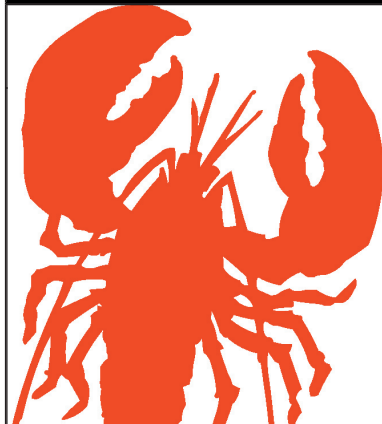
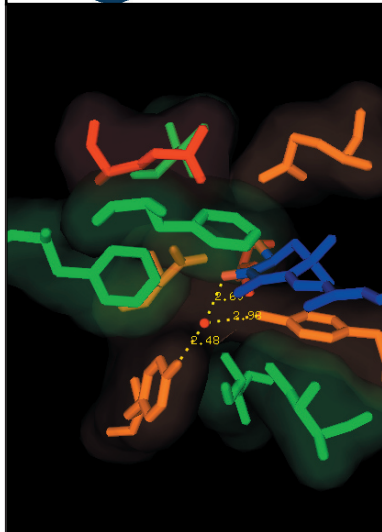
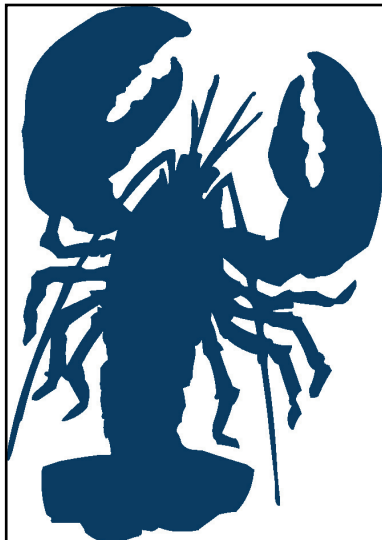


# Carotinoide und Carotinoproteine in Krustentieren



Philipp Börsch-Supan  
Jahresarbeit

Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium  
Landwehrstraße 22  
67433 Neustadt/Wstr.

Schuljahr 2004/05

Jahresarbeit

# **Carotinoide und Carotinoproteine in Krustentieren**

**Eine Diskussion der Literatur und experimentelle Ansätze zu artenvergleichenden  
Untersuchungen**

Philipp Börsch-Supan

Lk Chemie 13

21. Oktober 2004

Betreut von Heike Nickel

## Kurzfassung

Krebse sind – das weiß doch jeder – krebsrot. Was nicht jeder weiß, ist, dass Krustentiere oft erst in der Siedehitze des Kochtopfes erröten. Lebende Krustentiere dagegen gibt es in zahlreichen farblichen Variationen, die von schwarz und braun über orange bis grün, lila und blau reichen. Manche Arten sind sogar mehrfarbig gemustert. Und trotzdem bekommen sie fast alle im Kochtopf die krebsrote Färbung.

Für die rote Farbe ist hauptsächlich der Farbstoff Astaxanthin verantwortlich, für die blaue Farbe – wie wir heute wissen – ebenfalls. Wie genau es aber zu diesem Farbumschlag während des Erhitzens kommen kann, blieb für mehr als 120 Jahre ein ungelöstes Problem.

Meine Arbeit beschäftigt sich mit den Carotinoiden und Carotinoproteinen in verschiedenen Krustentierspezies. Der erste Teil dieser Arbeit ist theoretischer und reproduktiver Natur. Erster Schwerpunkt ist eine Aufarbeitung der Erforschungsgeschichte des Crustacyanins unter dem Gesichtspunkt der wissenschaftsgeschichtlichen Entwicklung. Zweiter Schwerpunkt ist eine phänomenologische Aufarbeitung der Carotinoproteine in Krustentieren, wobei besonders detailliert auf die bathochrome Verschiebung von Astaxanthin im Hummer- $\beta$ -Crustacyanin eingegangen wird.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich experimentellen Ansätzen zu Untersuchungen an Hummer-Crustacyanin-Homologen, Proteinen anderer Krustentierspezies. Ziel ist es, wenig oder gar nicht erforschte Chromoproteine aus den Panzern anderer Krustentiere zu isolieren, um sie mit dem gut erforschten Hummer-Crustacyanin zu vergleichen.

Die praktische Arbeit umfasst eine adaptierte Isolierungsprozedur für Carotinoproteine aus dem europäischen Hummer (*Homarus gammarus*), der Riesengarnele und der atlantischen Seespinne (*Hyas araneus*). Die entstandenen Rohextrakte wurden elektrophoretisch untersucht und auf ihr thermochromes Verhalten hin getestet.

Parallel dazu habe ich versucht, eine HPLC-Methode zur Auftrennung von Carotinoiden für eine von mir instand gesetzte HPLC-Anlage zu adaptieren.

Mir ist es gelungen, Crustacyanin aus Hummerschalen zu isolieren und über sein Absorptionsspektrum und seine Molmasse zu identifizieren, sowie sein thermochromes Verhalten zu zeigen.

Ein Crustacyanin-ähnliches Protein konnte aus den Schalen der Riesengarnele gewonnen werden, sein Absorptionsmaximum liegt bei 590 nm, die Molekulargewichtsbestimmung zeigte Banden in den Größenordnungen von 20 und 35 kDa. Vorproben zeigten ein thermochromes Verhalten, ähnlich dem von Hummer-Crustacyanin.

Im ersten Anlauf konnten keine nachweisbaren Mengen eines intakten Pigmentproteins aus der Seespinne *Hyas araneus* isoliert werden. Der Rohextrakt bestand allerdings aus einer Vielzahl von Komponenten, deren Identität noch zu klären ist.

Aus den Schalen des Taschenkrebsses *Cancer pagurus* konnte ein Mehrkomponenten-Carotinoidgemisch isoliert werden, das bei 473 nm ein Absorptionsmaximum zeigt.

Die experimentellen Arbeiten sollen in einer Projektarbeit für den Wettbewerb „Jugend forscht“ 2005 fortgeführt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>i</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Darstellung des Arbeitsprozesses</b>	<b>3</b>
2.1. Themenfindung . . . . .	3
2.2. Literaturrecherche . . . . .	3
2.3. Vorbereitung der praktischen Arbeit . . . . .	3
2.4. Instandsetzung der HPLC-Anlage . . . . .	4
2.5. HPLC-Vorversuche . . . . .	4
2.6. Deutsche Schüler Akademie . . . . .	5
2.7. Praktikum am explO . . . . .	5
2.8. Niederschrift . . . . .	5
<b>I. Literaturarbeit</b>	<b>6</b>
<b>3. Historischer Hintergrund</b>	<b>7</b>
3.1. Die Anfänge . . . . .	7
3.2. Von der Isolierung zur Sequenz . . . . .	8
3.3. NMR . . . . .	9
3.4. . . . und Röntgenstrukturanalyse . . . . .	9
3.5. Aktuelle Forschung . . . . .	10
<b>4. Zoologischer und biochemischer Hintergrund</b>	<b>11</b>
4.1. Krustentierspezies . . . . .	11
4.1.1. Der Taschenkrebs . . . . .	11
4.1.2. Der Hummer . . . . .	11
4.1.3. Die Seespinne . . . . .	11
4.1.4. Die Riesengarnele . . . . .	11
4.2. Aufbau und Struktur von Proteinen . . . . .	11
4.2.1. Aminosäuren . . . . .	13
4.2.2. Primärstruktur . . . . .	13
4.2.3. Sekundärstruktur . . . . .	13
4.2.4. Quartärstruktur . . . . .	14
4.3. Proteinfamilien . . . . .	14
4.4. Carotinoide . . . . .	15
4.4.1. allgemeine Informationen . . . . .	15
4.4.2. Nomenklatur . . . . .	15
4.4.3. Die elektronische Struktur . . . . .	16

---

4.4.4. Chiralität bei Carotinoiden . . . . .	16
<b>5. Methodischer und theoretischer Hintergrund</b>	<b>17</b>
5.1. Bioinformatische Methoden . . . . .	17
5.1.1. Vergleich von Proteinsequenzen . . . . .	17
5.1.2. Vergleich von Proteinstrukturen . . . . .	17
5.2. Elektrophorese . . . . .	17
5.2.1. Grundlagen . . . . .	17
5.2.2. SDS-PAGE . . . . .	18
5.2.3. Die Elektrophorese-Apparatur . . . . .	19
5.3. Chromatographie . . . . .	19
5.3.1. Grundlagen . . . . .	19
5.3.2. Adsorptions-Chromatographie . . . . .	19
5.3.3. HPLC . . . . .	20
5.3.4. Die HPLC-Apparatur . . . . .	20
5.4. UV-VIS-Spektroskopie . . . . .	20
5.4.1. Grundlagen . . . . .	20
5.4.2. Probenvorbereitung und Aufnahme der Spektren . . . . .	21
5.4.3. Das Spektralphotometer . . . . .	21
5.4.4. Chiroptische Methoden . . . . .	21
<b>6. Carotinoproteine</b>	<b>22</b>
6.1. Allgemeines . . . . .	22
6.1.1. Typ A: Crustacyanin . . . . .	22
6.1.2. Typ B: Ovoverdin . . . . .	23
6.2. Die bathochrome Verschiebung . . . . .	23
6.2.1. Topologie von beta-Crustacyanin . . . . .	24
6.2.2. Die Bindung der Astaxanthin-Liganden . . . . .	26
6.2.3. Erklärung der bathochromen Verschiebung . . . . .	28
<b>II. Ansätze zu artenvergleichenden Untersuchungen</b>	<b>31</b>
<b>7. Material</b>	<b>32</b>
7.1. Biologisches Material . . . . .	32
7.2. Reagenzien . . . . .	32
7.3. Puffer . . . . .	32
7.4. Elektrophoresekammer . . . . .	32
7.5. pH-Meter . . . . .	32
7.6. HPLC-Apparatur . . . . .	32
7.6.1. HPLC-System . . . . .	32
7.6.2. Datenerfassung . . . . .	32
7.6.3. Säulenmaterial . . . . .	32
7.7. Zentrifuge . . . . .	33
7.8. Photometer . . . . .	33

---

<b>8. Methoden</b>	<b>34</b>
8.1. Präparation der Krustentiere . . . . .	34
8.1.1. Präparation der Riesengarnelen . . . . .	34
8.1.2. Präparation der Hummerschalen . . . . .	34
8.1.3. Präparation der Krebse . . . . .	34
8.2. Extraktion von Crustacyanin aus Schalenmaterial . . . . .	34
8.2.1. Extraktion aus Garnelenschalen . . . . .	34
8.2.2. Extraktion aus Hummerschalen . . . . .	35
8.2.3. Extraktion aus Krebsschalen . . . . .	35
8.3. Vorprobe auf Thermochromie . . . . .	35
8.4. Gelelektrophorese . . . . .	35
8.4.1. Rohextrakte . . . . .	35
8.5. UV-VIS-Spektroskopische Untersuchungen . . . . .	36
8.5.1. Thermochromie . . . . .	36
8.6. Extraktion von Carotinoiden aus Schalenmaterial . . . . .	36
8.7. HPLC-Vorversuche . . . . .	36
8.7.1. NP-Methode . . . . .	36
8.7.2. RP-Methode . . . . .	37
<b>9. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>38</b>
9.1. Proteinisolierung . . . . .	38
9.1.1. Riesengarnele . . . . .	38
9.1.2. Hummerschalen . . . . .	38
9.1.3. Krebsschalen . . . . .	38
9.2. Vorproben auf Carotinoproteine . . . . .	38
9.2.1. Riesengarnele . . . . .	38
9.2.2. Hummerprotein . . . . .	38
9.2.3. Seespinne . . . . .	38
9.3. SDS-PAGE . . . . .	38
9.3.1. Rohextrakte . . . . .	38
9.4. UV-VIS-Spektren . . . . .	40
9.5. Thermochromie . . . . .	40
9.6. HPLC-Vorversuche . . . . .	40
9.6.1. Detektortest . . . . .	40
9.6.2. Reproduzierbarkeit . . . . .	40
9.6.3. Trennversuch . . . . .	40
<b>10. Fazit und Ausblick</b>	<b>44</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>45</b>
<b>III. Verzeichnisse und Anhänge</b>	<b>46</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>51</b>

---

<b>A. Liste der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>52</b>
<b>B. Liste der proteinogenen Aminosäuren</b>	<b>53</b>
<b>C. Liste verwendeter Puffer und Reagenzien</b>	<b>57</b>
C.1. Borat-TRIS-Puffer, pH 6,8 (BT-Puffer) . . . . .	57
C.2. EDTA-Puffer, pH 7,5 . . . . .	57
C.3. Phosphatpuffer . . . . .	57
C.4. SDS-PAGE-Elektrodenpuffer nach LAEMMLI . . . . .	57
C.5. SDS-PAGE-Probenpuffer nach LAEMMLI . . . . .	57
C.6. Karottenextrakt . . . . .	57
<b>D. Erklärung</b>	<b>58</b>

# 1. Einleitung

Krebse sind – das weiß doch jeder – krebssrot. Was nicht jeder weiß, ist, dass Krustentiere oft erst in der Siedehitze des Kochtopfes erröten. Lebende Krustentiere dagegen gibt es in zahlreichen farblichen Variationen, die von schwarz und braun über orange bis grün, lila und blau reichen. Manche Arten sind sogar mehrfarbig gemustert. Und trotzdem bekommen sie fast alle im Kochtopf eine krebssrote Färbung.

Für die rote Farbe ist hauptsächlich ein Farbstoff verantwortlich, das Hydroxy-Keto-Carotinoid Astaxanthin. Gleichzeitig ist das Astaxanthin – wie wir heute wissen – auch für fast alle anderen farblichen Schattierungen, sogar für das tiefe Blau, verantwortlich. Wie genau es aber zu diesem Farbumschlag während des Erhitzens kommen kann, blieb für mehr als 100 Jahre ein ungelöstes Problem. Schon 1882 stellte der deutsche Wissenschaftler Krukenberg erste Untersuchungen über das Wesen des blauen Schalenfarbstoffes an. Bis zur vollständigen Entschlüsselung der chemischen Struktur des blauen Pigments sollte es noch ganze 120 Jahre dauern. Die Entdeckung von Astaxanthin und die Erforschung der blauen Pigmente, die wir heute Crustacyanine nennen, ging dabei Hand in Hand mit der Entwicklung der modernen analytischen Chemie und Biochemie. Fast jede neue analytische Methode, angefangen von der Chromatographie über zahlreiche Errungenschaften im Bereich der Spektroskopie, der Elektrophorese und Proteinanalytik bis hin zur Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung und zu computerchemischen Methoden halfen mehreren Generationen von Wissenschaftlern, sich jeweils einen weiteren Schritt der Lösung zu nähern.

Heute wissen wir, was zum Erröten der Krebse führt und die Erkenntnisse, die man auf dem Weg zur Lösung gewonnen hat, lieferten nicht nur ein tieferes Verständnis über diesen physiologischen Vorgang. Sie eröffnen auch neue Perspektiven in der Pharmazie, z.B. im Drug Design oder in der Lebensmitteltechnologie.

Auch andere Carotinoproteine haben eine große physiologische Bedeutung. So beruht zum Beispiel unsere Fähigkeit zu Sehen auf der Verbindung eines Proteins mit einem Carotinderivat.

Wie kommt es aber nun zum Farbumschlag? Astaxanthin ist ein fettlösliches Pigment und lässt sich daher nicht ohne weiteres durch den Organismus transportieren. Um das Pigment trotzdem im wässrigen Milieu transportieren zu können, wird es im Körper von Krustentieren zum Teil von einer Proteinhülle umgeben. Die Assoziation von Astaxanthin und Protein führt aber zu einem Komplex mit veränderter Farbe, denn das Farbstoffmolekül wird im Protein ein wenig gestaucht und von den Bindungsstellen des Proteins in seiner elektronischen Struktur verändert. Die Folge ist weithin sichtbar: Das einst krebssrote Astaxanthin erscheint im Proteinmantel tiefblau.

Fasziniert von diesem biochemischen Phänomen habe ich beschlossen, mich tiefer in diese Materie einzuarbeiten, einerseits um das Phänomen im Detail zu verstehen, andererseits um die gewonnene Erkenntnis auch im Labor anzuwenden.

