubation mit der CS (Antigen) mit 1 % BSA im Nachbeschichtungspuffer für 15 min abgesättigt.

Durch die Absättigung wird vermieden, daß sich Antikörper auf der Platte anheften ohne an Antigen gebunden zu sein. Somit erfolgt die Substratreaktion nur dann, wenn auch eine Bindung der Antikörper an das Antigen stattgefunden hat.

Die optimierte Standardreihe ergab sich aus der maximalen Bindekapazität der Mikrotiterplatten, die von der Herstellerfirma (NUNC) nur sehr unzureichend beschrieben wurde. Die Standardreihe wurde mit Antigenkonzentrationen von 0,0 - 1,0 µg/ml aufgebaut, was im Maximum 0,5 µg/well entsprach. Die von NUNC angegebene Menge mit 600 ng/well war zu optimistisch angesetzt, da bei solchen CS-Konzentrationen die Substratreaktion viel zu schnell ihr Maximum erreichte und im Mikrotiterplattenphotometer nicht gemessen werden konnte.

Als Standardantigen wurde käuflich erworbene Schweine-CS verwendet. Der 1. Antikörper wurde mit einer Konzentration von 6 ng/µl und der 2. Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war, um die Visualisierung zu gewährleisten, wurde in einer Konzentration von 4 ng/µl aufgebracht.

Die Substratreaktion erfolgte mit einer Konzentration von 10 µg/µl ABTS. Das ABTS führte in Verbindung mit dem enzymmarkierten 2. Antikörper zu einer grünen Farbentwicklung, die bei 405 nm im Photometer bestimmt werden konnte.

Mit Hilfe der durchgeführten Absättigungen und Waschschritten konnte nahezu ausgeschlossen werden, daß es zu Vermischungen von Antikörpern und Substratreagenz kam. Auch wurde so gewährleistet, daß nur angeheftetes Antigen von den Antikörpern detektiert wurde.

Durch den so etablierten ELISA war eine eindeutige Quantifizierung der CS möglich.

Als optimale Inkubationszeiten stellten sich jeweils 1 h für den Antigen (CS)-Auftrag, den 1. und 2. Antikörper sowie die Substratreaktion mit ABTS heraus. Für die Nachbeschichtung mit BSA genügten 15 min.

Um die gleichmäßige Verteilung der Auftragsvolumina zu gewährleisten, wurden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Die einzelnen Waschschrte wurden jeweils dreimal hintereinander durchgeführt, um die Wells vollständig von nicht gebundenem Antigen und Antikörpern zu befreien. Dies wurde durch das zusätzliche Ausklopfen der Platten nach den jeweiligen Waschschrten unterstützt.

Die Standardreihe mit 0,0-1,0 µg/ml ergab eine Gerade, die die eindeutige CS-Mengenbestimmung erlaubte.

Ein Problem der Antigenerkennung tritt allerdings bei allen Tests mit angeheftetem Antigen auf. Ist nämlich die reaktive Stelle des Proteins inaktiviert oder auf der Seite der festen Phase versteckt, ist keine Signalwirkung möglich. Um dies nach Möglichkeit auszuschließen, wurden 12-fach Bestimmungen mit mindestens drei Parallelen bei der Quantifizierung durchgeführt.

HSP-Bestimmung

Zur Untersuchung ob HSP 70 in die CS-Regulation eingreift, wurde ein Extraktionssystem etabliert und eine Quantifizierung des HSP 70 mittels Western- und Immunoblotting durchgeführt (Lewis, 1990; Sanders, 1993; Currie, 1997).

Für die Extraktion der HSP-Proteine mußte ein geeignetes Puffersystem gefunden werden, mit dem es möglich war, die Proteine nach der Extraktion zu fällen und für die HSP-Bestimmung aufzuarbeiten.

Aus dem breiten in der Literatur zitierten Auswahlpektrum an Puffern zur HSP 70-Extraktion, kristallisierten sich vier unterschiedliche Puffer heraus, die mehr oder weniger geeignet waren, um HSPs mit Hilfe der Western- und Immunoblot-Technik nachzuweisen und zu quantifizieren.

Als am geeignetsten erwies sich dabei der Puffer mit einer im Vergleich zu den anderen Puffern geringen Tris-Molarität und einem pH von 7,6. Auch war dies der einzige Puffer mit der Alkylierungsagenz Jodacetamid, mit der Disulfidbrücken unter Ausbildung einer kovalenten Bindung dauerhaft gespalten werden können (Alkylierungsreaktion). Dies ermöglichte eine schärfere Bandentrennung bei der SDS-PAGE.

Die optimale Reaktion, zur Ausfällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen, war hier die Acetonfällung. Diese lief, um möglichst quantitativ zu sein, am besten bei -20 °C für 24 h ab. Der Überstand wurde zentrifugiert und soweit möglich durch Absaugen vom Pellet getrennt. Um die Reste der wässrigen Acetonlösung zu entfernen, wurde das Pellet in einer Speed-Vac[®] getrocknet, um das verbliebene Aceton verdunsten zu lassen.

Die so erhaltenen Pellets konnten dann wieder vereinigt werden, um die Proteine eines kompletten Tieres zu erhalten und in der SDS-PAGE aufzutragen.

Als geeignete Auftragsmenge an Protein für die SDS-PAGE wurden 150 µg Protein pro Bahn im Gel ermittelt. Die so erhaltenen Gele wurden, nach der Färbung und fotografischen Dokumentation, mit Hilfe von Western-Blotting auf eine PVDF-Membran aufgebracht und so immobilisiert. Da auch hier dasselbe Detektionsproblem auftreten kann, das auch schon beim ELISA beschrieben worden ist, nämlich die Maskierung der reaktiven Stelle durch Anheftung auf der Trägermembran, wurden hier ebenfalls 12-fach Bestimmungen mit mindestens drei Parallelen durchgeführt.

Ein Problem bei der quantitativen Bestimmung mit Hilfe von Western- und Immunoblotting ist die Bindekapazität der Trägermembran (Sanders, 1993). Um dies soweit wie möglich auszuschließen, wurden Vorversuche mit unterschiedlich beladenen Gelen durchgeführt, die jeweils geblottet und nachgefärbt wurden.

Dies wurde solange durchgeführt, bis eine Proteinkonzentration erreicht worden ist, bei der, nach einer erneuten Anfärbung des geblotteten Gels, kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Somit konnte gewährleistet werden, daß das gesamte Protein aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen worden ist.

Bei der HSP 70 Detektion traten wiederum Probleme auf, bis ein geeigneter Antikörper gefunden wurde, mit dessen Hilfe eine Detektion möglich war. Eine positive HSP 70-Detektion konnte nur bei *X. kroyeri* verzeichnet werden. Bei allen anderen untersuchten Crustaceen wurde mit Hilfe der getesteten Extraktionspuffer und der verwendeten Antikörper kein Signal auf der PVDF-Membran erhalten.

Eventuell wurden die HSPs von den verwendeten Antikörpern nicht erkannt. Eine genauere Erklärung dafür läßt sich nicht geben, da die Chaperone (HSP 70) und Chaperonine (HSP 60) auch bei Crustaceen hoch konserviert und essentiell für die Zelle sind. Möglicherweise wären noch weitere Extraktionssysteme zu testen gewesen, was aber aus zeitlichen Gründen nicht möglich war.

Folglich wurde nur *X. kroyeri* einer intensiven HSP 70-Untersuchung unterzogen.

VI.1.2 Vergleichsansatz

Nachdem die Voraussetzungen für die Mengenbestimmung der CS gegeben waren, wurden zum Vergleich der Anpassung an verschiedene Klimazonen (polar, gemäßigt, tropisch) und an die verschiedenen Lebensweisen (pelagisch, benthisch, benthopelagisch) die folgenden Crustaceenvertreter und deren Physiologie näher untersucht.

Für den biologischen Vergleich wurden pelagische Crustaceen wie die Euphausiiden (Krill) *Euphausia superba*, *Meganyctiphanes norvegica* sowie die benthopelagischen

Amphipoden *Djerboa furcipes*, *Cheirimedon femoratus*, der benthische Isopode *Serolis polita* und die benthische penaeide Garnele *Xiphopenaeus kroyeri* aus verschiedenen Klimazonen gegenübergestellt.

Auf diese Weise war ein eingehender inter- und intraspezifischer Vergleich von Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen hinsichtlich des Lebensraumes, der Lebensweise und der Anpassungsfähigkeit möglich. Als benthopelagischer Vergleichsorganismus aus der klimatisch gemäßigten Nordsee wurde der von Salomon (2000) untersuchte Isopode *Idotea baltica* herangezogen.

Der nordische Krill, *M. norvegica*, hat als pelagischer Krebs einen hohen Energieumsatz und besitzt aufgrund seiner Fähigkeit, sich an variierende Umweltfaktoren anzupassen, also im Bezug auf die Temperatur als -eurythermes Tier-, ein sehr weites Verbreitungsgebiet. Hier wurden Tiere aus dem Dänischen Kattegat (*M. norvegica katt.*) und aus dem Mittelmeer (*M. norvegica med.*) verwendet.

Der antarktische Krill, *E. superba*, ist dagegen auf den polaren antarktischen Ringozean begrenzt, hat aber wie der nordische Krill, als ebenfalls ständig schwimmende Art auch einen hohen Energieumsatz und wurde deswegen als kalt stenothermer Vergleichsorganismus ausgewählt.

Wenig aktiv ist die benthisch lebende penaeide Garnele *X. kroyeri*, die dem tropischwarmen Wasser vor der Südostküste Brasiliens folgt und daher als warm stenothermes Tier eingestuft wurde.

