

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 sinngemäße 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 müßten. 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 Expressierung 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 Temperaturstress 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-Expressierung 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.

Abstract

The main issue of the present thesis was the investigation of temperature adaptation on a enzymatic basis. Therefore crustaceans of different climatic regions (polar, moderate, tropic) and with different living styles (benthic, benthopelagic and pelagic) have been intra- and interspecific compared.

For the enzymatic comparison the metabolic key enzyme Citrate Synthase (CS, EC 4.1.3.7) the mediator between glycolysis and krebs cycle has been characterized.

Characterization of the CS was investigated by checking out the K_M and V_{Max} values by Michaelis Menten equation. E_A was performed by temperature optimum curves, Arrhenius equation and gas constant. K_i for measurement of the competitive ATP-inhibition of CS by negative feedback was performed by giving of increasing ATP amounts to the CS determination assay and iteration after (Dixon 1953; Cornish-Bowden 1979).

For the first time it was possible to do an quantitative estimation of the CS-amounts involved in temperature adaptation.

Following crustacean have been investigated:

Benthic: *Serolis polita* (Isopoda) from Antarctica; *Xiphopenaeus kroyeri* (Dendrobranchiata) from South Eastern Brazil.

Benthopelagic: *Idotea baltica* (Isopoda) from North Sea *Cheirimedon femoratus* (Amphipoda) and *Djerboa furcipes* (Amphipoda) both from Antarctica.

Pelagic: *Euphausia superba* (Euphausiacea) from Antarctica *Meganytiphanes norvegica* (Euphausiacea) from the Baltic Sea (Kattegat) and the Mediterranean Sea.

For all investigations CS has been purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (anion exchange and gel filtration columns).

In a first step the qualitative determinations were performed as described above.

For quantitation an polyclonal Antibody (pAk) against the purified CS was produced. Afterwards an Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) was standardized and established for the quantitative determination of the CS.

In a last step the comparison of HSP 70 expression and V_{Max} was established by immunoblotting to find out the influence of HSP 70 on CS-regulation under temperature stress.

The qualitative parameters showed a deregulated enzyme for benthic crustaceans (high K_i -values) and well regulated CS for benthopelagic and pelagic crustaceans (low K_i -values). For cold adapted crustaceans a significant lower activation energy seems to be essential.

Quantitative results showed a clear dependence in living style. The more active the crustaceans are the more CS was detected. The pelagic ones have until 40 fold more CS than the benthic ones. And the pelagic crustaceans show also significant differences in the CS-amount at their different climatic living zones. *Meganytiphanes norvegica* from the Baltic Sea (Kattegat) has 1.5 fold more CS than the same species from the Mediterranean Sea. *Euphausia superba* has than 5 fold more CS than *Meganytiphanes norvegica* from the Baltic Sea (Kattegat).

The results of the HSP 70 experiments showed that there could be an influence of HSP 70 on V_{Max} of CS. At the levels of the highest HSP 70 expressions there is no more significant change in V_{Max} during temperature experiments. That means HSP 70 has a possible performance stabilizing influence on CS.

So at least temperature adaptation is a complex process of kinetic parameters, enzyme quantity and protection functions of HSPs.

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

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