Meine Arbeit beschäftigt sich mit den Carotinoiden und Carotinoproteinen in verschiedenen Krustentierspezies. Der erste Teil dieser Arbeit ist theoretischer und reproduktiver Natur. Erster Schwerpunkt



(Kapitel 3) ist eine Aufarbeitung der Erforschungsgeschichte des Crustacyanins unter dem Gesichtspunkt der wissenschaftsgeschichtlichen Entwicklung. Als Grundlage dient die wissenschaftlichen Literatur von Mitte des 19. Jahrhunderts bis zu aktuellen Veröffentlichungen. Danach werden in Kapitel 4 die zum Verständnis des Färbungsmechanismus notwendigen biochemischen Grundlagen beschrieben. Im folgenden Kapitel werden methodische Grundlagen erarbeitet, die die Basis für den zweiten Teil, die praktische Arbeit, bilden. Der erste Teil schließt mit einem zweiten inhaltlichen Schwerpunkt in Kapitel 6: einer phänomologischen Aufarbeitung der Carotinoproteine in Krustentieren, wobei in Abschnitt 6.2 besonders detailliert auf die bathochrome Verschiebung von Astaxanthin im Hummer- $\beta$ -Crustacyanin eingegangen wird, da dieses Protein das weitestgehend erforschte Panzerpigmentprotein ist. Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich Ansätzen zu Untersuchungen an Hummer-Crustacyanin-Homologen Proteinen anderer Krustentierspezies. Ziel ist es, wenig oder gar nicht erforschte Chromoproteine aus den Panzern anderer Krustentiere zu isolieren, um sie mit dem gut erforschten Hummer-Crustacyanin zu vergleichen.

Wie der Titel schon andeutet, ist meine experimentelle Arbeit zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen, da Aufwand und Komplexität der notwendigen Arbeitsschritte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt haben. Dennoch möchte ich an dieser Stelle die bisher geleistete Arbeit, vornehmlich Methodenentwicklung und -adaption, festhalten. Die praktische Arbeit umfasst eine adaptierte Isolierungsprozedur für Carotinoproteine aus dem europäischen Hummer (*Homarus gammarus*), der Riesengarnele und der atlantischen Seespinne (*Hyas araneus*) (Abschnitte 8.1 und 8.2). Die entstandenen Rohextrakte wurden elektrophoretisch untersucht (Abschnitt 9.3) und das Rohprotein aus *H. gammarus* wurde auf sein thermochromes Verhalten hin getestet (Abschnitt 9.5).

Parallel dazu habe ich versucht, eine HPLC-Methode zur Auftrennung von Carotinoiden für eine von mir instand gesetzte HPLC-Anlage zu adaptieren. Die Methoden und Ergebnisse dieser Experimente sind ebenfalls im dritten Teil zu finden. Im abschließenden Kapitel 10 wird ein Fazit gezogen und ein Ausblick auf die geplanten weiteren experimentellen Arbeiten geworfen, die ich im Rahmen einer Jugend forscht Arbeit fortführen werde.

## 2. Darstellung des Arbeitsprozesses

### 2.1. Themenfindung

Das Thema der vorliegenden Arbeit hat sich im Laufe des Jahres 2003 aus meiner damaligen Jugend forscht Arbeit über Biopolymere aus Krustentierschalen [8] entwickelt. Dadurch für Krustentiere sensibilisiert hatte ich im Herbst 2002 in der Tageszeitung *Rheinpfalz* und der populärwissenschaftlichen Zeitschrift *Protein Spotlight* [32] kurze Artikel über das Hummerprotein Crustacyanin gefunden. Beide Artikel gingen auf eine Originalpublikation in der Fachzeitschrift PNAS zurück, in der eine britische Forschergruppe ihren Erfolg bei der Strukturaufklärung des besagten Proteins beschrieben hatte. [21] Als ich mir nach dem Ende des Bundeswettbewerb-Gedanken über eine neue Fragestellung machte, griff ich die Crustacyanin-Thematik aus mehreren Gründen wieder auf. Einerseits hatte ich die Krustentiere als Studienobjekte gewissermaßen „lieb gewonnen“, andererseits fand ich bei der tieferen Beschäftigung mit der Literatur zu Crustacyanin eine ungeheure thematische und methodische Vielfalt vor. Die Methoden, die im Laufe von mehreren Jahrzehnten zur Strukturaufklärung dieses Proteins angewandt wurden, reichen von der klassischen organischen Chemie über Biochemie und Molekularbiologie bis hin zu physikalischen Methoden der Spektroskopie und theoretischen Berechnungen in der Computerchemie. Die Möglichkeit, derartig viele chemische Aspekte in einer Fragestellung unterbringen zu können, hielt ich für äußerst faszinierend. Auch das später erwachte Interesse für Molecular Modelling und Bioinformatik lässt sich hervorragend in das Thema Carotinoproteine integrieren.

### 2.2. Literaturrecherche

Schon während der Themensuche hatte ich – ausgehend vom PNAS-Artikel [21] – einige Publikationen zu Crustacyanin und Carotinoiden im Allgemeinen gesammelt. Ab dem Spätsommer 2003 habe ich systematisch Informationen zu beiden Themengebieten gesucht, um mir einige theoretische Grundlagen anzueignen. Bei der Informationssuche habe ich zwei Strategien verfolgt: Einerseits habe ich mich von Publikation zu Publikation „gehangelt“, in dem ich die Bibliographien der einzelnen Publikationen abgearbeitet habe, parallel dazu habe ich Stichwortsuchen in zwei großen bibliographischen Datenbanken (SciFinder<sup>1</sup> und Zoological Record<sup>2</sup>) und dem Internet durchgeführt, um auch die aktuelle Literatur zu berücksichtigen. Auf diesem Wege habe ich über 130 Quellen gesammelt und mir eine Literaturdatenbank zusammengestellt.

### 2.3. Vorbereitung der praktischen Arbeit

Mit dem Anwachsen meiner Literatursammlung galt es auch, die praktischen Arbeiten vorzubereiten. Hier stellten sich mir zwei ganz wesentliche Probleme. Ich hatte zwar eine Idee, aber mir fehlten erstens eine ganze Reihe an notwendigen Geräten, Chemikalien und praktischen Kenntnissen, und was noch kritischer war, mir fehlte auch das Probenmaterial, nämlich naturbelassene Krebs- und Hummerschalen.

Deswegen begann ich im Winter 2003 Kontakt zu verschiedenen Unternehmen und Wissenschaftlern aufzunehmen, darun-

<sup>1</sup><http://www.cas.org/SCIFINDER/>

<sup>2</sup><http://www.biosis.org/products/zr/>

ter auch die Autoren des besagten PNAS-Artikels [21]. Die Resonanz auf meine Anfragen war, von einigen Ausnahmen abgesehen, sehr positiv und im Frühjahr 2004 hatte ich neben Geräten und Laborbedarf von SCHOTT, EPPENDORF, BECKMANN, MERCK und der BASF auch einen Sponsor für die Krustentiere gefunden: die BIOLOGISCHE ANSTALT HELGOLAND. Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Suche nach einem Sponsor für Chemikalien, aber nach einer Anzahl von Absagen konnte ich auch hierfür im April die Firma FISHER SCIENTIFIC gewinnen. Aus den Kontakten zu Wissenschaftlern ergaben sich immer wieder neue Ansatzpunkte für meine Arbeit. Insbesondere Professor Zagalsky (Royal Holloway, University of London) gab mir wertvolle Hinweise für die praktischen Arbeiten.

## 2.4. Instandsetzung der HPLC-Anlage

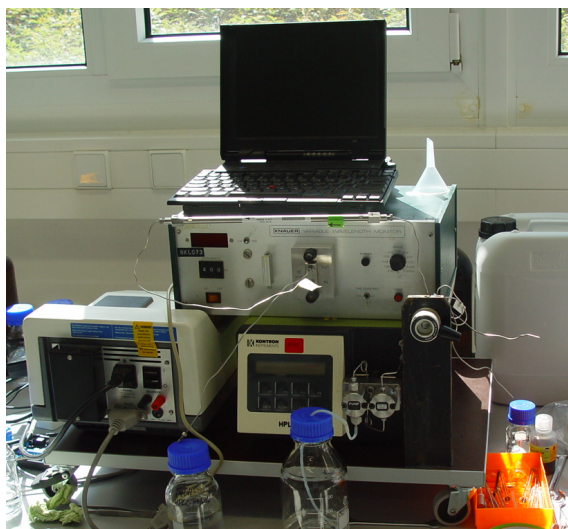


Abb. 2.1.: Die HPLC-Apparatur

Das erste größere praktische Projekt bestand darin, eine funktionierende HPLC-Anlage aus Einzelkomponenten aufzubauen, die dem KRG gespendet worden waren. Nachdem ich zu allen Geräten die technischen Unterlagen organisiert hatte, habe ich damit begonnen,

die einzelnen Komponenten sorgfältig zu reinigen und zu überholen, um sie nach und nach in Betrieb zu nehmen. Glücklicherweise hatten die Geräte keine größeren Schäden. Lediglich das Säulenmaterial erwies sich als unbenutzbar, die Säulen waren durch anscheinend unsachgemäße Lagerung ausgetrocknet. In ersten Trennexperimenten verursachten sie immer wieder Druckschwankungen und lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Als besonders schwierig erwies sich die Erfassung der vom Detektor gelieferten Daten. Um den Umgang mit mechanischen x-y-Schreibern zu vermeiden, hatte ich schon relativ früh beschlossen, eine computergestützte Messwerterfassung zu verwenden. Eine erste Lösung bot ein relativ simples Messinterface aus der Informatik-Sammlung. Zusammen mit einer selbstgeschriebenen Delphi-Software konnte ich auch schon bald erste Chromatogramme aufnehmen. Die Auflösung des Interfaces war mit nur 8 Bit letztlich jedoch zu gering, weswegen ich auf ein neueres 12 Bit-Interface umsteigen musste. Der große Zeitaufwand bei der Organisation von technischen Unterlagen und Ersatzteilen machte eine Verlängerung des Zeitrahmens dieser Arbeit notwendig.

## 2.5. HPLC-Vorversuche

Auch wenn die HPLC-Vorversuche einen bedeutenden Teil des Arbeitszeitraumes einnahmen, haben sie bis jetzt kaum darstellbare Ergebnisse geliefert. Anfangs ging es mir darum, die Funktionsweise der einzelnen Komponenten zu verstehen, um sie zu einem lauffähigen System zusammensetzen zu können. Es verging daher viel Zeit für etliche Testläufe, andauernde Lecksuche und die Abstimmung der Datenerfassung. Gerade der letzte Punkt – darunter fällt unter anderem die Programmierung einer Datenerfassungssoftware – hat mich sehr viel Zeit gekostet, weil die Hardware letztlich den An-

forderungen nicht genügte und ich auf eine kommerzielle Lösung zurückgreifen musste. Als die HPLC-Anlage dann endlich betriebsbereit war, ging es an die Suche nach einer geeigneten Trennmethode. Hierbei musste ich mich auf isokratische Methoden einschränken, da die Verwendung von Eluenten-Gradienten den technischen Aufwand weit über die schulischen Mittel hinaus verkompliziert hätte.

Letztlich habe ich mich für zwei unterschiedliche Methoden entschieden: eine Normalphasen- und eine Umkehrphasen-Methode. Experimentell bin ich hier jedoch bis zum Abgabetermin nicht über eine Methodenadaptation hinaus gekommen.

## 2.6. DeutscheSchülerAkademie

Im Juli 2004 habe ich an einem Structural Genomics Kurs im Rahmen der DeutschenSchülerAkademie Roßleben 2004 teilgenommen. Dort habe ich ein breites Fachwissen in den Bereichen Proteinbiochemie, Biophysik und Bioinformatik erwerben können. Diese Arbeit baut ganz wesentlich auf dem dort gelegten Fundament auf, weswegen die Kursmitschrift [9] und -dokumentation [35] im Quellenverzeichnis erwähnt sind.

## 2.7. Praktikum am expLO

Auch wenn ich erste Vorversuche zu Carotinoproteinen schon zu Hause durchgeführt und dort auch einige Rohextrakte angesetzt hatte, habe ich die wesentliche Arbeit zur Isolierung der Carotinoproteine vom 16. bis zum 24. 08. 2004 im Rahmen einer Jungforscher-Woche des Heidelberger LifeScienceLabs<sup>3</sup> im Schülerlernlabor des expLO<sup>4</sup> Heidelberg durchgeführt, denn dort stand mir die Infrastruktur eines modernen Labors zur Verfügung.

<sup>3</sup><http://life-science-lab.xmachina.de>

<sup>4</sup><http://www.explo-heidelberg.de>

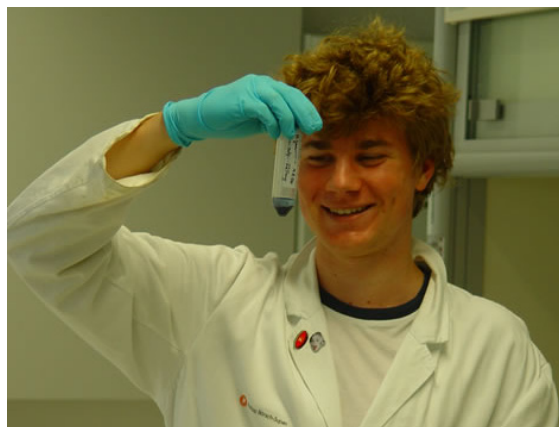


Abb. 2.2.: Forschen am expLO

Der zweite Teil dieser Arbeit gibt im wesentlichen die Ergebnisse dieses Praktikums wieder. Neben der Isolierung von Proteinen aus *Homarus gammarus*, *Hyas araneus* und der Riesengarnele, habe ich dort auch die in Abschnitt 8.7.1 beschriebene Vorbereitung der HPLC-Anlage durchgeführt und mit der Aufreinigung der Proteine begonnen. Hier war es möglich, die Reinheit der Proteinfraktionen und eine grobe Abschätzung des Molekulargewichts habe mittels Gelelektrophorese (siehe 9.3) vorzunehmen und die Untersuchungen zur Thermochromie (Abschnitt 9.5) zu beginnen.

## 2.8. Niederschrift

Ende August habe ich meine experimentellen Arbeiten vorläufig beendet um mich ganz der Niederschrift der Arbeit zu widmen. Die schriftliche Arbeit beruht auf der angegebenen Literatur und meinen Laborprotokollen und wurde mit  $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$  erstellt. (Die Abbildungen wurden, so nicht anderweitig angegeben, von mir erstellt.)

## **Teil I.**

**Diskussion der Literatur, Grundlagenwissen und eine  
Erklärung der bathochromen Verschiebung**

### 3. Historischer Hintergrund

#### 3.1. Die Anfänge

Das unfreiwillige Erröten von Krustentieren beim Kochen ist wohl schon so lange bekannt, wie die Menschen Krustentiere als Nahrungsmittel verwenden. Naturwissenschaftliche Arbeiten über die blauen Pigmente von Wirbellosen findet man ab der Mitte des 19. Jahrhunderts. In seinen *Vergleichend-physiologischen Studien an den Küsten der Adria* (1882) berichtet der deutsche Naturforscher C.F.W. Krukenberg [45] über das ihm unerklärliche Verhalten der blauen und violetten Pigmente von Krebsen, Seesternen und anderen Wirbellosen. Da bei seinen Experimenten stets fettlösliche Farbstoffe – damals als *Lipochrome* bezeichnet – entstanden, nennt er diese Pigmente *Lipochromogene*. Für das Pigment des Flusskrebs, 1851 von Focillon [30] als kristallines Schalenpigment erkannt, schlägt er den Namen *Cyanokrysalin* vor.

Systematische Untersuchungen an den blauen Pigmenten der Hummerschalen wurden 1897 vom schottischen Zoologen M. Newbigin schriftlich festgehalten. [61] Newbigin erkannte schon, dass es einen Zusammenhang zwischen den roten Carotinoiden und dem blauen Pigment gab. Es gelang ihm, das Pigment mit einer Ammoniumchlorid-Lösung zu extrahieren und er stellte auch fest, dass das blaue Pigment immer zusammen mit Proteinen auftrat. Die Annahme aber, dass es sich bei dem blauen Pigment um ein Protein an sich handeln könne, verwarf er, weil er – mangels verlässlicher bzw. selektiver Methoden – keinen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Protein und blauem Pigment feststellen

konnte. Erst J. Verne [77] stellte 1921 fest, dass es sich um die Assoziation eines carotinoidartigen Stoffes mit einem Protein handelt. Das Carotinoid wurde schließlich 1938 von R. Kuhn und N. Sörensen als Astaxanthin identifiziert [48]. G. Wald [79] konnte das blaue Protein, das er Crustacyanin taufte, 1948 mit verdünnter Citronensäure extrahieren und dokumentierte als erster dessen thermochromes Verhalten. Die Dissoziation von  $\alpha$ -Crustacyanin in  $\beta$ -Crustacyanin konnte er photometrisch beobachten, aber noch nicht erklären. Zagalsky und Cheesman [92] etablierten 1963 eine reproduzierbare Isolierungsmethode und führten Walds spektroskopische Studien fort. W. Jencks, ein Schüler von Wald, und B. Buten [41] stellten 1964 fest, dass sich der blaue Extrakt chromatographisch in drei Pigmente auftrennen ließ:  $\alpha$ -Crustacyanin,  $\beta$ -Crustacyanin und ein instabiles gelbes Pigment.