Die am wenigsten aktiven Crustaceen, die benthopelagischen Amphipoden (*C. femoratus*, *D. furcipes*) und der benthische Isopode (*S. polita*) wurden als kaltstenotherme Vergleichsorganismen betrachtet.

VI.2 Biologischer Vergleich

VI.2.1 Untersuchte Crustaceen

Lebensweise des antarktischen Krills *Euphausia superba*

E. superba ist ein pelagischer Krebs mit 5-6 cm Körperlänge, einer Lebenserwartung von 6-8 Jahren und sehr guter Schwimmfähigkeit (Hamner, 1983). Die meiste Zeit seines Lebens verbringt er in den oberen 200 m der Wassersäule in Schwärmen verschiedener Ausdehnung von 20.000-30.000 m³ (Buchholz, 1988).

Wegen seines Vorkommens im Überfluß, hat der antarktische Krill *E. superba* eine zentrale Rolle als primäre Nahrungsquelle für viele der größeren Carnivoren im antarktischen Ökosystem. Faktoren für diesen Erfolg sind die Fähigkeit ausreichende Futterkonzentrationen in verschiedenen Habitaten zu finden und die effiziente Ausbeutung des vorkommenden Futters (Quetin und Ross, 1991). Die enge Übereinstimmung des Lebenszyklus mit den saisonalen Zyklen der Futterverfügbarkeit und schließlich die Kombination der physiologischen Mechanismen, ermöglichen es dem Krill, die lange Winterperiode mit geringer Futterkonzentration zu überleben (Quetin und Ross, 1991).

Lebensweise des nordischen Krills *Meganctiphanes norvegica*

M. norvegica ist eine sehr weit verbreitete pelagische Crustaceenart, die an der kanadischen Ostküste, dem Grönlandschelf, der Norwegischen Küste, den Kanarischen Inseln bis hin zum Mittelmeer vorkommt (Mauchline, 1960).

Dabei bestimmen die extrem weite Temperaturspanne und die Verfügbarkeit der Nahrung (Lass et. al. 2001) weitgehend das Verbreitungsgebiet des **nordischen** Krills.

Im Kattegat mit gemäßigten Wassertemperaturen von 4-16 °C besteht eine kontinuierliche Nährstoffzufuhr, die die Grundlage für eine zeitlich ausgedehnte Primär- und Sekundärproduktion ist (Richardson und Heilmann, 1995).

Dagegen sind die Wassertemperaturen im Mittelmeer (Ligurische See vor Korsika) das ganze Jahr über konstant hoch (12-20 °C; Buchholz und Saborowski, 2000). In diesem oligotrophen Lebensraum tritt jedoch nur eine sehr kurze, produktive Phase zwischen Februar und März auf. Im Rest des Jahres ist die Produktion dann anhaltend niedrig (Boucher, 1984; Boucher et al., 1987; Sournia et al., 1990).

Das Vorkommen des nordischen Krills in den sehr unterschiedlichen Lebensräumen läßt eine hohe physiologische Anpassungsfähigkeit bezogen auf die einwirkenden Umweltfaktoren vermuten. Grundsätzlich wird die Geschwindigkeit von Stoffwechselvorgängen bei poikilothermen Tieren in hohem Maße von der Temperatur beeinflusst (Newell und Branch, 1980). Insbesondere poikilotherme Tiere haben einen nur sehr begrenzten Bereich der Körpertemperatur in dem die Stoffwechselvorgänge optimal ablaufen können (Penzlin, 1996).

Lebensweise der Amphipoden *Cheirimedon femoratus* und *Djerboa furcipes*

Der Amphipode *C. femoratus* gehört zu der in der Antarktis stark repräsentierten Familie der Lysianassidae (Bregazzi, 1972b) und ist von seinem Körperbau her „asselartig“ und „weich“ gebaut. Er kommt in Tiefen von 4-30 m vor, wobei er in 25 m Tiefe mit annähernd 14 % an der Biomasse der Amphipoden am häufigsten ist (Jazdzewski, 1991). Sein bevorzugtes Substrat ist feiner Sand und er ist daher in seiner Verbreitung begrenzt. Die während des Winters produzierte Brut ist relativ groß.

Die sichtbaren Schwimm- und Freßaktivitäten von *C. femoratus* sind hauptsächlich in der Dunkelheit zu beobachten. Im Winter wird die Aktivität dann zugunsten der Reproduktion stark reduziert (Bregazzi, 1973).

Die Männchen werden max. 12 mm (9-12 mm), die Weibchen max. 16 mm (13-16 mm) groß. *C. femoratus* ist ein anpassungsfähiger Allesfresser (Räuber), der bevorzugt von Aas lebt. Die Ausnahme bilden die frühen Juvenilstadien, in denen hauptsächlich Algen gefressen werden. Bekannte Freßfeinde von *C. femoratus* sind Fische der Gattung *Nothothenia*, die Riesenassel *Glyptonotus* sowie die Kaptaube *Daption capensis*. Auch andere Fischarten, verschiedene Würmer, Amphipoden und vielleicht junge Robben sind potentielle Freßfeinde. Familienmitglieder der Lysianassidae sind bekannt für ihre aasfressenden Gewohnheiten und damit weniger vom saisonalen Futterangebot abhängig. Allerdings sind die frisch geschlüpften *C. femoratus* sowie die eiertragenden Weibchen obligate Pflanzenfresser (Bregazzi, 1972a).

D. furcipes ist relativ wenig bekannt und kaum untersucht worden. Der Amphipode gehört zu der Familie der Eurusidae und kommt in Tiefen von 20-30 m vor, wo er 0,2-0,9 % der gefundenen Biomasse der Amphipoden erreicht. Körperbau und Lebensweise von *D. furcipes* ähneln sehr stark der von *C. femoratus* (Jazdzewski, 1991).

Lebensweise des Isopoden *Serolis polita*

Bei *S. polita* handelt es sich um einen benthisch räuberischen Isopoden. Unter den percariden Crustaceen sind speziell die Amphi- und Isopoden sehr stark in der benthischen Meeresfauna vertreten (Luxmore, 1985).

Die Art *Serolis* ist in der Antarktis mit 20 Arten vertreten. Alle haben ein ähnliches Erscheinungsbild, sie sind dorso-ventral abgeflacht, typischerweise räuberisch und leben im Weichsediment (Luxmore, 1985).

Ihre Verbreitung reicht vom Äquator bis zur Ross See. Daher dienen sie seit längerem als Modell für Theorien zur antarktischen Anpassung. *S. polita* ist auf die Scotia See begrenzt und kommt im flachen Wasser vor (Luxmore, 1985).

Es handelt sich um einen Räuber ohne besondere Vorlieben, wobei im Nahrungsspektrum Amphipoden und Polychaeten dominieren.

Bei einer Länge von ca. 20 mm brauchen sie 28 Monate bis zur Geschlechtsreife (Luxmore, 1982a).

Die Tragezeit im Marsupium dauert ca. 20 Monate. Die gut entwickelten Jungen schlüpfen dann im Frühling. Zusätzlich ist auch eine zweite Brut im Herbst möglich. Die Weibchen erreichen ein Alter bis zu 6 Jahren und mehr (Luxmore, 1982b).

S. polita verbleibt 75-78 % seiner Zeit vergraben unter der Sedimentoberfläche (Luxmore, 1981).

Der Aufenthalt außerhalb des Sedimentes wurde auf 4,7 % der Gesamtzeit an der Oberfläche bestimmt. Dies führt zu einer Erhöhung der Respirationsrate um das 2,4 fache der Ruherate (Luxmore, 1984). D. h. 6,6 % Erhöhung der Rate würden für die Aktivitäten erlaubt sein.

Lebensweise der penaeiden Garnele *Xiphopenaeus kroyeri*

Die vor Ubatuba im Südosten Brasiliens gefangene penaeide Garnele *X. kroyeri* besitzt ein weites geographisches Verteilungsmuster im Westatlantik. Vor Ubatuba ist sie drei Schelfwassermassen ausgesetzt, die sich durch verschiedene Verteilungsmuster auszeichnen. Zum einen handelt es sich um küstennahe Wassermassen (CW) mit hoher Temperatur und geringer Salinität ($> 20^{\circ}\text{C}$, $< 36\text{‰}$), zum anderen tropische Wassermassen (TW) mit hoher Temperatur und hoher Salinität ($> 20^{\circ}\text{C}$, $> 36\text{‰}$). Zusätzlich treten zentrale Wassermassen des Südatlantik (SACW) mit niedriger Temperatur und niedriger Salinität ($< 20^{\circ}\text{C}$, $< 36\text{‰}$) auf. Während der Sommermonate auf der Südhalbkugel dringt das SACW in Grundsichten des Küstenwassers ein und bildet so eine starke Sprungschicht in den mittleren Wasserschichten. Im Winter dagegen wird das SACW vom CW zurückgedrängt und ersetzt. D. h. es gibt während der Wintermonate eine homogene Verteilung der Wassermassen (Castro Filho, 1987; Pires, 1992; Carvalho, 1997/1998). Das SACW ist dabei reich an Nährstoffen und bewirkt eine intensive Eutrophierung, was die lokale Primärproduktion auf das 7-10 fache ansteigen läßt. Die Megafauna des Littorals vor Ubatuba besteht bis zu 67 % aus *X. kroyeri*, der dem warmen CW folgt. Im Winter bevorzugt *X. kroyeri* Schlamm und gemischte Bodenstrukturen. Außer im CW kommt *X. kroyeri* in den anderen Wassermassen nur in vernachlässigbar kleinen Mengen vor (Pires, 1992). Diese Daten stimmen mit den Erfahrungen überein, die der Autor bei zwei Reisen nach Ubatuba 1993 und 1996 beim Fang von *X. kroyeri* gemacht hat.