Ein großer Durchbruch gelang den Heidelbergern R. Kuhn und H. Kühn 1966 [46, 47] mit der Molekulargewichtsbestimmung und einer ersten Analyse der Aminosäurezusammensetzung. 1968 griffen Buchwald und Jencks [14, 15] auf die verschiedenen spektroskopischen Studien zurück, führten auch eigene Studien an Crustacyanin und (freiem) Astaxanthin durch und stellten als erste detaillierte Vermutungen über die elektronischen Ursachen der bathochromen Verschiebung auf. Sie vermuteten – zurecht – intermolekulare Interaktionen der  $\pi$ -Elektronen und eine Verwindung des Carotinoids. Ihre Vermutung, dass letzteres ausschlaggebend sei, hat sich im Nachhinein allerdings nicht bewahrheitet.

### 3.2. Von der Isolierung zur Sequenz

Mit der Fortentwicklung der analytischen Chemie wurden auch die Beiträge zum Thema Crustacyanin immer umfang- und erkenntnisreicher. Schwerpunktmäßig wurde die Forschung von Arbeitsgruppen in England durchgeführt, als zentrale Personen kann man George Britton (University of Liverpool), der sich eher mit dem carotinoiden Teil der Problematik auseinandergesetzt hat, und Peter F. Zagalsky (Royal Holloway, University of London), der wesentliche Arbeiten zur Isolation und Charakterisierung von Crustacyanin geleistet hat, nennen.

R. Quarmby et al. [67] gelang es 1977, die fünf Apoprotein-Einheiten elektrophoretisch sowie chromatographisch aufzutrennen und deren Aminosäurezusammensetzung zu bestimmen. Nach ihrer Aminosäure-Zusammensetzung ließen sich diese in zwei Gruppen aufteilen. Quarmby et al. konnten zudem  $\beta$ -Crustacyanin in verschiedene Komponenten auftrennen, die sie als unterschiedliche Heterodimere der Apoproteine identifizieren konnte.

Mit seinen Raman-spektroskopischen Studien führte V. Salares [70] 1979 eine neue analytische Technik in die Crustacyanin-Forschung ein. Seine Erkenntnisse bestärkten die Vermutung eines polarisierten  $\pi$ -Elektronensystems. Durch den Vergleich von *in situ*-Spektren mit denen von isoliertem Crustacyanin konnte er zudem nachweisen, dass der Bindungsmodus des Astaxanthins im Isolierungsprozess unverändert bleibt. 1980 fanden Lee et al. [49] bei CD-spektroskopischen Untersuchungen Hinweise auf eine räumliche Nähe der Carotinoid-Polyenkette. Ihr geschätzter Wert von 13 Å liegt in der Größenordnung des tatsächlichen Wert von 7 Å [91]. Ihr, auf fluoreszenzspektroskopischen Experimenten beruhender Vorschlag, ein Charge-Transfer-Komplex zwischen Tryptophan-Resten und dem Carotinoide sei mit für die bathochrome Verschie-

bung verantwortlich, hat sich allerdings nicht direkt bewahrheitet – die Tryptophan-Reste von Crustacyanin befinden sich nämlich nicht in der Bindungstasche.

Eine dänische Forschergruppe um S. Liaaen-Jensen [69] stellte 1982 fest, dass die Bindung von Astaxanthin in Crustacyanin nicht stereoisomeren-spezifisch ist. Ihre Untersuchungen zeigten, dass die drei Stereoisomere zu annähernd gleichen Teilen im Proteinkomplex auftreten. In Rekonstitutionsexperimenten zeigten die Forscher, dass eine einzige C(3)-Hydroxygruppe am Carotinoid für die Rekonstitution hinreichend ist.

Ebenfalls in 1982 gelang es P. Zagalsky,  $\alpha$ -Crustacyanin aus *H. gammarus* und weitere Carotinoproteine aus *Verella vellella*, einer Nesseltierart, zu kristallisieren [88]. Auf der Grundlage von elektronenmikroskopischen Aufnahmen [94] machte Zagalsky im selben Jahr einen ersten Vorschlag, wie die Quartärstruktur von  $\alpha$ -Crustacyanin aussehen könnte. Zagalsky verglich die Proteine von *H. gammarus* und *Verella vellella* außerdem durch Peptidkartierung [87], wobei er die von Quarmby [67] gefundene Aufteilung der Untereinheiten in zwei Gruppen bestätigten konnte. Im weiteren Verlauf der achtziger Jahre erschien eine Reihe von Artikeln, die die bisher entwickelten Methoden – vor allem im Bereich der Raman- und CD-Spektroskopie – auf die Carotinoproteine anderer Spezies übertrugen [93, 95, 89, 31, 60]. Ein großer Durchbruch war schließlich die vollständige Sequenzierung der Apoproteine A<sub>2</sub> [42] und C<sub>1</sub> [43] durch eine Forschungsgruppe der University of Leeds, England. Durch Homologiemodellierung auf ein Retinol-bindendes Protein erstellten die Forscher ein Computermodell des A<sub>2</sub>/C<sub>1</sub>-Dimers [43], das sich im Nachhinein [21] allerdings als unzureichend erweisen musste.

### 3.3. NMR ...

Nach jahrzehntlangem Rätselraten um die strukturellen Grundlagen der bathochromen Verschiebung gelang es R. Weesie 1995 [80], den ersten experimentellen Beweis für eine verringerte Ladungsdichte im Carotinoid zu liefern. Gleichzeitig sprachen seine experimentellen Befunde gegen eine starke Verwindung des Chromophors. Die Forschungsgruppe um den Niederländer hatte einmal mehr eine neue Analysenmethode an das blaue Protein herangeführt: die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR). Mit unterschiedlichen Methoden der  $^{13}\text{C}$ -NMR und anderen schon etablierten spektroskopischen Methoden konnten R. Weesie, G. Britton und andere in den folgenden Jahren zahlreiche wichtige Erkenntnisse über die Konformation und elektronische Struktur des gebundenen Astaxanthins gewinnen [81, 82]. Britton, Weesie et al. lieferten 1997 in einer sehr breit angelegten Studie [13], bei der die  $^{13}\text{C}$ -NMR-, Raman- und CD-Spektroskopie auf rekonstituierte Crustacyanine mit 27 verschiedenen Carotinoiden angewandt wurden, die essentiellen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Chromphorbindung und damit die bathochrome Verschiebung. Ermöglicht wurden diese Studien nicht nur durch die neuen spektroskopischen Methoden, sondern auch durch Fortschritte in der Carotinoid-Synthese [64, 53, 40, 59], denn erst die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Carotinoiden machte es möglich, die Carotinoid-Konformation Atom für Atom zu entschlüsseln.

Einen anderen Ansatz verfolgt eine amerikanische Arbeitsgruppe, Liu et al. rekonstituierten  $\alpha$ -Crustacyanin mit fluoridierten Carotinoiden und untersuchten sie mit  $^{19}\text{F}$ -NMR [38, 52].

Die Entwicklung von immer ausgefeilteren Bindungsmodellen wurde von theoretischen Modellrechnungen nach quantenphysikalischen und computerchemischen Methoden unterstützt [81, 83].

### 3.4. ... und Röntgenstrukturanalyse

Parallel zu den spektroskopischen Methoden versuchte eine Gruppe britischer Wissenschaftler um die Kristallographen N. Chayen und J. Helliwell, Crustacyanin zu kristallisieren und dessen Kristallstruktur – die Tertiärstruktur des Proteins – mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse zu lösen.

Die größte Hürde auf diesem Weg war, Proteinkristalle hinreichender Qualität zu gewinnen. Nachdem Kristallisationsversuche mit der Dampfdiffusionsmethode keine geordneten Kristalle geliefert hatten, gelang es Chayen 1996, in monatelangen Kristallisationsansätzen erste Kristalle herzustellen, die sich im Röntgenstrahl analysieren ließen [17]. Die Kristalle waren allerdings so strahlungsensitiv, dass sie bereits nach kurzer Meßzeit von der Röntgenstrahlung zerstört wurden. Bei weiteren Versuchen mit weicherer Röntgenstrahlung konnten immerhin die Raumgruppe und die Dimensionen der Einheitszelle des Kristalls bestimmt werden [18]. Die Suche nach einem optimierten Kristallisationsverfahren ging soweit, dass eine Reihe von Kristallisationsexperimenten an Bord des Space Shuttles ausgeführt wurden, in der Hoffnung, die Schwerelosigkeit des Weltalls ermögliche das Wachstum besser geordneter Kristalle [16, 74]. Die Erfolge der Kristallisation in Mikrogravitation beschränkten sich allerdings nur auf einige Teilaspekte.

Der entscheidende Durchbruch auf dem Gebiet der Strukturanalyse kam 2001, als es gelang, die Kristallstruktur des Apoproteins  $A_1$  mittels weicher Röntgenstrahlung zu entschlüsseln [20][PDB ID 1H91]. Wenig später wurde auch die Struktur des  $C_1/C_1$ -Dimers gelöst [33][PDB ID 1I4U]. Dabei wandten die Wissenschaftler zum ersten Mal überhaupt eine neuartige Methode der Röntgenstrukturanalyse an: Sie benutzten die schwache anomale Streuung der Röntgenstrahlen an den Schwefelatomen zur



Bestimmung der Phasenlage der Strahlung. Die Kenntnis der Phasenbeziehung ist eine notwendige Bedingung, um Kristallstrukturen bestimmen zu können.

Im Sommer 2002 wurde schließlich die Kristallstruktur des A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub>-Dimers mit seinen gebundenen Astaxanthin-Liganden gelöst [21]. Die strukturelle Natur der bathochromen Verschiebung war damit aufgeklärt.

### 3.5. Aktuelle Forschung

Die aktuelle Forschung an Crustacyanin verfolgt mehrere Ziele. Zum einen bemüht man sich darum, die Strukturen der restlichen Apoproteine aufzuklären bzw. die schon aufgeklärten Strukturen zu verfeinern. So wurde Ende 2003 auch das C<sub>2</sub>-

Protomer entschlüsselt [36], selbige Arbeitsgruppe beschäftigte sich auch mit Möglichkeiten den Informationsgewinn aus Röntgendiffraktionsexperimenten zu maximieren [57]. Zum anderen ist man natürlich bemüht, nun den nächsten Schritt zu gehen, und die Quartärstruktur von  $\alpha$ -Crustacyanin zu bestimmen. Hierzu hat eine britisch-französische Arbeitsgruppe, die Crustacyanin-Lösungen mit kleinwinkliger Röntgenstreuung untersucht hat, erste Ergebnisse erzielt [24].

Eine andere Forschungsrichtung haben verschiedene Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der theoretischen Chemie eingeschlagen. Sie versuchen mit quantenphysikalischen Berechnungen die bathochrome Verschiebung im kleinsten Detail zu verstehen [26, 25].

## 4. Zoologischer und biochemischer Hintergrund

### 4.1. Krustentierspezies

#### 4.1.1. Der Taschenkrebs

Der Taschenkrebs *Cancer pagurus* ist in der Nordsee von den Lofoten und Shetland Inseln bis zum südlichen Portugal häufig anzutreffen. Sehr selten findet man ihn im westlichen Mittelmeer und der Adria. Der Krebs lebt bevorzugt auf felsigen, aber auch auf sandigen Meeresgründen, von flachen Küstengewässern bis zu 520 m Tiefe, allerdings bewegen sich die Tiere nur selten tiefer als 100 m. *C. pagurus* wird bis zu 28 cm breit und 16 cm lang, der Krebs ist essbar und somit eine bedeutende Fischereiresource. [75, 7]

#### 4.1.2. Der Hummer

Der europäische Hummer *Homarus gammarus* ist im Nordostatlantik weit verbreitet, wenn auch die Bestände durch Befischung, Umweltverschmutzung, Seuchen und die Zerstörung von Lebensräumen stark zurückgegangen sind. Sein Lebensraum erstreckt sich von den felsigen südnorwegischen Küstengewässern über die der britischen Inseln bis hin zu küstenfernen, felsigen Gebieten vor Dänemark und Deutschland (z.B. Helgoland). Vereinzelt Exemplare wurden auch schon weiter südlich, bis hin zum Mittelmeer gefangen. Hummer bevorzugen felsige Verstecke in der sublitoralen Zone (0-200 m), kommen aber in Tiefen bis zu 800 m vor. Die tiefblau gefärbten Tiere können einige Jahrzehnte alt werden. [7, 65]

#### 4.1.3. Die Seespinne

Die nordatlantische Seespinne *Hyas araneus* lebt in den kalten Gewässern des

West- und Ostatlantiks von Island, Spitzbergen und dem europäischen Russland bis zum Kanal. Die Seespinne lebt auf felsigen, schlammigen und sandigen Gründen von den Küstengewässern bis zu 50 m Tiefe, seltener bis 555 m. Das grau-braune Krustentier ist bisher nur sehr wenig erforscht. [7, 75, 27]

#### 4.1.4. Die Riesengarnele

Unter der Bezeichnung Riesengarnele werden mehrere Garnelenspezies im Handel angeboten. Einen großen Anteil stellt dabei die Riesentigergarnele *Penaeus monodon*. Weitere Spezies sind die grüne Tigergarnele *Penaeus semisulcatus*, die braune Tigergarnele *Penaeus esculentus* und die Kurumagarnele *Marsupenaeus japonicus*. Alle vier Spezies sind südostasiatische Brackwassertiere, die in großen Mengen in Aquakulturen gezüchtet werden. [7]

### 4.2. Aufbau und Struktur von Proteinen

Proteine sind die vielseitigsten Makromoleküle eines Organismus. Sie sind an fast allen physiologischen Prozessen beteiligt: Sie katalysieren biochemische Reaktionen, transportieren Stoffwechseledukte und -produkte, bauen und zersetzen Strukturen und erfüllen eine Vielzahl anderer Aufgaben. Ihre zentrale Bedeutung innerhalb eines Organismus spiegelt sich auch darin wieder, dass die in der DNA enthaltene genetische Information letztlich in Proteine übersetzt und dadurch ausgedrückt wird.

Für jedes Protein existiert im Genom eine DNA-Sequenz, ein Gen, das als codierte Information die Aminosäuresequenz des Proteins enthält.



(b)



(a)



(d)



(c)

Abb. 4.1.: (a) *Carcinus maenas* [75], (b) *Homarus gammarus* [65], (c) *Hyas araneus* [75], (d) *Penaeus monodon* [3]

### 4.2.1. Aminosäuren

Proteine sind Makromoleküle, die sich aus vielen Aminosäureeinheiten zusammensetzen. Aminosäuren sind organische Moleküle, die durch zwei funktionelle Gruppen charakterisiert werden: Die saure Carboxylgruppe

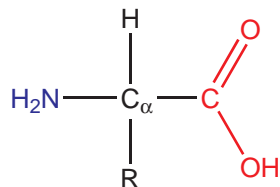


Abb. 4.2.: Grundstruktur einer Aminosäure

(rot in Abb. 4.2) und die basische Aminogruppe (blau in Abb. 4.2). Alle in Proteinen vorkommenden Aminosäuren sind sogenannte  $\alpha$ -Aminosäuren. Die Carboxylgruppe ist also endständig und die Aminogruppe sitzt am benachbarten  $C_\alpha$ -Atom.

Natürlicherweise kommen nur 20 Aminosäuren in Proteinen vor. Man nennt sie daher proteinogen. Die einzelnen Aminosäuren unterscheiden sich im Rest R am  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atom. Dadurch erhalten diese Aminosäuren ein asymmetrisches Kohlenstoff-Atom. Mit Ausnahme der einfachsten Aminosäure Glycin ( $R = H$ ) sind die  $\alpha$ -Aminosäuren daher optisch aktiv. In den natürlich vorkommenden Proteinen findet man nur die L-Form der beiden Stereoisomere.

Eine vollständige Liste aller proteinogenen Aminosäuren mit ihren gebräuchlichen Kürzeln ist im Anhang B gegeben [84].

### 4.2.2. Primärstruktur

Aminosäuren können sich unter Abspaltung von Wasser aneinanderlagern. Die dabei entstehende kovalente Bindung zwischen zwei Aminosäuren nennt man Peptidbindung. [Abbildung] Proteine sind Polypeptide, also Makromoleküle, die aus einer langen Kette

von Aminosäuren bestehen. Die Abfolge oder Sequenz der Aminosäuren eines Proteins bezeichnet man als Primärstruktur. Einer Konvention nach werden Proteinsequenzen vom N-terminalen zum C-terminalen Ende gelesen. Das N-terminale Ende ist das Ende, an dem sich die Aminogruppe befindet, das C-terminale Ende dasjenige mit der Carboxylgruppe.

Die Peptidbindung ist starr und planar, woraus sich eine Unterteilung der Polypeptidkette in zwei Bereiche ergibt: Einen immer gleichen Teil, der aus der Wiederholung der Einheit  $-CO-CH-NH-$  besteht und das Rückgrat (backbone) des Proteins bildet und einen variablen Teil, der aus den Seitenketten der einzelnen Aminosäuren besteht.

### 4.2.3. Sekundärstruktur

Unter der Sekundärstruktur versteht man regelmäßige, periodisch wiederkehrende räumliche Anordnungen benachbarter Aminosäuren in einer Polypeptidkette. Durch intramolekulare Wechselwirkungen bilden sich dabei größere Strukturelemente oder Motive, die die zweite Ebene der Proteinstruktur ausmachen. Die häufigsten Sekundärstrukturelemente sind die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und die  $\beta$ -Schleife. Ungeordnete Regionen der Proteinstruktur werden als Schleifen oder Loops bezeichnet. Wie die  $\beta$ - oder  $\Omega$ -Schleifen verbinden sie häufig einzelne Sekundärstrukturelemente.

#### $\alpha$ -Helix

In der  $\alpha$ -Helix besitzt das Rückgrat der Peptidkette die Struktur einer stabförmigen, rechtsgängigen Wendel. Die Seitenketten zeigen dabei nach außen. Die Wendel-Struktur wird vor allem durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH- und den CO-Gruppen

innerhalb des Rückgrats stabilisiert. Dabei tritt jeweils das Sauerstoff-Atom der CO-Gruppe einer Aminosäureeinheit mit dem Wasserstoff-Atom der Aminogruppe der überüber nächsten ( $n+4$ ) Einheit in Wechselwirkung. Die einzelnen Reste sind um 150 pm entlang der Helixachse versetzt und um 100 Grad gedreht. Eine volle Umdrehung der  $\alpha$ -Helix entspricht 3,6 Aminosäureresten.

Aminosäuren, die in linearer Sequenz 3-4 Reste voneinander entfernt liegen, gelangen innerhalb der  $\alpha$ -Helix in räumliche Nachbarschaft. Die Ganghöhe der  $\alpha$ -Helix beträgt 5,4 Å.

### $\beta$ -Faltblatt

$\beta$ -Faltblätter (*engl.*  $\beta$ -sheet) bilden im Gegensatz zu  $\alpha$ -Helices eine zickzackförmige Fläche. Dieses Strukturelement wird vor allem durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sich zwischen den einzelnen Strängen ausbilden. Topologisch unterscheidet man parallele und antiparallele Faltblattstrukturen. Zwei  $\beta$ -Stränge lagern sich derart aneinander, dass sie entweder in dieselbe (parallel) oder in die entgegengesetzte (antiparallel) Richtung verlaufen.

### Schleifen

Die kurze  $\beta$ -Schleife (*engl.*  $\beta$ -turn) erzwingt eine Richtungsänderung des Peptidrückgrates und ermöglicht dadurch eine dichte Faltung. Eine  $\beta$ -Schleife entsteht durch Wechselwirkungen der CO-Gruppe eines Restes  $n$  zur Aminogruppe des übernächsten ( $n+3$ ) Restes.

Häufig sind die einzelnen  $\beta$ -Stränge antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter durch solche Schleifen verbunden.

Die  $\Omega$ -Schleife (*engl.*  $\Omega$ -loop) ist ein kompaktes, zusammenhängendes Segment der Peptidkette, das eine bogenförmige Schleife, ähnlich dem griechischen Buchstaben  $\Omega$ , ausbildet.  $\Omega$ -Schleifen sind in der Regel 10

bis 30 Aminosäurereste lang. subsectionTertiärstruktur Die nächst höhere Strukturebene von Proteinen, die Tertiärstruktur, beschreibt die räumliche Anordnung der gesamten Peptidkette. Die Tertiärstruktur wird durch verschiedene intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Besonders wichtig sind dabei die Disulfidbrücken (-S-S-), die sich als kovalente Bindungen durch eine Redoxreaktion zwischen räumlich benachbarte Cystein-Resten bilden. Desweiteren sind Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen an der strukturellen Stabilisierung beteiligt. Die Tertiärstruktur ist durch die Aminosäuresequenz eindeutig bestimmt.

Viele Eigenschaften eines Proteins sind von der Tertiärstruktur abhängig, so zum Beispiel die Löslichkeit oder die Fähigkeit, Liganden zu binden oder eine katalytische Aktivität auszuführen.

### 4.2.4. Quartärstruktur

Als Quartärstruktur bezeichnet man die Zusammenlagerung mehrerer eigenständiger, gefalteter Proteineinheiten zu einer größeren Einheit. Die einzelnen Einheiten bezeichnet man mitunter auch als Protomere.

### 4.3. Proteinfamilien

Unter den rund 15 000 heute bekannten Proteinstrukturen sind mehrere sogenannte Familien, in denen die Moleküle das gleiche, grundlegende Faltungsmuster, also eine ähnliche Tertiärstruktur, beibehalten haben. Eine große Ähnlichkeit in der Primärstruktur ist damit nicht notwendigerweise verbunden. Im Gegenteil, das Spektrum der Sequenzähnlichkeit reicht von fast völliger Übereinstimmung bis hin zu Unterschieden von mehr als 80%. Evolutionär wird die Tertiärstruktur eines Proteins also stärker konserviert als dessen Sequenz.

Proteine einer Familie sind zueinander ho-

molog, das bedeutet, sie weisen deutliche Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz auf.

## 4.4. Carotinoide

### 4.4.1. allgemeine Informationen

Die Carotinoide umfassen Kohlenwasserstoffe (Carotine) und deren sauerstoffhaltige Derivate (Xantophylle), deren Grundstruktur aus vier Isopren-Einheiten besteht, die im Idealfall punktsymmetrisch zum Molekülmittelpunkt angeordnet sind. Caroti-

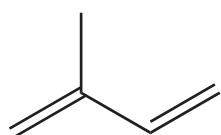


Abb. 4.3.: Isopren

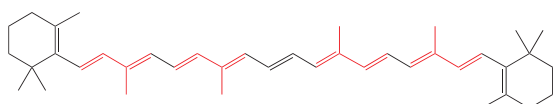


Abb. 4.4.: Isopreneinheiten in  $\beta$ -Carotin

noide sind natürliche Farbstoffe, in der Regel pflanzlicher Herkunft, die in Flora und Fauna weit verbreitet sind, und für die Gelb- Rot- oder Orangefärbung unzähliger Pflanzen und Früchte sorgen. Auch in der Photosynthese spielen Carotinoide wie Lutein eine kritische Rolle.

In Tieren dienen Carotinoide als Antioxidantien und Provitamin A, in marinen Wirbellosen sorgen sie zudem für außergewöhnliche Pigmentierungen. Hierbei gehen die Carotinoide oft Bindungen mit Proteinen ein. Tiere sind nicht in der Lage, Carotinoide selbst zu synthetisieren, allerdings können die in der Nahrung aufgenommenen Carotinoide im tierischen Körper modifiziert werden.

Auch im menschlichen Körper haben Carotinoide ein großes antioxidatives Potential und werden wirkungsvoll als Radikalfänger eingesetzt. Das lebenswichtige Vitamin A wird im Körper aus  $\beta$ -Carotin hergestellt. Carotinoide sind aufgrund ihrer Struktur sehr reaktiv und bilden daher unter dem Einfluss von Licht, Wärme, Luftsauerstoff, Säuren oder Basen Artefakte [28, 84, 19, 72, 51].

### 4.4.2. Nomenklatur

#### Trivialnamen

Da die IUPAC-Namen von Carotinoiden schnell unübersichtlich werden, hat fast jedes Carotinoid einen Trivialnamen. In der Regel ist dieser Name von der biologischen Quelle abgeleitet, aus der das Carotinoid zuerst isoliert wurde. So stammt zum Beispiel die Bezeichnung Crustaxanthin daher, dass besagtes Carotinoid aus Krustentieren, lateinisch Crustacea isoliert wurde.[12][Handbook 197]

#### IUPAC-Namen

Um jede Mehrdeutigkeit zu vermeiden, haben die IUPAC und die IUB ein Nomenklatursystem entwickelt, das auch die Stereochemie der Carotinoide umfasst, und 1975 zum ersten Mal publiziert wurde [11, 12]. Grundlage dieses System ist eine eindeutige Nummerierung des Kohlenstoffskeletts und sieben, mit griechischen Buchstaben benannte Endgruppen.

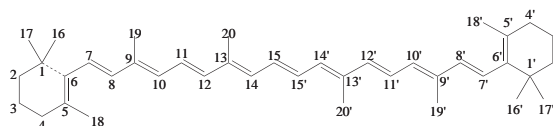


Abb. 4.5.: Nummerierungsschema

#### 4.4.3. Die elektronische Struktur

Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit Carotinoiden, deren Kohlenstoffgerüst aus genau 40 Kohlenstoffatomen besteht, so genannten  $C_{40}$ -Carotinoiden, die zudem cyclische Endgruppen besitzen. Das Rückgrat der Moleküle wird dabei von einer Kette aus konjugierten C=C Doppelbindungen gebildet.

In den konjugierten Doppelbindungen entsteht ein Bereich, in dem sich die Valenzelektronen frei bewegen können. Diese delokalisierten  $\pi$ -Elektronen werden von einfallender Strahlung mit passender Wellenlänge in einen höheren energetischen Zustand versetzt. Dabei wird die Strahlung, in diesem Fall sichtbares Licht, absorbiert und wir nehmen das Molekül als farbig wahr [28, 84, 44, 19, 34].

#### 4.4.4. Chiralität bei Carotinoiden

Die meisten Carotinoide besitzen mindestens ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und treten daher natürlicherweise als optisch aktive Substanzen auf. Carotinoide mit ei-

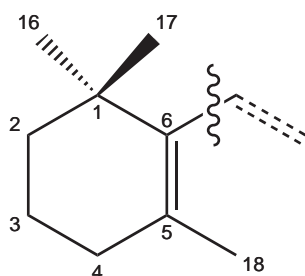


Abb. 4.6.:  $\beta$ -Endring

nem  $\beta$ -Endring sind zudem konformationell chiral, weil die C(5)=C(6)-Doppelbindung im Ring aufgrund sterischer Hinderung nicht in einer Ebene mit der konjugierten Kette liegen kann. Dadurch ist die Polyenkette leicht helical verwunden. äquatoriale Substituenten an C(2) oder C(3) bilden chirale Zentren aus und fixieren die helicale Konformation,

indem sie einer bestimmten Händigkeit der Drehung den Vorzug geben. Weitere chirale Zentren können an den Atomen C(1) und C(4) entstehen [62].

Auch Astaxantin ist optisch aktiv und kommt in drei Stereoisomeren vor. Alle drei

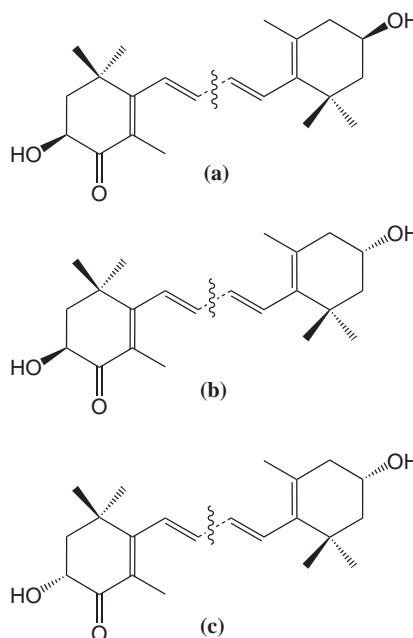


Abb. 4.7.: Stereoisomere von Astaxantin

Stereoisomere ( $3S,3'S$ ) Astaxantin (Abb. 4.7(a)), ( $3R,3'S$ )- bzw. meso Astaxantin (Abb. 4.7(b)) und ( $3R,3'R$ ) Astaxantin (Abb. 4.7(c)), treten auch in der Natur nebeneinander auf z.B. in Hummereiern, Garnelenpanzern oder im Lachsfleisch [54].

## 5. Methodischer und theoretischer Hintergrund

### 5.1. Bioinformatische Methoden

#### 5.1.1. Vergleich von Proteinsequenzen

Hat man die Sequenzen zweier Proteine vorliegen, möchte man in der Regel ihre Ähnlichkeit quantitativ erfassen und Entsprechungen zwischen einzelnen Bausteinen beider Sequenzen feststellen. Auf diese Weise kann man u.a. Rückschlüsse auf entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaftsverhältnisse ziehen.

Zum Vergleich zweier Proteinsequenzen werden diese, ohne ihre Reihenfolge zu verändern, so aneinander gelegt, das sich entsprechende Sequenzabschnitte oder auch nur einzelne Aminosäuren gegenüberstehen. Lücken sind dabei erlaubt. Einen solchen Abgleich zweier oder mehrerer Proteinsequenzen nennt man Sequenz-Alignment.

Hat man zwei Buchstabenfolgen:

Folge 1 = a b c d e  
Folge 2 = a c d e f

Ein sinnvolles Alignment wäre dann

a b c d e -  
a - c d e f

In der Regel gibt es mehrere Möglichkeiten, ein Alignment zweier Sequenzen zu bilden. Um das bestmögliche Alignment zu finden, untersuchen Alignment-Algorithmen daher alle Möglichkeiten eines Alignment systematisch und bewerten sie.

Ein quantitatives Ergebnis eines Sequenz-Alignment ist die Sequenzidentität, die üblicherweise als Prozentzahl angegeben wird. Sie gibt an, wieviele Aminosäuren sich einander entsprechen. Im obigen Beispiel stimmen 4 von 5 Bausteinen miteinander überein. Die Sequenzidentität beträgt also

80%.

Sequenz-Alignments liefern drüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer Ergebnisse wie z.B. konservierte Sequenzmuster [50, 35, 9].

#### 5.1.2. Vergleich von Proteinstrukturen

Ebenso wie die Sequenzen, kann man auch die Strukturen zweier Proteine vergleichen. Man kann sich dazu eine Überlagerung oder Superposition vorstellen, in der einander entsprechende Punkte der beiden Strukturen sich so nahe wie möglich kommen. Der durchschnittliche Abstand zwischen entsprechenden Punkten ist dann ein Maß für die Strukturähnlichkeit. üblicherweise wird für die einander entsprechenden Atome die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*engl.* root-mean-square deviation, RMSD) angegeben:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{n}} \quad (5.1)$$

Wobei  $d_i$  der Abstand zwischen den Punkten des  $i$ -ten Atompaares bei optimaler Übereinstimmung und  $n$  die Zahl der Punkte ist. Der RMSD-Wert wird in der Einheit Ångström ( $1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$ ) angegeben.

Da Proteinstrukturen evolutionär stärker konserviert werden als Proteinsequenzen, eignen sich Struktur-Alignments auch zum Nachweis weitläufiger Verwandtschaften [50, 35, 9].

### 5.2. Elektrophorese

#### 5.2.1. Grundlagen

Eine wichtige Methode zur Trennung und Analyse von Proteinen, die Elektrophorese, beruht darauf, dass elektrisch geladene Teilchen in einem elektrischen Feld wandern. Die



Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  hängt dabei von der elektrischen Feldstärke  $E$ , der Ladung  $q$  des Moleküls und einem Reibungskoeffizientem  $f$  des Mediums, in dem das Teilchen bewegt, ab:

$$v = \frac{qE}{f} \quad (5.2)$$

Die elektrische Feldstärke wiederum ist von der angelegten Spannung  $U$  und dem Abstand der Elektroden  $d$  abhängig:

$$E = \frac{U}{d} \quad (5.3)$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist somit proportional zur angelegten Spannung. Als Charakteristikum für die Mobilität eines Moleküls gilt die so genannte elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu$ . Sie ist durch

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad (5.4)$$

definiert. Der Reibungskoeffizient  $f$  hängt sowohl von Form und Masse des wandernden Moleküls als auch von der Viskosität des umgebenden Mediums ab. Eine exakte Berechnung von elektrophoretischen Beweglichkeiten ist im Allgemeinen nicht möglich, da die effektive Ladung eines wandernden Moleküls von einer Vielzahl komplexer Faktoren abhängt und die genaue Form in der Regel unbekannt ist. Eine absolute Bestimmung von Molekülmassen ist daher mit der Elektrophorese nicht möglich. Allerdings kann man mit ihrer Hilfe Mischungen von Makromolekülen relativ einfach und schnell trennen und analysieren [66, 86].