Die Tiere wurden nach dem Fang bei verschiedenen Temperaturen gehältert (16, 20, 24, 28, 32°C). Dies diente dazu die Fähigkeit der Temperaturanpassung dieses, den gemachten Beobachtungen nach, warm stenothermen Tieres zu untersuchen.

VI.3 Diskussion der Ergebnisse des biologischen Vergleiches

Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war die Aufreinigung der CS und die darauffolgende Charakterisierung des Enzyms. Es wurden Enzymaktivitäten und die damit verbundenen Parameter $V_{\max}$ (maximale Substratumsatzrate), K_i (Inhibitorkinetik), K_M (Michaelis-Menten-Kinetik), Temperaturoptimum und E_A (Aktivierungsenergie) bestimmt.

Zur Quantifizierung der CS diente der eigens etablierte enzymgekoppelte Immun-Test (ELISA: Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test).

Zur Interpretation der Ergebnisse werden die vermutlich durch die verschiedenen Schwimmaktivitäten und die Temperatur geprägten Enzymeigenschaften bei den benthischen und dann bei den pelagischen Crustaceen einander gegenübergestellt.

Um die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse zu verdeutlichen ist hier eine vereinfachte Vergleichstabelle der wesentlichen Regulationsparameter der CS aufgeführt:

Art (nach Müller 2002)	Vergleichsparameter	E_A KJ * mol ⁻¹	$V_{\max}$ mU * ml ⁻¹	K_M μmol * l ⁻¹	K_i mmol * l ⁻¹	CS μg * g ⁻¹
<i>C. femoratus</i>	k s b	32	0.3	12	0.9	20
<i>D. furcipes</i>	k s b	33	0.3	11	0.9	19
<i>S. polita</i>	k s b	34	0.4	12	1.5	12
<i>E. superba</i>	k s p	34	0.5	16	1.0	503
<i>M. norv. katt</i>	g e p	39	0.1	18	0.9	96
<i>M. norv. med</i>	w e p	39	0.2	19	0.9	72
<i>X. kroyeri</i>	t s b	35	0.3	11	1.4	11
<i>I. baltica</i> (Salomon 2000)	g e b	41	0,4	15	0,8	n.d

b benthisch; p pelagisch
 k kalt; g gemäßigt
 w warm; t tropisch
 s stenotherm; e eurytherm

dunkelgrau
 und schwarz: ähnliche Werte in den jeweiligen Säulen

Zunächst werden die **qualitativen** Parameter der Citratsynthase diskutiert:

Benthische Crustaceen:

Die polaren benthischen (*S. polita*) und benthopelagischen Vertreter (*C. femoratus*, *D. furcipes*) sowie der tropisch benthische Vertreter (*X. kroyeri*) haben niedrige K_M -Werte, also hohe Substratumsatzraten. Bei den polaren Krebsen kann diese Eigenschaft im Sinne einer Leistungssteigerung bzw. metabolischen Temperaturkompensation diskutiert werden. Dieses gilt auch für die niedrigen Aktivierungsenergien E_A , sowie die relativ hohen Werte für V_{max} . Da diese Ähnlichkeiten jedoch sowohl bei den polaren als auch bei der tropischen Garnele auftreten, könnten diese Eigenschaften vielleicht auch als allgemein typisch für die benthisch-stenotherme Lebensweise angesehen werden.

Erhebliche Unterschiede zeigen sich dagegen im K_i -Wert. Hier treten die rein benthischen gegenüber den benthopelagischen und pelagischen Crustaceen deutlich hervor. Die strikt benthischen Crustaceen *S. polita* und *X. kroyeri* leben die meiste Zeit im Sand vergraben und kommen nur kurzzeitig zur Futtersuche aus ihren Verstecken hervor (Luxmore, 1981; Pires, 1992).

Bei beiden zeigt der hohe K_i -Wert ein dauernd „enthemmtes“ Enzym an (Vetter, 1992). Entsprechend kann viel CS umgesetzt und immer viel ATP produziert werden. Dies geht allerdings zu Lasten der Regulationsfähigkeit der CS. Eine solche Regulationsfähigkeit ist allerdings bei den relativ trägen Crustaceen wie *S. polita* und *X. kroyeri* auch nicht notwendig.

Dementsprechend kann vermutet werden, daß bei den strikt benthischen Vertretern eine bestimmte Basisaktivität für die kurzen Aktivitätsschübe zur Futtersuche andauernd bereitgehalten wird. Dies ist unabhängig von der Klimazone.

Der Vergleich mit dem beweglicheren benthopelagischen Isopoden *I. baltica* (Franke, 1998; Salomon, 2000) bestätigt die zuletzt genannte Hypothese weiterhin, da diese einen ähnlich niedrigen K_i -Wert wie die anderen untersuchten Crustaceen aus diesem Lebensraum zeigen.

Diese eurythermen benthopelagischen Krebse zeigen, im Vergleich mit den pelagischen Vertretern (s. u.), relativ hohe Werte für die E_A und K_M .

Zusammenfassend kann als Schlußfolgerung zu den Enzymeigenschaften der benthischen Vertreter gelten:

Benthisch und benthopelagisch stenotherm:

unabhängig von der Klimazone scheinen hierbei niedrige E_A , angehobene $V_{\max}$ und niedriger K_M typisch zu sein. Bei den polaren Vertretern kann die sinngemäße Anpassung dieser Parameter auch zur Leistungssteigerung im Kalten dienen.

Strikt benthisch stenotherm: ein hoher K_i -Wert zeigt ein „enthemmtes“ Enzym bei niedriger Regulationsfähigkeit an.

Benthopelagisch eurytherm: diese Krebse haben relativ hohe E_A - und K_M -Werte.

Pelagische Crustaceen:

E. superba als pelagischer Crustacee zeigt bei E_A und $V_{\max}$ deutlich stenotherm geprägte Eigenschaften mit niedriger E_A und angehobener $V_{\max}$. Wie bei den benthischen Krebsen könnte dies ebenfalls im Sinne einer Leistungssteigerung im Kalten angesehen werden.

Bezogen auf den K_M - und K_i -Wert zeigen sowohl der antarktische als auch der nördliche Krill keine signifikanten Unterschiede. Offenbar wird hier der qualitative Weg der Leistungssteigerung nicht beschritten, sondern der quantitative über die Enzymmenge (s. u.).

M. norvegica zeigt die meisten Unterschiede in den Leistungsparametern insgesamt und auch im Vergleich mit den benthischen Crustaceen. D. h. die pelagische Lebensweise bestimmt stark die Leistungsparameter der CS. Aus den beiden Vergleichsgebieten Kattegat und Mittelmeer zeigte *M. norvegica* jedoch kaum Unterschiede. Es handelt sich um die gleiche Art (Zane et al., 1999). Möglicherweise können Temperaturunterschiede leicht ausgeglichen werden, da es sich um ein eurythermes Tier handelt.

Als Schlußfolgerung zu den Enzymeigenschaften der pelagischen Vertreter gilt:

Pelagisch stenotherm: niedrige E_A , hohe $V_{\max}$, hoher K_M und niedriger K_i -Wert.

Pelagisch eurytherm: hohe E_A , niedriger $V_{\max}$, hoher K_M und niedriger K_i -Wert.

Im folgenden wird der **quantitative** Regulationsweg der Citratsynthase diskutiert:

Die quantitativen Bestimmungen der CS zeigen eindeutige Ergebnisse. Dieses gilt für alle drei pelagischen Vertreter, die ein vielfaches (4-25 fach) mehr an CS-Protein als die benthischen Crustaceen aufwiesen. Dies bestätigt zunächst die grundsätzliche Einstellung auf den pelagischen im Vergleich zum benthischen Lebensraum.

Dies kann darin begründet sein, daß die pelagischen, ständig schwimmenden Tiere den höheren Leistungsbedarf haben und, um diesem Leistungsbedarf gerecht zu werden, eine quantitative Hochregelung der CS erfolgt.

Auch hier läßt sich die Tendenz zeigen, daß pelagische Crustaceen aus den kälteren Regionen noch mehr CS synthetisieren. *M. norvegica katt.* hatte 1,3 fach mehr CS als *M. norvegica med.* und *E. superba* nochmals ca. das fünffache mehr an CS als *M. norvegica katt.* Dieses könnte man als Notwendigkeit zur weitergehenden metabolischen Kompensation der polaren Temperaturen ansehen.

Als Schlußfolgerung aus den durchgeführten Mengenbestimmungen der CS ergibt sich: Die große Differenz in der CS-Menge zwischen den benthischen und pelagischen Crustaceen, mit einer bis zu 50fach höheren Menge bei den pelagischen Vertretern, läßt hier nur den Schluß zu, daß die pelagische Lebensweise ein entscheidendes Mehr an CS als die benthische erfordert.

Als Schlußfolgerung für den qualitativen Regulationsweg gilt:

Pelagisch: deutlich erhöhte Enzymaktivitäten gegenüber den benthischen bzw. benthopelagischen Vertretern.

Im folgenden wird der Einfluß des Temperaturstress, für den die Hitzeschockproteine (HSPs) hervorragende Marker sind, auf die CS weitergehend diskutiert. Das Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, ob die HSPs einen regulierenden Einfluß auf die CS-Aktivität ausüben können.

Beziehungen zwischen der Produktion an Hitzeschockproteinen und der CS-Regulation

Ein erster Hinweis, daß die Krebse in ihrem natürlichen Lebensraum Temperaturstreß ausgesetzt sind, ergibt sich aus der Lebensweise der Tiere. Für *X. kroyeri* gilt: Diese Art folgt kontinuierlich dem warmen Wasser, wenn zu Beginn des Sommers kalte Wassermassen des Südatlantik (SACW) mit Temperaturen von unter 20 °C in die Bucht vor Ubatuba eindringen. Die Tiere werden dann mit Temperaturunterschieden von bis zu 10 °C ausgesetzt, vor denen die Tiere durch Abwandern in die flachen, warmen Küstengewässer ausweichen (Pires, 1992).

M. norvegica aus dem Kattegat wird im Sommer ebenfalls mit Temperaturunterschieden von über 10 °C bei seinen täglichen Vertikalwanderungen konfrontiert. So hält er sich tagsüber unter der Sprungschicht mit annähernd 6 °C auf und steigt bei Sonnenuntergang in die Nähe der Wasseroberfläche empor, wo im Sommer bis zu 16 °C herrschen (Buchholz, 2000).

Bei *M. norvegica* aus dem Mittelmeer sind diese Temperaturunterschiede im Sommer bei weitem nicht so ausgeprägt. Das Tier lebt in der Tiefe bei konstanten Temperaturen von 12-13 °C und dringt in die bis 25 °C angewärmte Oberflächenschicht nur sporadisch ein (Buchholz, 2000).

Die auf den polaren Ringozean begrenzten, hier untersuchten Crustaceen *E. superba*, *C. femoratus*, *D. furcipes* und *S. polita* sind solchen Streßbedingungen nicht ausgesetzt. Sie leben dauerhaft bei sehr konstanten Temperaturen um 0 °C (Clarke, 1998; Somero, 1998).

Zunächst fällt auf, daß das Temperaturoptimum der CS keine Beziehung zur Temperaturanpassung zeigt (Sokolova, 2001). Die Maxima der Aktivitäten liegen mit 35-40 °C weit höher als die Temperaturen im natürlichen Lebensraum (Luxmore, 1981-1985; Jadzweski, 1991; Pires, 1992). Das betrifft auch den tropischen Vertreter, der Maximaltemperaturen von ca. 30 °C erfährt. Deshalb wurde dieser Ansatz im Vergleich nicht berücksichtigt.

Dagegen wurden die während starken Temperaturwechseln vermehrt produzierten Streßproteine einer näheren Betrachtung unterzogen, da bei den untersuchten Krebsen sehr unterschiedliche Notwendigkeiten des Temperaturschutzes der Enzyme auftreten müßten. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit die Regulation der CS und die Exprimierung der Streßproteine gekoppelt sind.

Die Hauptaufgabe der sogenannten Streßproteine, auch Chaperone (HSP 70) bzw. Chaperonine (HSP 60) genannt, ist die Minimierung der Proteinaggregation und der Schutz der hydrophoben Proteinregionen zur Gewährleistung der korrekten Faltung eines Proteins (Schlesinger 1990; Ujwal, 2000).

Sie kommen in jeder eukaryotischen Zelle vor und werden durch zahlreiche umgebungsbedingte Belastungsfaktoren unter ATP-Verbrauch vermehrt produziert (Somero, 1997; Lewis, 1999; Hardewig, 2000).

Es gibt allerdings kaum Studien über die HSP-Antwort während der frühen Phase der Anpassung nach einer drastischen Temperaturerhöhung (Hardewig, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch kontinuierliche Probennahmen von Minuten über Stunden bis Tage versucht.

Bei Eukaryoten kommen HSP 70 und HSP 60 im Cytosol, Nucleus, Mitochondrien, Chloroplasten und Endoplasmatischen Reticulum (ER) vor.

HSP 70 hat zwei funktionelle Domänen und zwar eine N-terminale ATPase-Domäne (40 kD) und eine C-terminale Peptidbindungs-Domäne (25 kD). Als Aktivator der HSP 70 ATPase fungiert HSP 40, das auch an ungefaltete Polypeptide binden und sie dann der an ATP gebundenen HSP 70-Form anbieten kann (Agashe, 2000).

Die Chaperone (HSP 70) und ATPasen sind hoch konserviert. Sie werden bei Streß zum Schutz der Enzymaktivität vermehrt synthetisiert (Ashburner, 1982; Sanders, 1988; 1990; 1993; Pyza, 1997).

HSP 70 (Chaperon) dient als ein Puffer für ungefaltete Proteine, indem ein von ATP abhängiger Zyklus zwischen gebundenem und freiem Zustand durchlaufen wird (Agashe, 2000).

Das wieder freigegebene Protein wird an HSP 60 (Chaperonin) weitergegeben, das über mehrere Untereinheiten einen Hohlraum ausbildet (Afinsen-Käfig), der Proteine von 50-60 kD aufnehmen kann. Dieser Vorgang zur Bindung, Faltung und Lösung von Peptiden erfordert 2*7 ATP, das direkt aus den Mitochondrien bezogen und über eine 56 kD Permease ins ER gebracht wird (Agashe, 2000).

Eine weitere Aufgabe von HSP 70 ist der Transport von Proteinen in die Mitochondrien. Dieser Transport ist ebenfalls von ATP abhängig. In den Mitochondrien werden die Proteine dann ebenfalls von HSP 60 übernommen, wenn nötig gefaltet und freigelassen (Pfanner, 1990; Pyza, 1997; Kleinig, 1999).

Die Chaperonine (HSP 60) sind essentiell für die Zellebensfähigkeit unter allen Wachstumsbedingungen. Sie sind strikt notwendig, um Mißfaltung und Aggregation zu vermeiden. Bei Eukaryoten sind es 15 % der neu synthetisierten Polypeptide, die den Zyklus der Faltungsrounds durchlaufen (Agashe, 2000).

Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluß der Temperaturstreß auf die Enzymaktivität hat und welche Rolle die HSPs dabei spielen.

Die Änderungen der Enzymaktivitäten erscheinen als ein Resultat von Schwankungen der Balance zwischen Enzymsynthese und -abbau. Der Abbau denaturierten oder geschädigten Enzyms ist dabei größtenteils unter der Kontrolle des HSP-Ubiquitin Stoffwechselweges (Sherman, 1996).

Der Einfluß der Temperatur auf metabolische Enzyme wird durch enzymspezifische Vorgänge wie transkriptionelle Regulation, Proteinhalbwertszeit sowie RNase-Aktivität und Translationseffizienz überlagert. Als Antwort auf Umgebungsstreß muß sowohl die Regulation als auch der Einfluß der Veränderung durch Proteinabbau bedacht werden (Hardewig, 2000).

Leichte Veränderungen in der Enzymgeometrie aufgrund von Temperatureffekten können die katalytische Kapazität der Enzyme verändern, die Rate der ungefalteten Proteine wird erhöht und es kommt zur oxidativen Schädigung (Somero, 1997). Hier setzen die HSPs ein und vermitteln ihre Streßschutzaktivität durch Katalyse der Faltung ungefalteter Proteine (Somero, 1995).

Die Streßantwort ist generell ein schneller Prozeß, der nach thermischem Streß zu einem typischen 10-100 fachen Anstieg von HSP 70 innerhalb von Minuten bis mehreren Stunden führt (Dietz, 1994; Currie, 1999). Dabei wird die Definition von schnell allerdings nur sehr schwammig definiert. So werden 10-16 h zur maximalen HSP-Expression durchaus noch als schnelle Reaktion bezeichnet.

Während thermischem Streß können cytosolische Proteine durch schnell induziertes HSP 70 geschützt werden.

CS als mitochondrielles, vom Zellkern kodiertes Enzym kann allerdings nicht direkt von den erhöhten Mengen an HSP 70 profitieren. Dennoch ist die mitochondrielle Funktion durch die Hitzeschockantwort geschützt, denn die Mitochondrien dienen als primäres intrazelluläres Ziel der durch Hitzeschock induzierten oxidativen Verletzung. Desweiteren korreliert der Schutz bestens mit der HSP 70-Expression (Patriarca, 1990; Polla, 1996; Hardewig, 1999).

Die Proteinschädigung durch freie Radikale ist nicht zu vernachlässigen. In aeroben Geweben ist die mitochondrielle Elektronentransportkette eine wichtige Quelle der Produktion freier Radikale (Richter, 1995).

Da die Änderung der mitochondriellen Produktion freier Radikale als Streßantwort beobachtet worden ist, können Enzyme der mitochondriellen Matrix dem schädigenden Einfluß freier Radikale stärker ausgesetzt sein. Dieser Effekt könnte zu den unterschiedlichen Veränderungsmustern zwischen cytosolischen (glykolytischen) und mitochondriellen (oxidativen) Enzymen beitragen, wie es bei Fischen während der Warmakklimatisation beobachtet worden ist (Guderley, 1998).

Dies schlägt sich in einer reduzierten CS-Aktivität nieder, wobei die mitochondriellen Enzymaktivitäten bei warm angepaßten Individuen reduziert sind (Guderley, 1990; 1998).

Temperaturabhängige Änderungen der Enzymsynthese können durch spezifische, regulatorische Mechanismen, die die Expression einiger Enzyme regulieren, beeinflußt werden. Der Verlust der CS-Aktivität wird allerdings schneller erreicht, als dies Effekte abnehmender CS-mRNA erklären könnten (Seedorf, 1986; Hardewig, 2000).

Ansteigende Konzentrationen von HSP 70 dienen als unspezifischer Indikator für physiologischen Streß.

Die Quantifizierung von HSP 70 wurde mit Western- und Immuno-Blotting durchgeführt (s. a. Lewis, 1990; Sanders, 1993; Currie, 1997).

Es stellt sich zunächst die Frage inwieweit HSP 70 in die CS-Regulation eingreift.