### 5.2.2. SDS-PAGE

Zur Trennung von Proteingemischen verwendet man oft die sogenannte Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) an. Der Vorteil einer elektrophoretischen Trennung in einem Gel liegt darin, dass das Gel einerseits

als Molekularsieb wirkt, andererseits werden Konvektionsströmungen vermieden. Polyacrylamidgele werden eingesetzt, da sie chemisch inert sind und man ihre Porengröße einfach variieren kann, indem man zur Polymerisierung unterschiedliche Konzentrationen einer quervernetzenden Reagenz einsetzt. Um bei der Trennung von Proteinen einen von der Tertiärstruktur unabhängigen Zusammenhang zwischen Masse und elektrophoretischer Beweglichkeit zu erhalten, muss man die Proteine in eine einheitliche Form bringen. Dies wird durch Denaturierung erreicht. Die Proteine werden dazu in einer Detergenz gelöst. Weit verbreitet ist die Anwendung von Natriumdodecylsulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate = SDS), weswegen die Methode auch SDS-PAGE genannt wird. Eventuell vorhande-

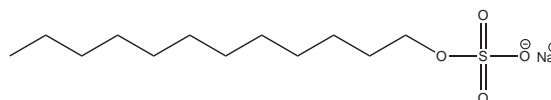


Abb. 5.1.: Struktur von SDS

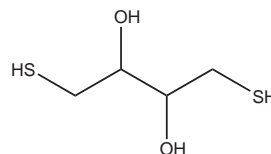


Abb. 5.2.: Struktur von DTT

ne Disulfidbrücken werden mit Dithiothreitol (DTT, 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgebrochen. Die SDS-Moleküle umhüllen die denaturierten Peptidketten und bilden eine gestreckte Micelle, die nach außen hin stark negativ geladen ist. Ladung und Masse der Micelle sind in etwa proportional. Unterwirft man die Micellen nun einer PAGE, wandern die kleinen Proteine rasch durch das Gel, während die großen Proteine vom Gel stärker zurückgehalten werden.

Man erhält so eine Reihe von Banden, die durch Anfärben, z.B. mit dem Farbstoff

Coomassie-Blau, sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit Proteinen bekannter Masse kann man die Masse eines unbekanntes Proteins einfach und zuverlässig ermitteln. Die SDS-PAGE ist schnell und empfindlich, selbst Proteine mit einem Massenunterschied von nur ca. 2% lassen sich noch trennen [66, 86].

### 5.2.3. Die Elektrophorese-Apparatur

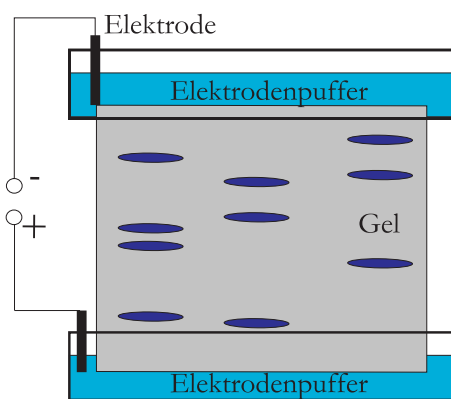


Abb. 5.3.: Elektrophorese-Apparatur

Die Gelelektrophorese ist ein apparativ sehr einfaches Verfahren: Das Gel ist zwischen Glasplatten eingespannt und wird an den beiden Enden über einen Elektrodenpuffer an eine Spannungsquelle angeschlossen. Da die SDS-Proteinmicellen nach außen negativ geladen sind, wandern sie vom negativen Pol der Apparatur durch das Gel nach unten zum positiven Pol.

## 5.3. Chromatographie

### 5.3.1. Grundlagen

Chromatographie ist eine physikalische Trennmethode, bei der die zu trennenden Bestandteile eines Stoffgemisches zwischen zwei Phasen verteilt werden. Während die eine Phase ruht und daher stationäre Phase genannt wird, bewegt sich die andere Phase in eine definierte Richtung. Sie wird mobile

Phase genannt.

In der Flüssigkeitschromatographie ist die stationäre Phase ein Feststoff, die mobile Phase eine Flüssigkeit. Die Trennung beruht auf unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der verschiedenen zu trennenden Stoffe zwischen den beiden Phasen. In der

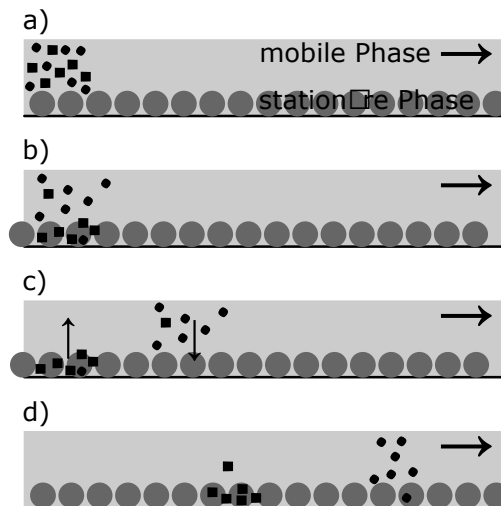


Abb. 5.4.: Chromatographie

schematischen Darstellung müssen zwei Komponenten getrennt werden (a). Die eine hält sich vorzugsweise, aber nicht ausschließlich, in der mobilen Phase auf, die andere vorzugsweise an der stationären Phase (b). Durch diesen Verhaltensunterschied lassen sich die beiden trennen: Mit der fließenden mobilen Phase werden die Stoffe durch die Säule transportiert und verteilen sich immer wieder neu zwischen den beiden Phasen (c), bis sie das Ende der Säule als getrennte Fraktionen verlassen (d) [55, 84].

### 5.3.2. Adsorptions-Chromatographie

Die in dieser Arbeit angewandten HPLC-Methoden folgen alle dem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie: Als stationäre Phase dient ein relativ poröses Material mit hoher spezifischer Oberfläche.

Die mobile Phase ist von entgegengesetzter Polarität. Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Stoffe der Probe an der stationären Phase.

Ist die stationäre Phase polar (meist Silicagel) und die mobile Phase unipolar (z.B. Hexan), so spricht man von Normalphasen-Chromatographie (NP). Polare Stoffe werden hierbei später eluiert als unpolare.

Gelten die umgekehrten Bedingungen, ist die stationäre Phase also unipolar und die mobile Phase polar, so spricht man von Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase, RP-HPLC). Hierbei werden polare Stoffe zuerst eluiert.

RP-Phasen sind meistens chemisch gebundene Phasen. Die eigentliche, unpolare Phase ist chemisch an ein Trägermaterial gebunden. In der RP-HPLC verwendet man in der Regel Silicagel, an dessen Silanolgruppen Alkyl-Reste, z.B. Octadecyl-Reste gebunden sind [55, 56].

### 5.3.3. HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography) ist ein leistungsfähiges Verfahren der Flüssigchromatographie, bei dem die stationäre Phase in Form sehr feiner Partikel (3-10  $\mu\text{m}$ ) vorliegt. Dies ermöglicht eine bessere Trennleistung, erfordert aber auch hohe Drücke zum Fördern der mobilen Phase. HPLC wird daher auch manchmal als Hochdruck-Flüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography) bezeichnet. Die HPLC ermöglicht schnelle und scharfe Trennungen von kleinsten Probenmengen ( $\mu\text{L}$ ), verlangt aber einen deutlich höheren apparativen Aufwand als die klassische Säulenchromatographie [55, 56, 63, 84].

### 5.3.4. Die HPLC-Apparatur

Eine HPLC-Apparatur ist normalerweise modular aufgebaut und besteht mindes-

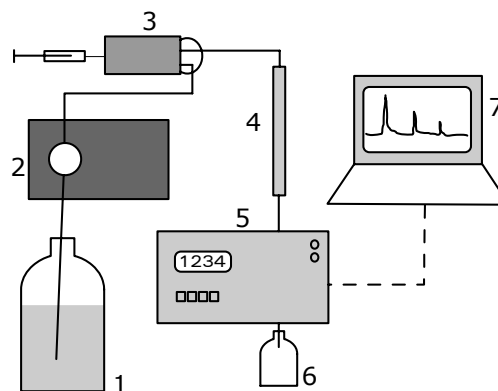


Abb. 5.5.: HPLC-Apparatur

tens aus den folgenden Bestandteilen (siehe Abb. 5.5): Die Pumpe (2) soll die mobile Phase vom Lösungsmittelvorrat (1) möglichst ohne Pulsationen und mit konstanter Fördergeschwindigkeit durch das gesamte System fördern, sie ist auch dafür verantwortlich, den nötigen Förderdruck aufzubringen. Im Injektionsventil (3) wird die Probe in den Eluentenstrom aufgegeben. Die chromatographische Trennung erfolgt auf der Säule (4), an deren Ausgang ein Detektor (5) die eluierten Stoffe erfasst und die Messwerte an eine Datenerfassung (7) weiterleitet. Die eluierten Bestandteile werden zur weiteren Analytik oder Entsorgung aufgefangen (6). Die einzelnen Bauteile werden mit möglichst dünnen und kurzen Kapillaren verbunden um Totvolumina, Rückvermischung und Bandenverbreiterung möglichst gering zu halten.

## 5.4. UV-VIS-Spektroskopie

### 5.4.1. Grundlagen

Die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung im Bereich des UV- sichtbaren (*engl.* visible, VIS) Licht und Molekülen führt zur Anregung von Valenzelektronen. Die Elektronen werden dabei in einen energetisch höheren Zustand gebracht; das

einfallende Licht wird absorbiert. Die Anregung fällt um so leichter, je freier sich die Elektronen bewegen können. Für die Anregung von delokalisierten  $\pi$ -Elektronen in einem konjugierten System reicht daher schon die relativ energiearme Strahlung des sichtbaren Lichts aus, während man zur Anregung der  $\sigma$ -Elektronen in einer C-H-Bindung sehr kurzwellige, energiereiche UV-Strahlung benötigt.

Da die Energie  $E$

$$E = h\nu \quad (5.5)$$

eines Lichtquants direkt von der Wellenlänge  $\lambda$  bzw. der Frequenz  $\nu$  mit

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (5.6)$$

der entsprechenden Strahlung abhängig ist und jeder Elektronenübergang eine charakteristische Energiedifferenz  $\Delta E$  aufweist, kann man aus den absorbierten Wellenlängen auf Strukturelemente eines Moleküls schließen. Das Maß der Lichtabsorption, die Extinktion  $E$ , ist zudem – nach dem Gesetz von LAMBERT-BEER – proportional zur Konzentration  $c$  des absorbierenden Stoffes und zur Schichtdicke  $d$  der Probe. Es gilt demnach:

$$E(\lambda) \sim c \cdot d \Leftrightarrow E(\lambda) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (5.7)$$

Der Proportionalitätsfaktor  $\epsilon_{\lambda}$  heißt molarer Extinktionskoeffizient und ist eine stoffspezifische Größe [37, 2].

#### 5.4.2. Probenvorbereitung und Aufnahme der Spektren

Zu analytischen Zwecken werden UV-VIS-Spektren üblicherweise in Lösung aufgenommen. Dazu wird die Probe – sofern sie nicht schon in Lösung vorliegt – in einem geeigneten, möglichst transparenten Lösungsmittel gelöst und in eine Glasküvette überführt. Dann misst man in einem Spektralphotometer die Extinktion der Probe bei unterschiedlichen Wellenlängen. Trägt man nun

die Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlängen auf, so erhält man das Absorptionsspektrum der Probe. Die Eigenabsorption von Messküvette und Lösungsmittel wird durch ein Blindspektrum (Spektrum der Messküvette mit reinem Lösungsmittel) ermittelt und vom Probenspektrum abgezogen. So erhält man das Absorptionsspektrum des gelösten Stoffes [37, 2].

#### 5.4.3. Das Spektralphotometer

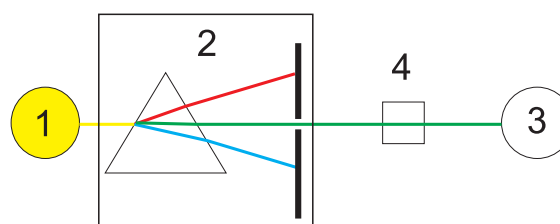


Abb. 5.6.: Aufbau eines Spektralphotometers

Die wesentlichen Bauteile eines Spektralphotometers sind eine Lichtquelle (1), ein Monochromator (2), der das Lampenlicht in die spektralen Bestandteile zerlegt und eine Photozelle (3), die die Intensität des ankommenden Lichtes misst. Die Messküvette (4) wird zur Messung in den Strahlengang eingebracht. [37, 2]

#### 5.4.4. Chiroptische Methoden

Chiroptische Methoden sind optische Messmethoden, die auf der Chiralität der untersuchten Stoffe basieren. Diese Stoffe sind optisch aktiv, das bedeutet, sie drehen die Polarisationssebene von linear polarisiertem Licht und absorbieren rechts- und links-circular polarisiertes Licht verschieden stark.

Letzteren Effekt macht man sich bei der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) zu nutze.

Chiroptische Methoden liefern Informationen über die Konfiguration und Konformation eines Stoffes [37, 86].

## 6. Carotinoproteine

### 6.1. Allgemeines

Die Assoziation von Carotinoiden mit Proteinen ist in der Natur kein ungewöhnliches Phänomen, gerade bei marinen Wirbellosen sorgen solche Carotinoproteine für die leuchtenden Farben von Gewebe und Panzer. Neben der Außenhaut enthalten sehr oft auch das Blut, die Eier und Eierstöcke, die Hypodermis und die Magenwand solche Proteinkomplexe. Die Carotinoproteine der Krustentiere lassen sich grob in zwei Klassen einteilen: In der ersten (Typ A) liegen Farbstoff und Protein oder Glycoprotein in einem stöchiometrischen Verhältnis vor, in der zweiten, meist instabileren Klasse (Typ B) sind die Carotinoide in einem beliebigen Verhältnis mit Lipo(glyco)proteinen assoziiert. Typ A ist vorrangig in den Häuten und Panzern der Tiere vertreten, Typ B überwiegt in den Eiern, Eierstöcken und im Blut [89]. Häufig, aber bei weitem nicht immer, findet man in solchen Komplexen Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotin-4,4'-dion,  $C_{40}H_{52}O_4$ ). Die bei-

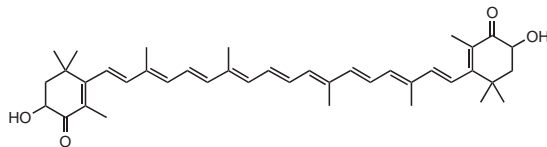


Abb. 6.1.: Astaxanthin

den Klassen werden durch zwei, mittlerweile ausführlich erforschte Hummerpigmente typisiert: Das blaue Astaxanthin-Protein Crustacyanin aus dem Panzer (Typ A) und das grüne Astaxanthin-Lipoglycoprotein Ovoverdin aus Eierstöcken und Eiern.

#### 6.1.1. Typ A: Crustacyanin

Das blaue  $\alpha$ -Crustacyanin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 632 nm [41] und dissoziiert bei Verringerung der Ionenstärke zunächst reversibel zu  $\alpha'$ -Crustacyanin ( $\lambda_{max}$  595 nm) [89] [LIT28], bei sehr geringer Ionenstärke dissoziiert es irreversibel zu  $\beta$ -Crustacyanin (Abb. 6.2<sup>1</sup>) ( $\lambda_{max}$  585-590 nm).

Extrahiert man aus  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Crustacyanin mit einem organischen Lösungsmittel die Carotinoide, so entstehen Apoproteine [87] mit einer Molmasse von jeweils ungefähr 20 000 Da.

Insgesamt gibt es fünf elektrophoretisch unterscheidbare Apoproteine, die sich aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihrer ungefähren Größe und durch Peptidkartierung in zwei Klassen unterteilen lassen: Typ I ( $\sim 19$  kDa) umfasst die Apoproteine A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>, Typ II ( $\sim 22$  kDa) die Apoproteine A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>. [19][Abbildung!!!].  $\beta$ -Crustacyanin besteht aus paarweisen Assoziationen von Apoproteinen, jeweils eines aus jeder Klasse, die zwischen sich zwei Moleküle Astaxanthin binden. Das gebundene Astaxanthin ermöglicht die Dimerisierung und hält das  $\beta$ -Crustacyanin zusammen.

$\alpha$ -Crustacyanin ist ein Aggregat aus acht  $\beta$ -Crustacyanin-Einheiten und ist elektronenmikroskopischen Studien zufolge als doppelter Tetramer strukturiert [94]. Neuere Studien mittels Röntgenstreuung in Lösung legen nahe, dass es sich bei  $\alpha$ -Crustacyanin um ein stabförmiges Aggregat handelt, bei dem die einzelnen  $\beta$ -Crustacyanin-Einheiten helical angeordnet sind. [24].

Neben  $\alpha$ -Crustacyanin (ca. 60-70%) und  $\beta$ -Crustacyanin (ca. 20%) liegen etwa 10-

<sup>1</sup>Die Proteingraphiken wurden mit dem Programm RASMOL 2.7.2.1.1 [71, 6] erstellt.

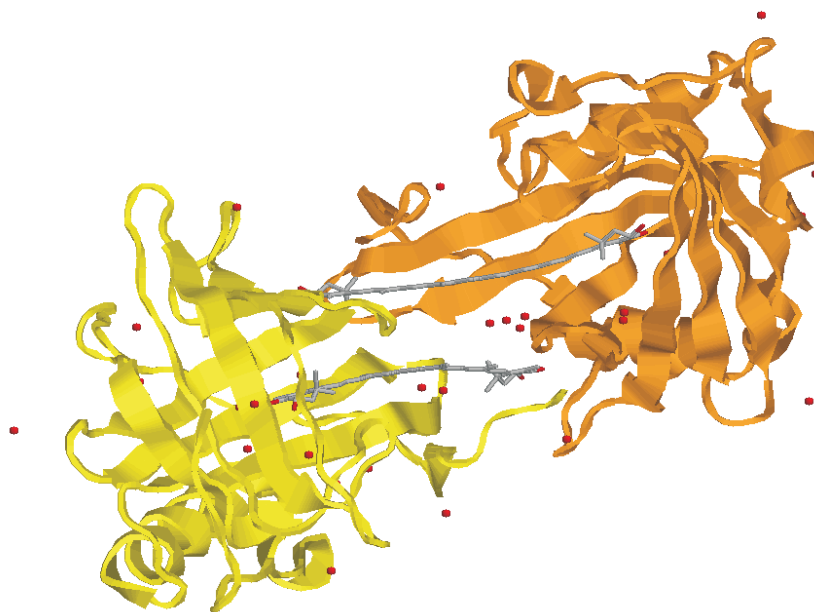


Abb. 6.2.:  $\beta$ -Crustacyanin ( $A_1/A_3$ -Dimer) mit gebundenem Astaxanthin

20% der Carotinoproteine im Panzer als  $\gamma$ -Crustacyanin ( $\lambda_{max}$  625 nm) vor. Dies hat dieselbe Aminosäurezusammensetzung und dasselbe Molekulargewicht wie  $\alpha$ -Crustacyanin, weist aber eine andere Tertiärstruktur auf [15]. Die Crustacyanine sind, wie auch andere Proteine des Typ A, über einen recht weiten pH-Bereich (pH 5-8,5) relativ stabile Komplexe, die sich auch, allerdings unter großem Aufwand, kristallisieren lassen. Licht und Wärme zerstören das Protein.

### 6.1.2. Typ B: Ovoverdin

Über Ovoverdin und andere Carotinoproteine des Typ B, lassen sich bei weitem keine so detaillierten Aussagen treffen, wie über die oben erwähnten Crustacyanine. Ovoverdin ist ein grünes Pigment, das zu 3-5% in den Eiern und Eierstöcken von Hummern vorkommt. Ovoverdin zeigt im sichtbaren Bereich zwei Absorptionsmaxima, das eine, bei 460 nm, wird auf lipidgelöste Caro-

tinoide zurückgeführt, das andere, bei 640 nm, auf proteingebundene Carotinoide. Es ist bis dato ungeklärt, ob die Assoziation von Carotinoiden an Ovoverdin überhaupt spezifisch oder stöchiometrisch erfolgt. Ovoverdin ist wesentlich instabiler als Typ A Proteine und zerfällt im Tageslicht innerhalb weniger Stunden. [89, 19]

## 6.2. Die bathochrome Verschiebung<sup>2</sup>

Die genaue strukturelle Grundlage der bathochromen Verschiebung wurde erst mit der Bestimmung der dreidimensionalen Proteinstruktur von  $\beta$ -Crustacyanin geklärt [21]. Wichtige Voraussetzung waren jedoch schon im Vorfeld bekannt.

Grundlage der bathochromen Verschiebung

<sup>2</sup>Die folgenden Abschnitte beziehen sich speziell auf ein  $A_1/A_3$ -Dimer, das einzige  $\beta$ -Crustacyanin, dessen dreidimensionale Struktur bisher experimentell bestimmt worden ist [21]. Die Strukturdaten dieses Dimers sind unter der PDB ID [1GKA] in der PDB [5, 68] gespeichert

ist eine Verkleinerung des Energieunterschieds zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand des Carotinoids. Durch Untersuchungen von rekonstituierten Carotinoproteinen mit etwa 30 unterschiedlichen – natürlichen und synthetischen – Carotinoiden wurden die notwendigen strukturellen Voraussetzungen für einen geeigneten Chromophor gefunden [13]. So passen generell nur C<sub>40</sub>-Carotinoide in *trans*-Konfiguration in die Bindungstasche, kleine Variationen in der Größe und Form des Endrings und bei der Methylierung werden jedoch toleriert. Notwendig sind die Methylgruppen an C(20) und C(20') sowie die Ketogruppen an C(4) und C(4').

Vielfältige spektroskopische Studien lieferten weitere Hinweise: Circular dichroismus-Spektren von Crustacyanin legten eine helicale Verwindung des Chromophors nahe, die Signalaufspaltung deutete zudem die räumliche Nähe der Astaxanthin-Moleküle an [15, 13, 21]. Im Raman-Spektrum wies eine niedrige Frequenz der C=C-Valenzschwingung  $\nu_{C=C}$  von Astaxanthin auf eine zunehmende Delokalisierung der Elektronen im Grundzustand hin. Diese Tatsache schrieb man einer Polarisierung des  $\pi$ -Systems durch räumlich nahe geladenen Gruppen oder Wasserstoffbrücken zu [70]. Auch wenn es geringer struktureller Änderungen des Chromophors bedarf, um diese Spektren zu erklären, sprechen sie insgesamt gegen eine größere Stauchung des Chromophors durch das Protein.

Studien mit <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie [13] und Stark-Spektroskopie [21] unterstützten die These einer im wesentlichen symmetrischen Polarisierung der Astaxanthin-Moleküle im Crustacyanin. Aus den spektroskopischen Daten wurde schon 1997 ein mutmaßliches Modell der gebundenen Astaxanthine abgeleitet, das auf einer Polarisierung der C(4)-Ketogruppen unter Mitwirkung eines Wassermoleküls beruhte [13]. Ein auf der Aminosäuresequenz der Apoprotei-

ne C<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> beruhendens Modell von 1991 [42, 43] ist dagegen inkonsistent mit den oben genannten Studien.

### 6.2.1. Topologie von $\beta$ -Crustacyanin

Die Apoproteine von Crustacyanin gehören zur Proteinfamilie der Lipocaline. Die Lipocaline sind in der Regel kleine (160-180 Aminosäuren), extrazelluläre Proteine, die in der Lage sind, kleine hydrophobe Moleküle zu binden. Die Lipocaline werden desweiteren durch drei stark konservierte Sequenzmotive und eine typische Faltung charakterisiert [29, 1]. Auch Crustacyanin weist diese Merkmale auf.

Das A<sub>1</sub>-Apoprotein besteht aus 180 Aminosäuren, das A<sub>3</sub>-Apoprotein besteht aus 174 Aminosäuren. Die beiden Protomere weisen eine Sequenzidentität von 35% auf und weichen räumlich in entsprechenden C <sub>$\alpha$</sub> -Atomen durchschnittlich nur 1,1 Å (RMSD) voneinander ab. Eigene Berechnungen mit der CE-Methode [73] lieferten eine Sequenzidentität von ca. 37% und einen RMSD-Wert von 1,6 Å für das gesamte Protein.

Beide Apoproteine weisen die lipocalintypische  $\beta$ -Fass-Faltung auf. Die Fass-Struktur wird von zwei aufeinander gefalteten, antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern gebildet. Das Fass umschließt die hydrophobe Bindungstasche. Die acht  $\beta$ -Stränge, benannt von A bis H, werden durch eine Folge von Schleifen verbunden, wobei jeder  $\beta$ -Strang mit dem räumlich daneben liegenden verbunden ist. Dadurch ergibt sich die einfachste mögliche  $\beta$ -Faltblatt Topologie, die sogenannte +1-Topologie [29]. Diese sieben Schleifen, sind mit Ausnahme derjenigen, die die Stränge A und B verbindet, kurze  $\beta$ -Haarnadeln. Besagte erste Schleife ist eine sogenannte  $\Omega$ -Schleife [21]. Die einzelnen Strukturelemente und ihre Benennung sind in Tabelle 6.1 festgehalten.

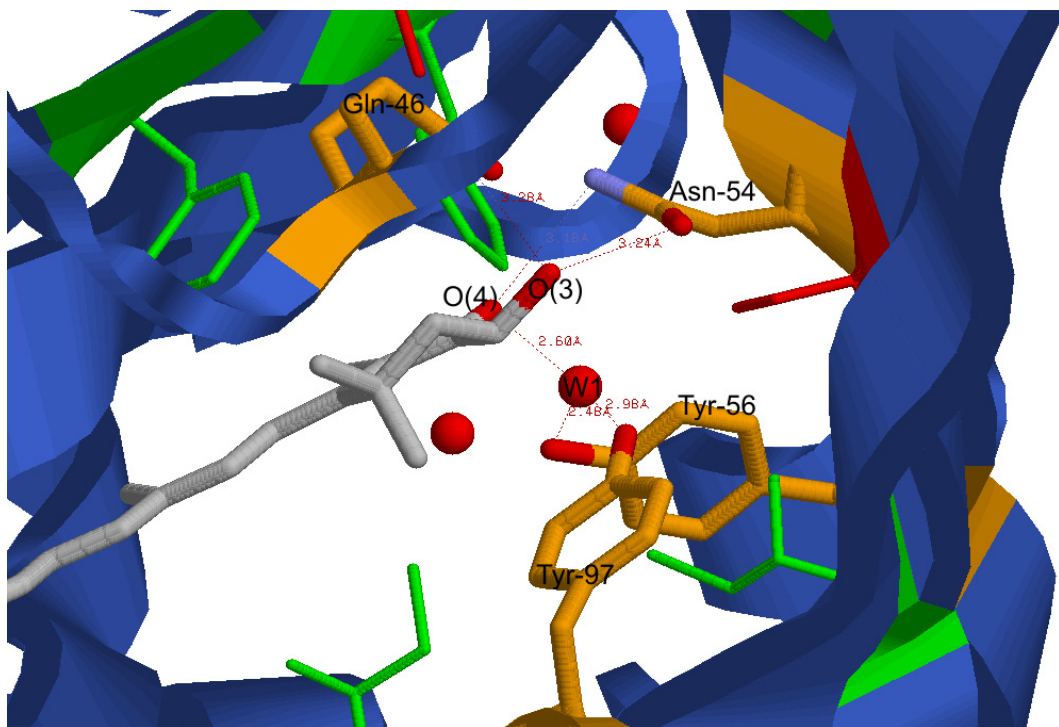


Abb. 6.3.: Der AXT1-C(1-6)-Endring in der Bindungstasche

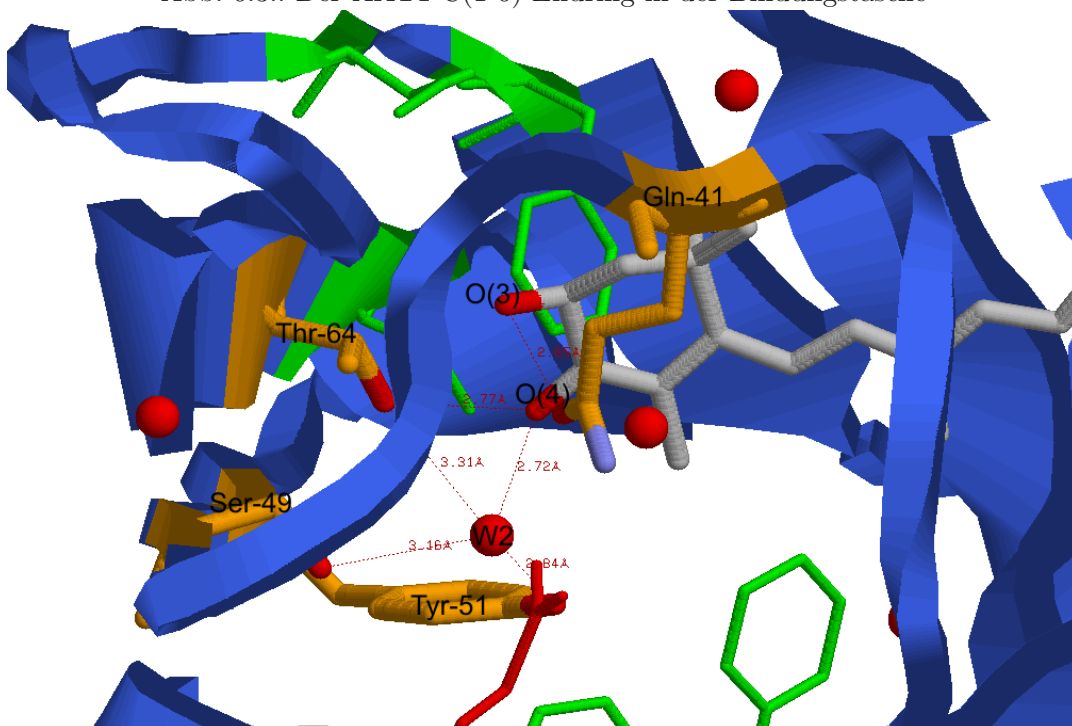


Abb. 6.4.: Der AXT2-C(1-6)-Endring in der Bindungstasche



A <sub>1</sub>			A <sub>3</sub>		
Name	Strukturelement	AS-Reste	Name	Strukturelement	AS-Reste
	$\alpha$ -Helix	16-24			
A1	$\beta$ -Strang	33-36	A1	$\beta$ -Strang	28-31
A2	$\beta$ -Strang	37-41	A2	$\beta$ -Strang	32-35
B	$\beta$ -Strang	50-58	B	$\beta$ -Strang	45-54
C	$\beta$ -Strang	63-70	C	$\beta$ -Strang	59-67
D	$\beta$ -Strang	76-85	D	$\beta$ -Strang	73-81
E	$\beta$ -Strang	93-95	E	$\beta$ -Strang	90-94
F1	$\beta$ -Strang	103-106	F1	$\beta$ -Strang	101-104
F2	$\beta$ -Strang	107-110	F2	$\beta$ -Strang	105-108
G	$\beta$ -Strang	115-123	G	$\beta$ -Strang	113-121
H	$\beta$ -Strang	128-137	H	$\beta$ -Strang	125-134
	$\alpha$ -Helix	147-154		$\alpha$ -Helix	142-154
I	$\beta$ -Strang	164-166			

Tab. 6.1.: Sekundärstrukturelemente der Apoproteine A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub>

### 6.2.2. Die Bindung der Astaxanthin-Liganden

Die beiden gebundenen Astaxanthin-Moleküle durchstoßen die Kontaktfläche zwischen den beiden Apoproteineinheiten, wobei jedes Apoprotein jeweils die Hälfte der beiden Carotinoide in sich birgt. Die Astaxanthine werden als AXT1 und AXT2 bezeichnet: AXT1 sitzt mit dem C(1-6)-Ring in der inneren Bindungstasche von A<sub>1</sub>, während sich AXT2 mit seinem C(1-6)-Ring in der inneren Taschen von A<sub>3</sub> befindet.

Die Polyketten der Carotinoide nähern sich bis auf 7 Å an und haben eine fast identische Konformation, sie weichen lediglich 0,3 Å(RMSD) voneinander ab. Die Carotinoide sind bogenförmig und die Endringe sind fast koplanar mit der Polykette, verglichen mit einem dihedralen Winkel von ungefähr -43° in der ungebundenen Form [10].

Die Umgebung des jeweiligen Carotinoides im Protein ist unterschiedlich:

### Die C(1-6)-Endringe

Der C(1-6)-Endring von AXT1 (Abb. 6.3<sup>3</sup>) wechselwirkt über Wasserstoffbrückenbindungen an der Hydroxygruppe (O(3)) mit den Aminosäureresten Gln-46<sub>A1</sub><sup>4</sup> und Asn-54<sub>A1</sub>. Die beiden Tyrosin-Reste Tyr-56<sub>A1</sub> und Tyr-97<sub>A1</sub> positionieren ein Wassermolekül (W1) nur 2,60 Å vom Keto-Sauerstoffatom O(4) entfernt. Dieses Wassermolekül und der Asparigin-Rest Asn-54<sub>A1</sub> sind somit für die Koordination der Ketogruppe verantwortlich. Weitere hydrophile Reste in der Bindungstasche sind Gln-37<sub>A1</sub> und Ser-67<sub>A1</sub>. Desweiteren setzt sich die Bindungstasche aus den hydrophoben Aminosäureresten Val-52<sub>A1</sub>, Ile-65<sub>A1</sub>, Ile-95<sub>A1</sub>, Phe-134<sub>A1</sub> und Phe-136<sub>A1</sub> zusammen.