Dazu muß man berücksichtigen, daß ATP einer der wichtigsten Effektoren der CS ist (Jangaard, 1968). Es wird sogar angenommen, daß die Regulation der CS durch ATP für dauernd schwimmende Euphausiiden essentiell ist (Vetter, 1998).

Durch den Hitzestreß, dem die Crustaceen bei den Streßexperimenten ausgesetzt waren, wird vermehrt ATP aus den Mitochondrien von den HSPs für die korrekte Proteinfaltung und deren Transport benötigt (Minami, 1996; Agashe, 2000).

Somit könnte diese ATP-Entnahme aus den Mitochondrien die Regulation der CS-Aktivität beeinflussen. Daher müßten eventuell erhöhte $V_{\max}$ -Werte auftreten, da ATP über eine negative Rückkopplung die CS als Effektor reguliert (Jangaard, 1968).

Für einen Schutz durch HSP nach der CS-Synthese (HSP 70 und HSP 60 haben eine breite Substratspezifität (Shinde, 2000)), würde auch die Größe der CS-Monomere von ca. 50 kD sprechen, denn die Faltungskammer der Chaperonine (HSP 60) ist in der Lage Peptide einer Größe von 50-60 kD zu binden und der korrekten Faltung zu unterziehen. Dies wäre dann auch gleichzeitig eine Interpretationsmöglichkeit, wie die kernkodierte CS in den Mitochondrien aktiviert wird (Import durch HSP 70, Übernahme durch die HSP 60 Faltungskammer, danach Zusammensetzung der Monomere zum fertigen CS-Dimer von ca. 100 kD; s. a. Rassow et al., 1994).

Daraus ergibt sich die Frage, wie sich eine steigende HSP 70-Menge auf die $V_{\max}$ der CS auswirkt.

Von den auf HSP 70 getesteten Crustaceen konnten nur bei den warm-stenothermen *X. kroyeri* positive Reaktionen mit Anti-HSP 70 Antikörpern erzielt werden. Bei allen anderen untersuchten Crustaceen konnte keinerlei HSP 70 detektiert werden.

Eventuell wurden die HSPs von den verwendeten Antikörpern nicht erkannt. Eine genauere Erklärung dafür läßt sich nicht geben, da, wie bereits erwähnt, die Chaperone und Chaperonine auch bei Crustaceen hoch konserviert und essentiell für die Zelle sind. Möglicherweise wären noch weitere Extraktionssysteme zu testen gewesen, was aber aus zeitlichen Gründen nicht möglich war.

Folglich wurde nur *X. kroyeri* einer intensiven HSP 70-Untersuchung unterzogen.

Die eingehenden HSP 70-Untersuchungen an *X. kroyeri*, die *in vivo* verschiedenen Temperaturen ausgesetzt wurden (Vorinkubation für 24 h bei 16, 20, 24 °C und dann jeweils bei einer Streßtemperatur von 28 °C eingesetzt) zeigten, daß bei allen drei getesteten Temperaturen jeweils zu Zeitpunkten zwischen 10 und 20 h nach dem Hitzstreß die höchsten HSP 70-Mengen mit einem breiten Maximum zwischen 10 und 16 h auftraten.

Dies bestätigt die Aussagen von Sanders (1993), daß die HSP-Exprimierung bei Crustaceen nach einigen Stunden erfolgt, also eine Vorlaufphase zur Exprimierung von HSP 70 erforderlich ist, in der ATP an HSP 70 gebunden wird, in den Zellkern transloziert und dort die Produktion von HSP 70-mRNA initiiert, um mit erhöhter HSP 70-Menge direkt auf den Temperaturstreß reagieren zu können (Agashe, 2000).

Bei allen Hälterungsserien wurden die höchsten HSP 70-Mengen nach 16 h erreicht.

Als Interpretationsmöglichkeiten bietet sich folgendes an:

Nach den vorliegenden Beobachtungen ist die höchste HSP 70-Expression bei der größten Temperaturdifferenz zwischen Vorinkubation und Streßtemperatur zu verzeichnen (Dietz, 1994; Currie, 1999). Im Einzelnen waren dies bei 12 °C Temperaturdifferenz 12,5 µg, bei 8 °C Temperaturdifferenz 8,5 µg und bei 4 °C Temperaturunterschied nur noch 6,7 µg HSP 70 pro Gramm Tier.

D. h. die $V_{\max}$ -Werte pendeln sich, unabhängig von der Streßtemperatur, nach größeren Schwankungen zu Beginn des Temperaturstresses bei konstanten nicht signifikant verschiedenen d. h. vergleichbar hohen Werten ein.

Das HSP 70-Experiment legt daher den Schluß nahe, daß, anschließend an eine Einstellungsphase, HSP 70 einen stabilisierenden Einfluß auf die $V_{\max}$ hat und zwar derart, daß eine gleichbleibend erhöhte HSP 70-Expression für konstante $V_{\max}$ -Werte verantwortlich wäre.

Dieses bestätigt zunächst die Hypothese, daß die HSP-Exprimierung den $V_{\max}$ -Wert beeinflussen kann. Weiterhin würde dadurch die Leistungsfähigkeit des Tieres unabhängig von der Temperatur sichergestellt.

Um dies allerdings sicher bestimmen zu können, müßten noch weitere Folgeexperimente durchgeführt werden.

Unter anderem sollten größere Temperaturdifferenzen und Temperaturen getestet werden, die nahe an die kritische Überlebenstemperatur herangehen (ca. 35 °C bei Versuchen in Ubatuba).

VI.4 Schlußbetrachtung

In dieser Arbeit wurde erstmals versucht die CS bei den verschiedenen hier untersuchten Crustaceen quantitativ zu bestimmen. Dies ist mit dem eigens dafür produzierten polyklonalen Antikörper auch gelungen. Es zeigte sich, daß die pelagischen gegenüber den benthischen Crustaceen eine bis zu 50fach höhere CS-Menge aufwiesen, um den notwendigen Energiebedarf als dauernd schwimmende Arten zu decken. Bei dem Vergleich der pelagischen Crustaceen fällt dann wiederum auf, daß wahrscheinlich zur metabolischen Kompensation der kälteren Temperaturen ebenfalls noch mehr CS, nämlich bis zum Fünffachen mehr, als bei den Crustaceen aus den gemäßigten Breiten benötigt wird.

Als nächstes müßte sich jetzt als eine qualitativ und quantitativ vergleichende Untersuchung der polaren und gemäßigten Amphi- und Isopoden anschließen, um festzustellen, ob bei den benthischen bzw. benthopelagischen Crustaceen ein ebensolcher Effekt nachzuweisen wäre.

Generell läßt sich folgern, daß die Temperaturanpassung auf enzymatischer Ebene ein vielschichtiger Prozeß ist, der durch kinetische Parameter, die Enzyme auf- und abbauende Prozesse sowie die Enzymmenge und den Schutz durch ausgewiesene Chaperon- und Chaperoninstrukturen als Ganzes zu sehen ist.

VII. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Crustaceen biochemische Temperaturanpassungen auf enzymatischer Ebene vergleichend zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurden vielfach Temperatureinflüsse auf Stoffwechselfvorgänge anhand von Enzymen untersucht, die an zentralen Stellen des Stoffwechsels stehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Citratsynthase (CS, EC 4.1.3.7), als Schlüsselenzym des Citratzyklus, erstmalig unter besonderer Beachtung von quantitativen Regulationsprozessen eingehend untersucht. Zusätzlich wurde die Auswirkung des Temperatur- und Hälterungsstress auf die Regulationsfähigkeit der CS durch quantitative Bestimmung von Hitzeschockproteinen (HSP 70) untersucht.

ENZYMREGULATION IM BIOLOGISCHEN VERGLEICH

Für den biologischen Vergleich wurden Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen und mit verschiedenen Lebensweisen gegenübergestellt.

Der nordische Krill, *M. norvegica*, hat als pelagischer Krebs einen hohen Energieumsatz und besitzt aufgrund seiner Fähigkeit, sich an variierende Umweltfaktoren anzupassen, also im Bezug auf die Temperatur als eurythermes Tier, ein sehr weites Verbreitungsgebiet.

Der antarktische Krill, *E. superba*, ist dagegen auf den polaren antarktischen Ringozean begrenzt, hat aber wie der nordische Krill, als ebenfalls ständig schwimmende Art, ebenfalls einen hohen Energieumsatz und wurde deswegen als kalt stenothermer Vergleichsorganismus ausgewählt.

Die am wenigsten aktiven Crustaceen, die benthopelagischen Amphipoden (*C. femoratus*, *D. furcipes*) und der benthische Isopode (*S. polita*) wurden als kalt-stenotherme Vergleichsorganismen betrachtet.

Wenig aktiv ist auch die benthisch lebende penaeide Garnele *X. kroyeri*, die dem tropisch-warmen Wasser vor der Südküste Brasiliens folgt und daher als warm stenothermes Tier eingestuft wurde. Als benthopelagisch eurythermer Vergleichsorganismus, aus der klimatisch gemäßigten Nordsee, wurde der von Salomon (2000) untersuchte Isopode *Idotea baltica* herangezogen.

Auf diese Weise war ein eingehender inter- und intraspezifischer Vergleich von Crustaceen hinsichtlich der Klimazone, des Lebensraumes, der Lebensweise und der Anpassungsfähigkeit möglich.

Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war die Aufreinigung der CS und die darauffolgende Charakterisierung des Enzyms. Es wurden Enzymaktivitäten und die damit verbundenen Parameter $V_{\max}$ (maximale Substratumsatzrate), K_i (Inhibitorkinetik), K_M (Michaelis-Menten-Kinetik), Temperaturoptimum und E_A (Aktivierungsenergie) bestimmt.

Um eine Aussage über die Menge an CS machen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper (pAK), gegen die CS von *E. superba* gerichtet, entwickelt.

Der hergestellte pAK detektierte im Immunoblot die CS aller getesteten Vergleichsorganismen. Es wurden Molekulargewichte von 105-112 kD für das Dimer und ca. 50 kD für das Monomer der CS ermittelt.

Zur Quantifizierung der CS wurde ein enzymgekoppelter Immun-Test (ELISA: Enzym gekoppelter Antikörper gebundener Test) etabliert und standardisiert, um erstmalig Aussagen über die vorhandenen CS-Mengen der Crustaceen treffen zu können.

Folgende Ergebnisse zur Enzymregulation wurden erzielt:

BENTHISCHE CRUSTACEEN:

Enzymeigenschaften der benthischen Vertreter:

Benthisch stenotherm: ein hoher K_i -Wert zeigt ein „enthemmtes“ Enzym bei niedriger Regulationsfähigkeit an.

Bentho-pelagisch

stenotherm: unabhängig von der Klimazone scheinen hierbei niedrige E_A , angehobene V_{max} und niedriger K_M typisch zu sein. Bei den polaren Vertretern kann die sinnngemäße Anpassung dieser Parameter auch zur Leistungssteigerung im Kalten dienen.

Bentho-pelagisch eurytherm: der untersuchte Vertreter hat auffällig hohe E_A - und K_M -Werte.

PELAGISCHE CRUSTACEEN:

Enzymeigenschaften der pelagischen Vertreter:

Pelagisch stenotherm: niedrige E_A , hohe V_{max} , hoher K_M und niedriger K_i -Wert.

Pelagisch eurytherm: hohe E_A , niedriger V_{max} , hoher K_M und niedriger K_i -Wert.

Die quantitativen Bestimmungen der CS zeigen eindeutige Ergebnisse. Dieses gilt für alle drei pelagischen Vertreter, die ein vielfaches (4-25 fach) Mehr an CS-Protein als die benthischen Crustaceen aufwiesen. Dies bestätigt zunächst die grundsätzliche Einstellung auf den pelagischen im Vergleich zum benthischen Lebensraum.

Auch hier läßt sich die Tendenz zeigen, daß pelagische Crustaceen aus den kälteren Regionen noch mehr CS synthetisieren. *M. norvegica katt.* hatte 1,3 fach mehr CS als *M. norvegica med.* und *E. superba* wies nochmals ca. das Fünffache an CS als *M. norvegica katt.* auf.

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER PRODUKTION VON HITZESCHOCKPROTEINEN (HSPs) UND DER CS-REGULATION

Die während starken Temperaturwechseln vermehrt produzierten Streßproteine wurden einer näheren Betrachtung unterzogen, da bei den untersuchten Krebsen sehr unterschiedliche Notwendigkeiten des Temperaturschutzes der Enzyme auftreten mußten. Gleichzeitig sollte untersucht werden, inwieweit die Regulation der CS und die Expression der Streßproteine gekoppelt sind.

Die Hauptfunktion der sogenannten Streßproteine, auch Chaperone (HSP 70) bzw. Chaperonine (HSP 60) genannt, ist die Minimierung der Proteinaggregation und der Schutz der hydrophoben Proteinregionen zur Gewährleistung der korrekten Faltung eines Proteins.

Es stellt sich zunächst die Frage inwieweit HSP 70 in die CS-Regulation eingreift.

Dazu muß man berücksichtigen, daß ATP einer der wichtigsten Effektoren der CS ist. Es wird sogar angenommen, daß die Regulation der CS durch ATP für dauernd schwimmende Euphausiiden essentiell ist.

Von den auf HSP 70 getesteten Crustaceen konnten nur bei den warm-stenothermen *X. kroyeri* positive Reaktionen mit Anti-HSP 70 Antikörpern erzielt werden. Bei allen anderen untersuchten Crustaceen konnte keinerlei HSP 70 detektiert werden.

Folglich wurde nur *X. kroyeri* einer intensiven HSP 70-Untersuchung unterzogen.

Die eingehenden HSP 70-Untersuchungen an *X. kroyeri*, die in *vivo* verschiedenen Temperaturen ausgesetzt wurden (Vorinkubation für 24 h bei 16, 20, 24 °C und dann jeweils bei einer Streßtemperatur von 28 °C gehältert) zeigten, daß bei allen drei getesteten Temperaturen jeweils zu Zeitpunkten zwischen 10 und 20 h nach dem Hitzstreß die höchsten HSP 70-Mengen mit einem breiten Maximum zwischen 10 und 16 h auftraten.

Es ist also eine Vorlaufphase zur Exprimierung von HSP 70 erforderlich, in der ATP an HSP 70 gebunden wird, in den Zellkern transloziert und dort die Produktion von HSP 70-mRNA initiiert, um mit erhöhter HSP 70-Menge direkt auf den Temperaturstreß reagieren zu können.

Bei allen Hälterungsserien wurden die höchsten HSP 70-Mengen nach 16 h erreicht.

Nach den vorliegenden Beobachtungen ist die höchste HSP 70-Expression bei der größten Temperaturdifferenz zwischen Vorinkubation und Streßtemperatur zu verzeichnen (12,5-6,7 µg HSP 70 pro Gramm Tier).

Die $V_{\max}$ -Werte pendeln sich, unabhängig von der Streßtemperatur, nach größeren Schwankungen zu Beginn des Temperaturstresses bei einem konstanten nicht signifikant verschiedenen, d. h. vergleichbar hohen Wert ein.

Das HSP 70-Experiment legt daher den Schluß nahe, daß HSP 70, anschließend an eine Einstellungsphase, einen stabilisierenden Einfluß auf die $V_{\max}$ hat und zwar derart, daß eine gleichbleibend erhöhte HSP 70-Expression für konstante $V_{\max}$ -Werte verantwortlich ist.

Dies bestätigt zunächst die Hypothese, daß die HSP 70-Exprimierung den $V_{\max}$ -Wert beeinflusst. Weiterhin kann dadurch die Leistungsfähigkeit des Tieres unabhängig von der Temperatur sichergestellt werden.

FAZIT:

In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die CS bei verschiedenen Crustaceen quantitativ zu bestimmen. Dies ist mit dem eigens dafür produzierten polyklonalen Antikörper auch gelungen. Es zeigte sich, daß die pelagischen gegenüber den benthischen Crustaceen eine bis zu 50fach höhere CS-Menge aufwiesen, um den notwendigen Energiebedarf als dauernd schwimmende Arten zu decken. Bei dem Vergleich der pelagischen Crustaceen fällt dann beim polaren Vertreter auf, daß, wahrscheinlich zur metabolischen Kompensation der kälteren Temperaturen, noch mehr CS, nämlich bis zum fünffachen Mehr, als bei den Crustaceen aus den gemäßigten Breiten benötigt wird. Bei der tropischen Garnele konnte gezeigt werden, daß die HSP-Proteine eine leistungsstabilisierende Funktion haben.

Insgesamt wurde es deutlich, daß die Temperaturanpassung auf enzymatischer Ebene ein vielschichtiger Prozeß ist, der durch kinetische Parameter, die Enzyme auf- und abbauende Prozesse sowie die absolute Enzymmenge und den Schutz durch Chaperon- und Chaperoninstrukturen als Ganzes zu sehen ist.

VIII. Literaturverzeichnis

Agashe, V. R. and Hartl, F. U. (2000): Roles of molecular Chaperones in cytoplasmic protein folding. *Cell & Developmental Biology*. **11**, 15-25

Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1990): Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 2. Auflage

Andrews, A. T. (1992): Electrophoresis. Theorie, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Oxford Science Publications, Second Edition 205-240

Ashburner, M. (1982): The effects of heat shock and other stress on gene activity: An introduction. In Heat Shock from Bacteria to Man (Schlesniger, M. J., Ashburner, M. and Tissières, A., Eds) Cold Spring Harbor Laboratory Manual, Cold Spring Harbor NY. pp 1-9

Bloxham, D. P., Parmelee, D. C., Kumar, S., Wade, R. D., Ericson, L. H., Neurath, H., Walsh, K. A. and Titani, K. (1981): Primary structure of porcine heart Citrate Synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 5381-5385

Boucher, J. (1984): Localization populations in the Ligurian marine front: role of ontogenic migration. *Deep-Sea Res.* **31**, 469-484

Boucher, J., Ibanez, F. and Prieur, L. (1987): Daily and seasonal variations in the spatial distribution of zooplankton populations in relation to the physical structure in the Ligurian Sea Front. *Journal of Mar. Res.* **45**, 133-173

Bradford, M. M. (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

Bregazzi, P. K. (1972a): Life cycles and seasonal movements of *Cheirimedon femoratus* (Pfeffer) and *Tryphosella kergueleni* (Miers) (Crustacea : Amphipoda). *Br. Antarct. Surv. Bull.* **30**, 1-34

Bregazzi, P. K. (1972b): Habitat selection *C. femoratus* (Pfeffer) and *T. kergueleni* (Miers) (Crustacea: Amphipoda). *Br. Antarct. Surv. Bull.* **31**, 21-31

Bregazzi, P. K. (1973): Locomotor activity in *T. kergueleni* (Miers) and *C. femoratus* (Pfeffer) (Crustacea : Amphipoda). Br. Antarct. Surv. Bull. **33**, 17-32

Buchholz, F. (1988): Zur Lebensweise des antarktischen und nordischen Krills *E. superba* und *M. norvegica*: Vergleichende Untersuchungen der Häutungsversuche im Freiland und Labor. Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **185**, 245 pp

Buchholz, F. and Saborowski, R. (2000): Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* and Antarctic krill *Euphausia superba*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57** (3), 115-129

Burnette, W. N. (1981): „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. **112**, 195-203

Carvalho, P. S. M.; Phan, V. N. (1997): Oxygen consumption and ammonia excretion of *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Penaeidae) in relation to mass temperature and experimental procedures Shrimp oxygen uptake and ammonia excretion. J. exp. Mar. Biol. Ecol. **209**, 143-156

Carvalho, P. S. M.; Phan, V. N. (1998): Oxygen consumption and Ammonia Excretion during Moulting Cycle in the Shrimp *Xiphopenaeus kroyeri*. Comp. Biochem. Physiol. **119A** (3), 839-844

Castro Filho, B. M. de; Miranda, L. B. de, Miyao, S. Y. (1987): Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba; variações sazonais e em média escala. Bolm. Int. Ocenogr., S Paulo **35** (2), 135-151

Clarke, A. (1998): Temperature and energetics: An introduction to cold ocean physiology. In Pörtner, H. O. and Playle, R. C. (eds) Cold Ocean Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 3-30

Cornish-Bowden, A. (1979): Fundamentals of Enzyme Kinetics. Butterworth: London.