Die Bindungstasche für den C(1-6)-Endring

<sup>3</sup>Für Abb. 6.3,6.4,6.5,6.6, 6.7 gilt folgende Farbgebung: direkt in Wechselwirkung stehenden Aminosäuren sind orange, weitere polare Reste rot, unpolare Reste grün

<sup>4</sup>Einzelne Aminosäurereste werden hier durch das jeweilige Dreibuchstaben-Kürzel (siehe Anhang B) ihre Position in der Sequenz (nachgestellte Zahl) und das betreffende Protein (Index) eindeutig beschrieben

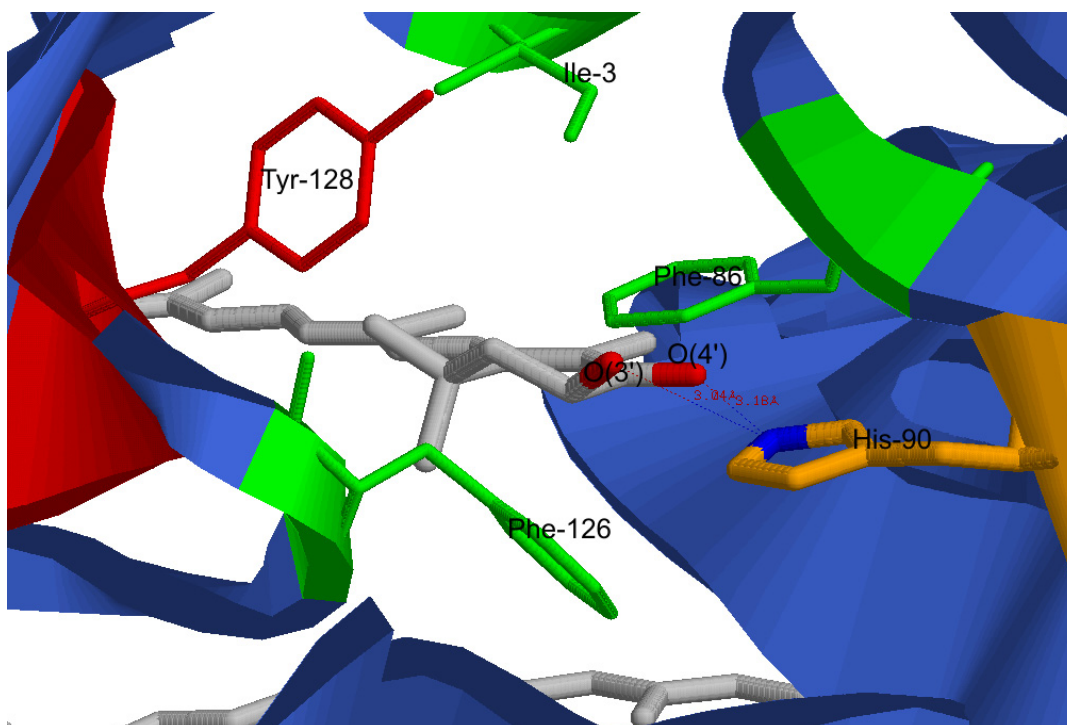


Abb. 6.5.: Der AXT1-C(1'-6')-Endring in der Bindungstasche

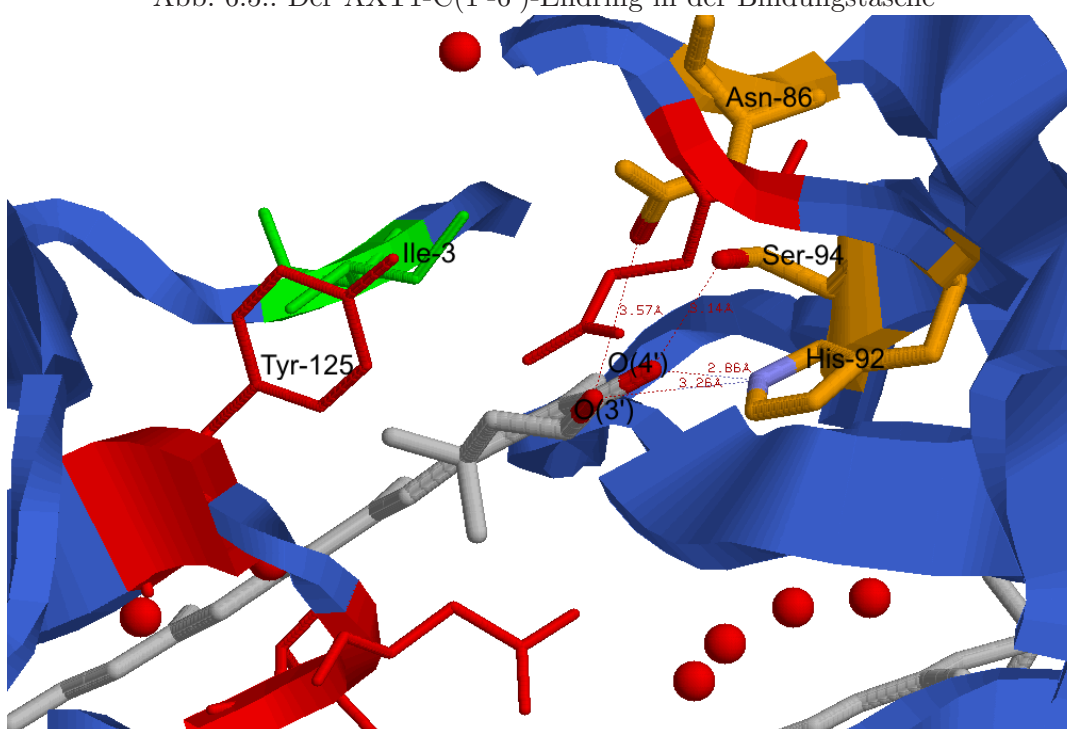


Abb. 6.6.: Der AXT2-C(1'-6')-Endring in der Bindungstasche

von AXT2 (Abb. 6.4) wechselwirkt über Gln-41<sub>A3</sub> mit dem Sauerstoffatom der Hydroxygruppe O(3) und über Thr-64<sub>A3</sub> mit dem Keto-Sauerstoff O(4). Wie auch bei AXT1 wird die Konformation durch ein gebundenes Wassermolekül (W2) stabilisiert. Es befindet sich 2,73 Å vom Keto-Sauerstoff O(4) entfernt und wird durch Wasserstoffbrücken zu Ser-49<sub>A3</sub>, Gln-32<sub>A3</sub> und Tyr-51<sub>A3</sub> an dieser Position festgehalten. Die Reste Ile-76<sub>A3</sub>, Phe-78<sub>A3</sub>, Phe-131<sub>A3</sub>, Phe-133<sub>A3</sub> und Val-62<sub>A3</sub> geben der übrigen Tasche einen hydrophoben Charakter.

### Die C(1'-6')-Endringe

Der C(1'-6')-Endring von AXT1 (Abb. 6.5) befindet sich in einer kleinen Tasche zwischen den beiden Proteineinheiten. Die Sauerstoff-Atome der Keto- und Hydroxygruppe befinden sich in räumlicher Nähe zum  $\epsilon_2$ -Stickstoff des Histidinrestes His-90<sub>A3</sub>, dem einzigen hydrophilen Rest in der Bindungstasche, die sich ansonsten aus den Resten Phe-86<sub>A3</sub>, Phe-126<sub>A1</sub>, Ile-3<sub>A1</sub> und Tyr-128<sub>A1</sub> zusammensetzt. Die Bindungstasche entsteht erst bei der Assoziation der Apoproteine mit dem Carotinoid, strukturelle Vergleiche mit der ungebundenen Form der A<sub>1</sub>-Einheit zeigen, dass sich die Position der taschenbildenden Aminosäurereste zwischen 3,7 Å und 9,5 Å verschiebt [20].

Die Umgebung des C(1'-6')-Endringes von AXT2 (Abb. 6.6) ist ähnlich zu der von AXT1, allerdings ist sie polarer und dadurch weniger stark nach außen abgeschirmt. Für die Koordination der Keto- und Hydroxygruppe ist wieder der  $\epsilon_2$ -Stickstoff eines Histidin-Restes (His-92<sub>A1</sub>) verantwortlich. Zudem wechselwirkt die Ketogruppe (O(4')) mit der OH-Gruppe von Ser-94<sub>A1</sub>, die Hydroxygruppe (O(3')) mit dem  $\delta_1$ -Sauerstoff von Asn-86<sub>A1</sub>. Weitere Reste in der Bindungstasche sind Thr-122<sub>A3</sub>, Asp-123<sub>A3</sub>, Glu-90<sub>A1</sub>, Ile-3<sub>A3</sub> und Tyr-125<sub>A3</sub>.

### Die Polyketten

Die Polyketten (Abb. 6.7) zwischen C(7) und C(7') werden in einer sterisch günstigen Art und Weise von vielen hydrophoben Resten umgeben.

Die zentrale Bindungstasche für die AXT1-Kette besteht aus den Resten Pro-4<sub>A1</sub>, Phe-6<sub>A1</sub>, Val-7<sub>A1</sub>, Tyr-45<sub>A1</sub>, Tyr-124<sub>A1</sub> und Phe-132<sub>A1</sub>. Für AXT2 sieht die Bindungstasche sehr ähnlich aus, sie wird aus den Resten Pro-4<sub>A3</sub>, Phe-6<sub>A3</sub>, Tyr-40<sub>A3</sub>, Ile-93<sub>A1</sub> und Phe-129<sub>A3</sub>.

In beiden Fällen werden die Methylgruppen C(20) und C(20') fest im Protein eingeschlossen. Neben der Ketogruppe sind sie zur Komplexbildung zwingend notwendig.

Zwischen den beiden, nur 7 Å voneinander entfernten Polyketten befinden sich die Aminosäurereste Phe-101<sub>A1</sub>, Pro-104<sub>A1</sub>, Ile-122<sub>A1</sub>, Phe-99<sub>A3</sub>, Pro-102<sub>A3</sub> und Ile-120<sub>A3</sub>.

Wie auch bei den C(1'-6')-Endringen wird die Proteinkonformation durch die gebundenen Carotinoide bestimmt. Im Falle des A<sub>1</sub>-Protomers sind Bewegungen zwischen 3,6 Å und 6,2 Å zu beobachten [20]. Für das A<sub>3</sub>-Protomer lässt sich diese Aussage nicht quantifizieren, da die genaue Tertiärstruktur der ungebundenen Form noch nicht bekannt ist.

### 6.2.3. Erklärung der bathochromen Verschiebung

Aus den durch Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Erkenntnissen über die Bindung der Astaxanthin-Liganden, lässt sich die bathochrome Verschiebung als Folge mehrerer Störungen der Carotinoid-Struktur erklären.

Zum einen sind die Endringe in der gebundenen Form annähernd koplanar mit der Polykette, was den konjugierten Bereich um die C(5-6)- und C(5'-6')-Doppelbindung und die Ketogruppen erweitert und damit den elektronischen Grundzustand des Carotinoids verändert. Die Vergrößerung des

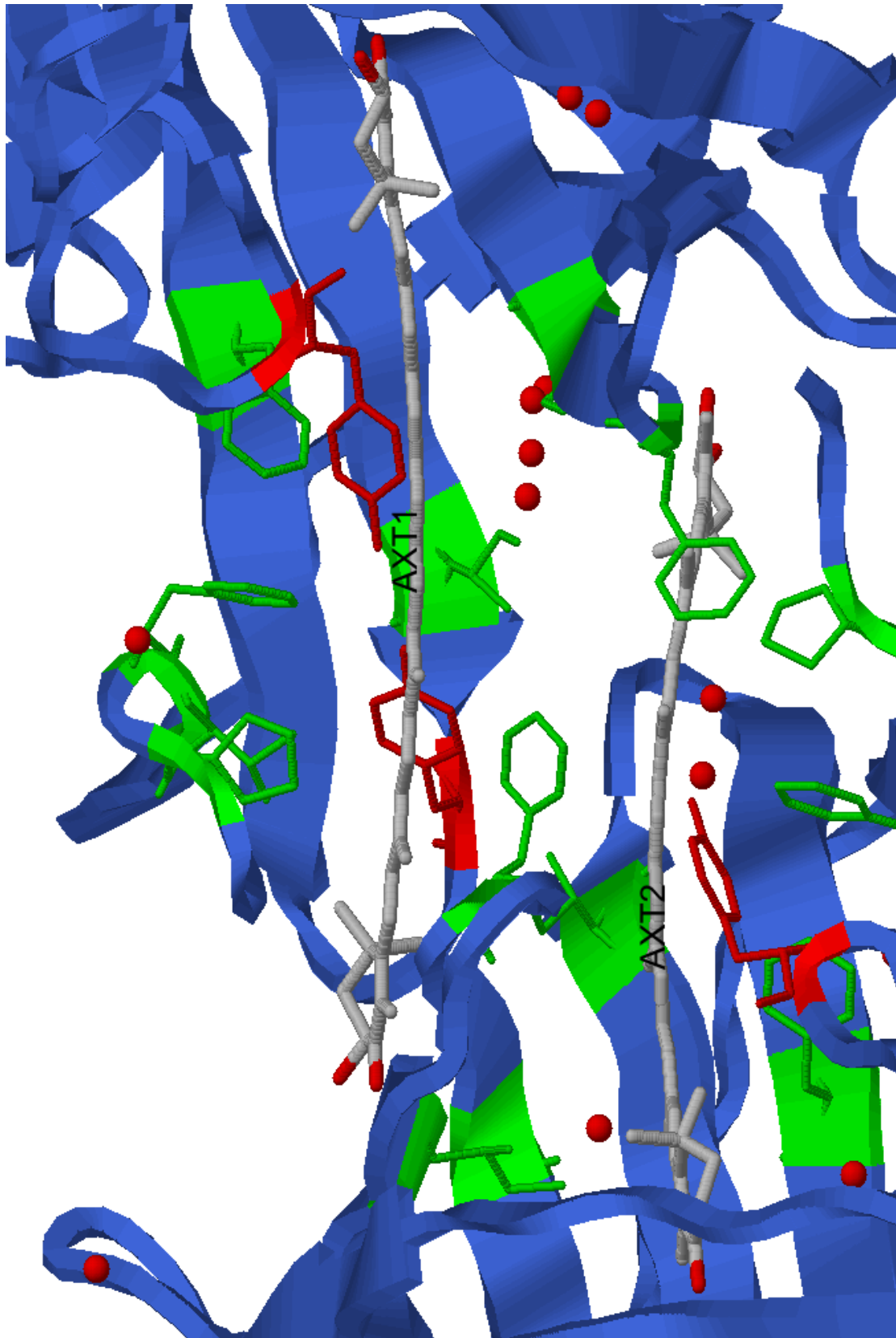


Abb. 6.7.: Die im wesentlichen unpolare Umgebung der Polyenkettien von AXT1 und AXT2

$\pi$ -Elektronensystems erklärt die bathochrome Verschiebung aber nur teilweise [22].

Durch die Wasserstoffbrücken, die zwischen den C(4)-Ketogruppen und den gebundenen Wassermolekülen bzw. zwischen den C(4')-Ketogruppen und den Resten His-92<sub>A1</sub> und His-90<sub>A3</sub> ausgebildet werden kommt es zu einer stärkeren Delokalisierung von Elektronen, die eine weitere bathochrome Verschiebung erklären. Die – nun bewiesene – Existenz der beiden Wassermoleküle stützt also das in [13] angenommene Polarisations-Modell.

Einen zusätzlichen Beitrag zur bathochromen Verschiebung könnte die Proteinumgebung des Chromophors liefern. Das Absorptionsmaximum von freiem Astaxanthin ist in Hexan um 20 nm niedriger als das in Pyridin [14]. Im Protein befindet sich die Polyenkette in räumlicher Nähe von aromatischen Aminosäureresten, was einen bathochromen Effekt durch einen Charge-Transfer-Komplex [49] nahelegt.

Aktuellen quantenchemischen Studien zufolge, hat die leichte Verwindung des Chromophores keine Relevanz für den bathochromen Effekt [26, 25].

## **Teil II.**

### **Ansätze zu artenvergleichenden Untersuchungen**

## 7. Material

### 7.1. Biologisches Material

Die Krebse (*C. pagurus*, *P. bernhardus*, *H. araneus*) stammen aus den Gewässern der deutschen Bucht um Helgoland und wurden mir von der BIOLOGISCHEN ANSTALT HELGOLAND tiefgefroren zur Verfügung gestellt. Die Hummerschalen stammen von Zuchttieren der BIOLOGISCHEN ANSTALT HELGOLAND und wurden nach der Häutung der Tiere gesammelt. Die Riesengarnelen waren ebenfalls Tiefkühlware und wurden über den GLOBUS Supermarkt bezogen.

### 7.2. Reagenzien

Die für die Isolierungsschritte verwendeten Reagenzien waren mindestens von Synthesqualität und wurden von ROTH, MERCK und FISHER SCIENTIFIC bezogen. Für die HPLC-Analysen wurden ausschließlich Lösungsmittel von HPLC-Qualität verwendet. Die zur Beschichtung der NP-Säule verwendete Phosphorsäure (ACROS ORGANICS) war von Analysenqualität.

### 7.3. Puffer

Die für die Arbeit verwendeten Puffer und ihre Herstellungsvorschriften finden sich im Anhang C.

### 7.4. Elektrophoresekammer

Die vertikale SDS-PAGE wurde in einer READY GEL CELL 108 BR (BIORAD) durchgeführt. Die Stromversorgung erfolgte durch ein POWER PACK 200 desselben Herstellers.

### 7.5. pH-Meter

Sämtliche pH-Bestimmungen wurden mit einem pH-Meter 654 (METROHM) durchgeführt. Die Elektrode BLUELINE 12 pH und der Temperaturfühler W2030 sind Produkte der Firma SCHOTT.