Currie, S. and Tufts, B. L. (1997): Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. J. of exp. Biol. **200**, 607-614

Currie, S. and Tufts, B. L. and Moyes, C. D. (1999): Influence of bioenergetic stress on heat shock protein gene expression in nucleated red blood cells of fish. *American Journal of Physiology* **276**, 990-996

Davis, B. J. (1964): Disc-Electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Anal. NY. Acad. Sci.* **121**, 404-427

Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K. M. (Eds.) (1987): Data for biochemical research. Clarendon Press, Oxford, 580 pp

Dietz, T. J. (1994): Acclimation fo the Threshold induction temperatures for 70 kDa and 90 kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys niwabilis*. *Journal of Exp. Biol.* **188**, 333-338

Dittrich, B. (1992): Thermal acclimation and kinetics of a trypsin-like protease in euca-rid crustaceans. *J. comp. Physiol.* **162B**, 38-46

Dixon, M. (1953): The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Jour-nal* **55**, 170-171

Franke, H.-D., Janke, M. (1998): Mechanisms and consequences of intra- and in-ter-specific interference competition in *Idotea baltica* (Pallas) and *Idotea emarginata* (Fabricius) (Crustacea: Isopoda): A laboratory study of possible proximate causes of habitat segregation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **227**, 1-21

Goding, J. W. (1987): Monoclonal antibodies: Principles and practice. 2nd ed. Acade-mic Press London

Graves, J. E., Somero, G. N. (1982): Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of eastern Pacific barracudas from diffenrent thermal environments. *Evolution* **36**, 97-106

Greenblatt, G. A. (1973): *Physiol. Plant* **29**, 361

Guderley, H. (1990): Functional significance of metabolic responses to thermal accli-mation in fish muscle. *American Journal of Physiology.* **259**, R245-252

Guderley, H. (1998): Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In: Cold Ocean Physiologie (Pörtner, H. O. and Playle, R. C., Eds. Society for Experimental Biology Seminar Series **66**, 58-87

Hamner, W. M., Hamner, P. P. Strand, S. W. and Gilmer, R. W. (1983): Behavior of antarctic krill *Euphausia superba*: Chemorezeption, feeding, schooling and molting. Science **220**, 433-435

Hardewig, I., Dijk van, P. L. M., Moyes, C. D. Pörtner, H. O. (1999): Temperature dependent expression of cytochrome c oxidase in temperate and Antarctic fish. American Journal of Physiology. **277**, R508-516

Hardewig, I., Dijk van, P. L. M., Leary, S. C. and Moyes, C. D. (2000): Temporal changes in enzyme activity and mRNA levels during thermal challenge in white sucker. Journal of Fish Biology. **56**, 196-207

Harlow, E. and Lane, D. (1988): Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory 726 pp

Hawkes, R., Niday, R. and Gordon, J. (1982): A dot-immunoblot assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. **119**, 142-147

Herbert, W. J. and Kristensen, F. (1986): Laboratory animal techniques for immunology. In: **Weir, D. M., Herzenberg, L. A., and Blackwell, C. (eds.).** Handbook of Experimental Immunology: Applications of Immunological Methods in Biochemical Sciences. Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 133.1-133.36

Hochachka, P. W., Somero, G. N. (1984): Biochemical Adaptation. Princetown University Press USA, 335-449

Hofman, E. (1979): Enzym und Bioenergetik-Dynam. Biochemie II. Akademie Verlag Berlin

Hofmann, G. E. and Somero, G. N. (1995): Evidence for protein damage at environmental temperatures: Seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussels *Mytilus trossulus*. J. Exp. Biol. **198**, 1509-1518

- Hofmann, G. E. and Somero, G. N. (1996):** Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar. Biol.* **126**, 65-75
- Jangaard, N. O., Unkeless, J. and Atkinson, D. E. (1968):** The inhibition of citrate synthase by adenosine triphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta.* **151**, 225-235
- Jazdzewski, K., Theodorczyk, J., Sicinski, J. and Kontek, B. (1991):** Amphipod crustaceans as an important component of zoobenthos of the shallow Antarctic sublittoral. *Hydrobiologia* **223**, 105-117
- Kenny, G. E. and Dunsmoor, C. L. (1983):** Principles, Problems, and Strategies in the use of antigenic mixtures for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 655-665
- Kleinig, H., Sitte, P. (1999):** Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag 4. Auflage 543pp.
- Koziol, C., Batel, R., Arinc, E., Schröder, H. C. and Müller, W. E. G. (1997):** Expression of the potential biomarker heat shock protein 70 and its regulator, the metazoan DnaJ homolog, by temperature stress in the sponge *Geodia cydonium*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **154**, 261-268
- Krebs, H. A. (1970):** The history of the tricarboxylic acid cycle. *Persp. Biol. Med.* **14**, 154-170
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage *T₄*. *Nature (London)* **227**, 680-685
- Lass, S., Tarling, G. A., Virtue, P., Matthews, J. B. L., Mayzaud, P. and Buchholz, F. (2001):** On the food of northern krill *Meganyctiphanes norvegica* in relation to its vertical distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **214**, 177-200
- Levitzky, A. and Koshland, D. E. (1976):** The role of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in enzyme regulation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **10**, 1-40
- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z. and Depledge, M. H. (1999):** Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **8**, 351-368

- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934):** The determination of enzyme dissoziation constants. J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658-666
- Lozán, J. L. und Kausch, H. (1998):** Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Parey Buchverlag Berlin. 287 pp.
- Luxmore, R. A. (1981):** The ecology of Antarctic serolid isopods. PhD Thesis Council for National Academic Awards UK
- Luxmore, R. A. (1982a):** Moulting and growth in serolid isopods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **56**, 63-85
- Luxmore, R. A. (1982b):** The reproductive biology of some serolid isopods from the Antarctic. Polar Biol. **1**, 3-11
- Luxmore, R. A. (1984):** A comparison of the respiration rate of some Antarctic isopods with species from lower latitudes. Br. Antarct. Surv. Bull. **62**, 53-65
- Luxmore, R. A. (1985):** Energy Budget of a Population of the Antarctic Isopod *Serolis polita*. Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs (ed. By Seifert, W. R., Condry, P. R. and Laws, R. M.) Springer Verlag Berlin Heidelberg, 389-396
- Mauchline, J. (1960):** The biology of the euphausiid crustacean, *Meganyctiphanes norvegica* Sars. Proc. R. Soc. Edin. **B 67**, 141-179
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913):** Die Kinetik der Invertasewirkung. Biochemische Zeitschrift **49**, 333-369
- Minami, Y., Hohfeld, J., Ohtsuka, K. and Hartl, F. U. (1996):** Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog HSP 70. Journal of Biological Chemistry **271**, 19617-19624
- Mizzen, L. A. and Welch, W. J. (1988):** Charakterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. J. Cell. Biol. **106**, 1105-1116

Moeremans, M., Daneels G., Van Dijck, A., Langanger, G. and De Mey, J. (1984): Sensitive Visualization of Antigen-Antibody Reactions in Dot and Blot Immune Assays with Immunogold and Immunogold/Silver Staining. *Journal of Immunological Methods* **74**, 353

Müller, R. M. L. (1993): Herstellung Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Kernmatrixproteine mittels Hybridomafusion und zweidimensionaler Gelelektrophorese. Diplomarbeit aus dem Institut für Genetik des Fachbereiches Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Neville, D. M. Jr. (1971): Molecular weight determination of Protein-Dodecyl Sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 6328-6334

Newell, R. C. and Branch, G. M. (1980): The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. *Adv. Mar. Biol.* **17**, 329-396

Ornstein, L. (1964): Disc-Electrophoresis-I. Background and theory. *Anal. NY. Acad. Sci.* **121**, 321-349

Patriarca, E. J. and Maresca, B. (1990): Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents unpairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *S. cerevisiae*. *Exp. Cell Research.* **190**, 57-64

Penzlin, H. (1996): Lehrbuch der Tierphysiologie. 646 pp. 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag

Peters, G.; Saborowski, R.; Buchholz, F.; Mentlein, R. (1999): Two distinct forms of chitin-degrading enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase in the Antarctic krill: specialists in digestion and moult. *Mar. Biol.* **134**, 697-703

Peters, J. H. und Baumgarten, H. (1992): Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. Springer Verlag Heidelberg. 2. Auflage 484 pp.

Pfanner, N. and Neupert, W. (1990): The mitochondrial protein apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 331-335

- Pires, -A. M. S. (1992):** Structure and dynamics of benthic megafauna on the continental shelf offshore of Ubatuba, southeastern Brazil. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86 (no.1)**, 63-67
- Polla, B. S., Kantengwa, S., Francois, D., Salviola, S., Franceschi, C. Marsac, C. and Cossarizza, A. (1996):** Mitochondria are selective Targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **93**, 6458-6463
- Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P. and Laskowski, R. (1997):** Heat shock proteins (HSP 70) as Biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology and environmental safety.* **38**, 244-251
- Quetin, L. B. and Ross, R. M. (1991):** Behavioral and physiological characteristics of Antarctic krill *Euphausia superba*. *Amer. Zool.* **31**, 49-63
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E. A. and Pfanner, N. (1994):** Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *Journal of Cell. Biol.* **127**, 1547-1556
- Richardson, K. and Heilmann, J. P. (1995):** Primary production in the Kattegat: Past and present. *Ophelia* **41**, 317-328
- Richter, C., Gogvadze, V. Laffranchi, R., Schlapbach, R. Schweizer, M., Suter, M., Walter, P. and Yaffee, M. (1995):** Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1271**, 67-74
- Saborowski, R. and Buchholz, F. (2002):** Metabolic properties of Northern krill *Meganyctiphanes norvegica* from different climatic zones: II. Enzyme characteristics and activities. *Mar. Biol.* **140**, 557-565
- Salomon, M. and Buchholz, F. (2000):** Effects of temperature on the respiration rates and the kinetics of citrate synthase in two species of *Idotea* (Isopoda, Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* **125 B**, 71-81
- Sanders, B. M. (1988):** The role of stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar Environ. Res.* **24**, 207-210

Sanders, B. M. (1990): Stress Proteins: Potential as multitiered Biomarkers. In: Biomarkers of Environmental Contamination (McCarthy, J. F. and Shingart, L. P. Eds.) pp165-191. Lewis, Chelsea, MI.

Sanders, B. M., Martin, L. S., Nelson, W. G., Phelps, D. K. and Welch, W. (1991): Relationship between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. Mar. Environ. Res. **31**, 81-97

Sanders, B. M. (1993): Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. Critical Reviews in Toxicology **23** (1), 49-75

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987): Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of proteins in the Range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. **166**, 368-379

Schlesinger, M. J. (1990): Heat shock proteins. J. Biol. Chem. **265**, 12111-12114

Seedorf, U. Leberer, E. Kirschbaum, B. J. and Pette, D. (1986): Neural control of gene expression in skeletal muscle: effects of chronic stimulation on lactatdehydrogenase isoenzymes and citrate synthase. Biochemical Journal. **239**, 115-120

Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L. (1996): Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. Experientia. **77** (Suppl.), 57-78

Shinde, U. and Inouye, M. (2000): Intramolecular Chaperones: Polypeptide extensions that modulate protein folding. Cell & Developmental Biology **11**, 35-44

Singh, M., Brooks, G. C. and Srere, P. A. (1970): Subunit structure and chemical characteristics of pig heart Citrate Synthase. J. Biol. Chem. **245**, 4636-4640

Sokolova, I. M. and Pörtner H. O. (2001): Temperature effects on key metabolic enzymes in *Littorina saxatilis* and *L. obtusata* from different latitudes and shore levels. Mar. Biol. **139**, 113-126

Somero, G. N. (1995): Proteins and temperature. Annual Reviews of Physiology. **57**, 43-68

- Somero, G. N. (1997):** Temperature relationships: From molecules to biogeography. In Handbook of Physiology Section 13. Comparative Physiology II (Dautzler, W. H. ed), pp 1391-1444. Oxford: Oxford University Press
- Somero, G. N. (1998):** Adaptation to Cold and Depth: contrasts between polar and deep-sea animals. In Pörtner, H. O. and Playle, R. C. (eds) Cold Ocean Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 33-57
- Sournia, A., Brylinski, J. M., Dallot, S., Le Corre, P., Leveau, M., Prieur, L., Froget, C. (1990):** Fronts hydrologiques au large des côtes françaises: les sites-ateliers du programme frontal. Oceanol. Acta **13**, 413-438
- Srere, P. A. (1972):** The Citrat Enzymes: Their structures, Mechanisms, and biological functions. Curr. Top. Cell. Regul. **5**, 229-283
- Stitt, M. (1984):** Citrate Synthase (Condensing enzyme). In: **Bergmeyer, H. U. (ed.)**. Methods of Enzymatic Analysis **4**, 353-358
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proc Natl Acad Sci USA **76**, 4350-4354
- Towbin, H., Gordon, J. (1984):** Immunoblotting and Dot immunobinding-Current status and outlook. Journal of Immunological Methods **72**, 313-340
- Ujwal, S. and Masayori, I. (2000):** Intramolecular Chaperones: Polypeptide extensions that modulate protein folding. Cell & Developmental Biology. **11**, 35-44
- Vetter, R. A. H. (1992):** Mechanismen Biochemischer Temperaturanpassung: Ein Vergleich der Enzymeigenschaften bei Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 94 pp.
- Vetter, R. A. H. (1995a):** Ecophysiological studies on citrate synthase: (I) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. J. Comp. Physiol. **165 B**, 46-55
- Vetter, R. A. H. (1995b):** Ecophysiological studies on citrate synthase: (II) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to lifestyle and climatic zone. J. Comp. Physiol. **165 B**, 56-61

Vetter, R. A. H. and Buchholz, F. (1998): Kinetics of enzymes in cold-stenothermal invertebrates. In: Cold Ocean Physiology SEB Seminar Ser. **Edited by Pörtner H. O. and Playle, R.** Cambridge University Press Cambridge UK. 190-211 pp

Weitzman, P. D. J. and Danson, M. J. (1976): Citrate Synthase. Curr. Top. Cell. Regul. **10**, 161-204

Wilkinson, G. N. (1961): Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochemical Journal **80**, 324-332

Wilson, C. M. (1979): Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. **96**, 263-278

Wiskich, J. T. (1980): Control of the krebs cycle. In **Davis, D. D.: (ed.)** The biochemistry of plants, metabolism and respiration. Academic Press, New York. **Vol.2**, 243-278

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. and Hancock, R. (1981): Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. **118**, 197-203

Wu, J.-Y. and Yang, J., T. (1970): Physicochemical Characterization of Citrate Synthase and its Subunits. J. Biol. Chem. **245**, 212-218

Wu, J.-Y. and Yang, J., T. (1971): Effects of salt and organic solvents on the activity of Citrate Synthase. J. Biol. Chem. **245**, 3561-3564

Zane, L., Ostellari, L. Maccatrozzo, L. Bargelloni, L., Cuzin.Roudy, J. Buchholz, F. and Patarnello, T. (2000): Genetic differnces in a pelagic crustacean (*M. norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. Mar. Biol. **136**, 191-199

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Buchholz bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit. Dadurch hatte ich die Möglichkeit, innerhalb eines von der DFG geförderten Antarktisprojektes sowie eines Austausches von Wissenschaftlern zwischen den Außenministerien Brasiliens und Deutschland mitzuarbeiten und umfangreiche Erfahrungen zu sammeln. Auch möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Dr. Dietrich Siebers danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Biologischen Anstalt Helgoland, dem IOUSP (Instituto Oceanográfico da Universidade São Paulo) und der Meeresstation des IOUSP in Ubatuba (Brasilien) für jegliche Art der Hilfestellung und stets konstruktive Zusammenarbeit. Hervorzuheben sind hier Prof. Dr. Phan vna Ngan und Vicente Gomes.

Muito obrigado para tudo ZéZé, Marçia, Christina, Casiuda, Ricardo.

Nicht zu vergessen sind die Besatzungen der Forschungsschiffe „FS Heincke“, „FS Poseidon“ und „FK Veliger“, die mir bei den Probennahmen stets eine große Hilfe waren.

Eine kleine Frau darf ich hier nicht vergessen, denn sie gab mir, trotz ihrer erst wenigen Jahre auf dieser Welt, die Kraft weiterzumachen auch als es wirklich nicht mehr ging. Schön daß es Dich gibt, kleine Maus.

Wissenschaftlicher Werdegang

Name: Reinhold Müller
Geburtsjahr: 1965
Geburtsort: Darmstadt
Schulbesuch: 1971-1975 Mittelpunktschule, Nieder-Ramstadt
1975-1984 Gymnasium der Georg-Büchner Schule, Darmstadt
Universitätsbesuch: 1984-1993, Justus-Liebig Universität Gießen
Vordiplom: Mai 1988; **Diplom:** Juni 1993: Thema: Herstellung und Aufreinigung monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Kernmatrixproteine.
Seit 15.07.1993 Doktorand bei Prof. Dr. F. Buchholz an der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) auf Helgoland
Thema der Arbeit:
Mechanismen der qualitativen und quantitativen Enzymregulation am Beispiel der Citratsynthase
Juli 93-Juli 95 DFG-Projekt Antarktis
Juli 93 Forschungsfahrt FS „Heincke“ Kattegat, Skagerak
Oktober 93-Dezember 93, Forschungsaufenthalt IOUSP (São Paulo / Ubatuba) Brasilien.
Mai-Juni 94 Forschungsfahrt Mittelmeer mit FS „Poseidon“, Überführung von Istanbul (Fahrtleiter) nach Nizza, dann wissenschaftliche Untersuchungen an Bord vor Korsika.
August 95–Oktober 96 Stipendiat der BAH.
Oktober 96-Oktober 97 Mitarbeit am Projekt KUSTOS
Oktober 97-Dezember 97 Forschungsaufenthalt IOUSP (São Paulo/ Ubatuba) Brasilien.
Januar 98-März 99 Aufarbeitung der Proben aus Brasilien
April 99-Dezember 02 Eigene Finanzierung und Fertigstellung der Doktorarbeit