### 7.6. HPLC-Apparatur

#### 7.6.1. HPLC-System

Für die HPLC-Analysen wurde ein System bestehend aus einer HPLC PUMP 422 (KONTRON INSTRUMENTS), einem Handinjektor 7125 (RHEODYNE) und einem spektralphotometrischen Detektor Nr. 7328700000 (KNAUER) verwendet.

#### 7.6.2. Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte zunächst über das MULTIFACE 160 der Firma KNOBLOCH und eine selbst geschriebene Datenerfassungssoftware. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde ein SERAI812 Interface (AK MODUL BUS) mit der mitgelieferten Treibersoftware verwendet.

#### 7.6.3. Säulenmaterial

Die RP-18 Säule hatte eine Länge von 150 mm und einen Innendurchmesser von 4,6 mm. Die stationäre Phase bestand aus ULTRASPHERE ODS Material (BECKMAN COULTER) mit einer Partikelgröße von 5  $\mu\text{m}$ . Die HIBAR NP-Säule hatte die Dimensionen 250 mm x 4 mm. Die stationäre Phase bestand aus LICHROSORB SI-60 Material (MERCK) mit einer Partikelgröße von 5  $\mu\text{m}$ .

### 7.7. Zentrifuge

Zum Zentrifugieren von Reaktionsgefäßen wurde eine Tischzentrifuge 5410 (EPPENDORF) verwendet. Das Gerät hat einen Festwinkelrotor für zwölf Reaktionsgefäße und eine fixe Drehzahl von 14 000 rpm.

Das Abzentrifugieren der gefällten Proteine erfolgte in einer Kühlzentrifuge MEGAFUGE 1.0R (HERAEUS) mit variabler Drehzahl bis zu 6000 rpm in 50 mL Zentrifugenröhrchen.

### 7.8. Photometer

Für die Aufnahme von VIS-Spektren wurde ein Spektralphotometer NOVASPEC II (PHARMACIA) verwendet. Es umfasst einen Wellenlängenbereich von 325 nm bis 900 nm. Die Datenerfassung erfolgte mit der Software AK SPECT (AK KAPPENBERG). Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur in Halbmikroküvetten aus PMMA (PLASTIBRAND) aufgenommen.



## 8. Methoden

### 8.1. Präparation der Krustentiere

#### 8.1.1. Präparation der Riesengarnelen

Die tiefgefrorenen Garnelen werden geschält. Sämtliche Schalenbestandteile und Gliedmaßen werden bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren. Das Fleisch kann als Lebensmittel verwendet werden.

#### 8.1.2. Präparation der Hummerschalen

Die Hummerschalen werden unter fließendem kaltem Wasser von Sand und anderen Verunreinigungen befreit. Die Innenseite der Schalen wird durch gründliches Schrubben von der Hypodermis befreit. Die Schalen werden in kleine Teile zerbrochen und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

#### 8.1.3. Präparation der Krebse

Die Krebse (*C. pagurus*, *H. araneus*) werden unter fließendem Wasser gründlich abgescrubbt und eventuell vorhandene Seepocken abgeschlagen. Schwanz und Gliedmaßen werden abgebrochen, dann wird der Panzer geöffnet, indem man die Oberseite vom Schwanzansatz her vom Beinansatz abhebelt. Kiemen und innere Organe werden aus dem Panzer geschabt und gesondert eingefroren, die Schalen und Gliedmaßen werden durch Schrubben von Fleischresten und Hypodermis befreit, in kleine Teile gebrochen und bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

### 8.2. Extraktion von Crustacyanin aus Schalenmaterial

Die Extraktionsmethoden sind in Anlehnung an die Literatur [89, 90] konzi-

piert, wurden allerdings geringfügig an die mir zur Verfügung stehenden Gegebenheiten angepasst. So musste ich unter anderem die vorgesehene Kugelmühle durch einen Küchenmixer ersetzen. Auch habe ich die gefällten Proteine per Zentrifugation aufgefangen, da anfängliche Filtrationsversuche große Ausbeuteverluste und den Eintrag von Filtriermittel in die Proben mit sich brachten.

#### 8.2.1. Extraktion aus Garnelenschalen

##### Herstellung eines Rohextraktes

Etwa 120 g Garnelenschalen werden mit einem Liter kaltem BT-Puffer stoßweise im Mixer zerkleinert. Dabei ist zu beachten, dass es zu keiner Wärmeentwicklung kommt. Der Ansatz wird für 48 h bei 5 °C extrahiert. Dann filtriert man über Celite ab, fängt das Filtrat auf und suspendiert den Filterkuchen in 2 L EDTA-Puffer und extrahiert erneut 48 h bei 5 °C, filtriert wieder über Celite ab und vereinigt die Rohextrakte. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis die überstehende Pufferlösung nur noch schwach blau gefärbt bleibt. Der Filterkuchen wird dann verworfen.

##### Ammoniumsulfatfällung

Durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (300 g/L; ca. 50% Ammoniumsulfatsättigung) werden die Proteine aus dem Rohextrakt gefällt. Die gefällten Proteine werden bei 0 °C und 6000 rpm 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt, die hellblauen Pellets werden in wenig Überstand resuspendiert, vereinigt und

erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der gesammelte Überstand wird 20 min bei 0 °C und 6000 rpm zentrifugiert, der nun verbleibende Überstand wird verworfen, mit den Pellets wird wie oben verfahren.

Das gefällte Protein wird in etwa 150 mL Phosphat-Puffer aufgenommen und erneut wie oben gefällt und aufgearbeitet.

Das rohe Protein wird unter 50%iger Ammoniumsulfatlösung bei 5 °C aufbewahrt

### 8.2.2. Extraktion aus Hummerschalen

#### Herstellung eines Rohextraktes

Etwa 30 g Hummerschalen (*H. gammarus*) werden mit 200 mL kaltem BT-Puffer stoßweise im Mixer zerkleinert. Dabei ist zu beachten, dass es zu keiner Wärmeentwicklung kommt. Der Ansatz wird abfiltriert und das Filtrat aufgefangen. Den Filterkuchen suspendiert man in 1 L EDTA-Puffer und extrahiert über Nacht bei 5 °C. Der Rohextrakt wird abfiltriert, der Filterkuchen erneut in 1 L EDTA-Puffer suspendiert und im Kalten für weitere 24 h extrahiert. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis die überstehende Pufferlösung nur noch schwach blau gefärbt bleibt. Der Filterkuchen wird dann verworfen.

#### Ammoniumsulfatfällung

Die Fällung erfolgt wie in Abschnitt 8.2.1 beschrieben. Das rohe Protein wird unter 50%iger Ammoniumsulfatlösung bei 5 °C aufbewahrt

### 8.2.3. Extraktion aus Krebschalen

#### Herstellung eines Rohextraktes

Etwa 30 g Krebschalen (*H. araneus*) werden mit rund 200 mL kaltem BT-Puffer stoßweise im Mixer zerkleinert. Dabei ist zu beachten, dass es zu keiner Wärmeentwicklung kommt. Der Ansatz wird abfiltriert und das Filtrat aufgefangen. Den Filterkuchen suspendiert

man in 1 L EDTA-Puffer und extrahiert über Nacht bei 5 °C. Der Rohextrakt wird abfiltriert, der Filterkuchen für eventuellen weitere Versuche kalt aufbewahrt.

#### Ammoniumsulfatfällung

Die Fällung erfolgt wie in Abschnitt 8.2.1 beschrieben. Das rohe Protein wird unter 50%iger Ammoniumsulfatlösung bei 5 °C aufbewahrt

### 8.3. Vorprobe auf Thermochromie

Den Rohextrakten werden Aliquote von etwa 1 mL entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und im Wasserbad oder Heizblock eine Minute auf 70 - 80 °C erhitzt.

### 8.4. Gelelektrophorese

#### 8.4.1. Rohextrakte

Zur Untersuchung der Reinheit der einzelnen Fällungen und zur groben Abschätzung der Molekulargewichte wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Verwendet wurde ein Trennsystem mit diskontinuierlichem pH-Verlauf nach LAEMMLI [39, 85]

Das vorgefertigte, 1 mm starke Gel setzte sich aus einem 12,5%igen Trenngel, pH 8,8, und einem 3%igen Sammelgel, pH 6,8, zusammen und bot Raum für 10 Proben.

#### Probenvorbereitung

Eine Spatelspitze der Proteinfällungen wurde in etwa 0,5 mL Phosphatpuffer aufgenommen. 30 µL der Proteinprobe wurden daraufhin mit 10 µL des Probenpuffers (siehe Abschnitt C.5) versetzt und für 5 min bei 100 °C denaturiert.

## Elektrophorese

Pro Trennspur werden 15  $\mu\text{L}$  der denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 120 V für etwa 1,5 h durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front die Gelunterkante erreicht hat.

## Färbung

Nach dem Ende der Elektrophorese wird das Gel vorsichtig aus dem Gelträger genommen und dreimal für jeweils 5 min mit etwa 100 mL destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wird dann mit der Färbelösung (BioSafe Coomassie, Fa. BIORAD) bedeckt und 45 min gefärbt. überschüssige Färbelösung wird wie eben beschrieben durch dreimaliges Waschen entfernt. Das Sammelgel wird vom Trenngel mit einem Skalpell entfernt und entsorgt, das Trenngel zur Dokumentation unter destilliertem Wasser aufbewahrt.

## 8.5. UV-VIS-Spektroskopische Untersuchungen

Von den folgenden Lösungen wurden Spektren aufgenommen:

- Rohextrakt (Riesengarnele)
- Rohextrakt (*H. gammarus*)
- Carotinoidextrakt (*C. pagurus*)

Thermochromes Verhalten wurde beim Hummerextrakt untersucht.

### 8.5.1. Thermochromie

Zur Untersuchung der Thermochromie von Crustacyanin aus Hummerschalen wurden drei Spatelspitzen gefälltes Protein (3. Fällung) in 5 mL Phosphatpuffer aufgenommen. Die Lösung wurde in drei Aliquote á 1,5

mL aufgeteilt. Ein Aliquot blieb unbehandelt, das zweite wurde im 70 °C heißen Wasserbad gerade solange erhitzt, bis ein Farbumschlag zu erkennen war und dann auf Raumtemperatur abgekühlt, das dritte Aliquot wurde 5 min bei 100 °C denaturiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt.

Von allen drei Aliquoten wurden Spektren im Bereich von 325 nm - 800 nm gegen reinen Phosphatpuffer aufgenommen.

## 8.6. Extraktion von Carotinoiden aus Schalenmaterial

Die Schalen werden im Mixer zerkleinert, in einem Erlenmeyerkolben mit Aceton bedeckt und für mehrere Tage im Dunklen bei 5 °C extrahiert. Der Acetonextrakt wird abfiltriert und im Wasserstrahlvakuum auf etwa ein Zehntel eingeeengt und in einem Schütteltrichter zur Extraktion der Carotinoide mit demselben Volumen Hexan versetzt. Die Hexanphase wird entfernt und der Prozess solange wiederholt bis die Hexanphase fast klar bleibt. Verbliebene Carotinoide werden mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase entfernt. Die organischen Phasen werden vereinigt, bis fast zur Trockne eingeeengt, zur Aufbewahrung in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 5 °C gelagert.

## 8.7. HPLC-Vorversuche

### 8.7.1. NP-Methode

#### Mobile Phase 1

10% v/v Dichlormethan  
0,8% v/v Propan-2-ol  
auf 100% n-Hexan

#### In situ-Beschichtung der stationären Phase

Zunächst wird die HPLC-Anlage ohne Säule aufgebaut und mit ca. 6 mL Aceton gespült

[58]. Die Säule wird eingebaut und das herstellerseitig enthaltene Lösungsmittel Heptan zuerst mit ca. 30 mL Aceton, dann mit dem selben Volumen Methanol ausgespült. Zur Beschichtung werden 30 mL 1% ortho-Phosphorsäure in Methanol mit einem Fluss von 0,5 mL/min durch die Säulen gepumpt. Das Methanol wird mit etwa 30 mL Aceton entfernt und die Säule für 3 h mit der mobilen Phase equilibriert [76]. Mit diesem Phasensystem wurden noch keine Testchromatogramme aufgenommen.

### 8.7.2. RP-Methode

#### Mobile Phase 2

65% v/v Acetonitril  
25% v/v Dichlormethan  
10% v/v Methanol

#### Detektortest

Hexan wird einem Fluss von 2,0 mL/min durch das System gepumpt, der Detektor

wird auf eine Wellenlänge von 475 nm eingestellt. Um die Detektierfähigkeit des Detektors zu überprüfen werden 100  $\mu$ L des Schalenextraktes aus Abschnitt 8.6 injiziert.

#### Reproduzierbarkeit

Versuche zur Reproduzierbarkeit der HPLC-Läufe wurden mit einem Karottenextrakt (siehe Anhang C.6) durchgeführt. Hexan wird mit einem Fluss von 1,0 mL/min durch das System gepumpt, der Detektor wird auf eine Wellenlänge von 475 nm eingestellt. 100  $\mu$ L des Karottenextraktes werden injiziert.

#### Trennversuch

Die mobile Phase 2 wird mit einem Fluss von 1,0 mL/min durch das System gepumpt, der Detektor wird auf eine Wellenlänge von 475 nm eingestellt. 100  $\mu$ L des Carotinoid-Extraktes aus *C. pagurus* werden injiziert.

## 9. Ergebnisse und Diskussion

### 9.1. Proteinisolierung

#### 9.1.1. Riesengarnele

Aus den Schalen der Riesengarnele ließ sich ein sehr schwach gefärbter Rohextrakt (Spektrum s. Abb. 9.6) gewinnen, der bei der Ammoniumsulfatfällung einen blassblauen Niederschlag lieferte. (s. Abb. 9.2 (a))

#### 9.1.2. Hummerschalen

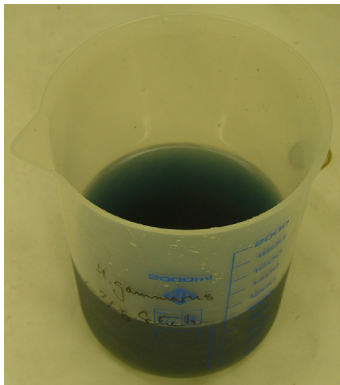


Abb. 9.1.: Hummerschalen-Rohextrakt

Aus den Hummerschalen ließ sich ein intensiv blau gefärbter Rohextrakt gewinnen (s. Abb. 9.1, Spektrum s. Abb. 9.5), der bei der Ammoniumsulfatfällung einen tiefblauen Niederschlag lieferte. (s. Abb. 9.2 (b))

#### 9.1.3. Krebschalen

Aus den Schalen der Seespinne ließ sich ein schwach gräulicher Rohextrakt gewinnen, der bei der Ammoniumsulfatfällung einen grau-weißen Niederschlag lieferte.

### 9.2. Vorproben auf Carotinproteine

#### 9.2.1. Riesengarnele

Die hellblaue Lösung färbt sich im heißen Wasserbad schwach orange, es sind also thermochrome Proteine enthalten.

#### 9.2.2. Hummerprotein

Deutlicher ist der Farbumschlag beim Hummerprotein zu sehen (Abb. 9.3), die blaue Lösung färbt sich im heißen Wasserbad ebenfalls orange, es sind also auch hier thermochrome Proteine isoliert worden.

#### 9.2.3. Seespinne

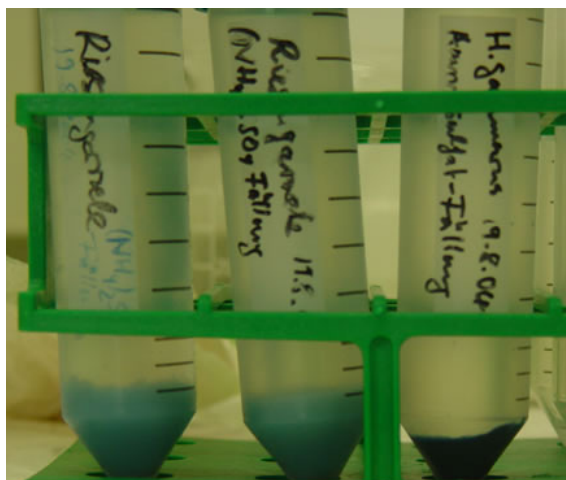
Weder vor noch nach dem Erhitzen ist eine Färbung der Lösung ersichtlich.

### 9.3. SDS-PAGE

#### 9.3.1. Rohextrakte

Die Proben im einzelnen: erste Fällung des Rohextraktes von *H. araneus* (HYA I, Spur 2), zweite Fällung des Riesegarnelenextraktes (PRA II, Spuren 3, 4), erste (HGA I, Spur 5), zweite (HGA II, Spuren 6, 7) und dritte (HGA III, Spuren 8, 9) Fällung des Extraktes von *H. gammarus*. Als Marker (Spur 1) wurde eine vorgefärbte Proteinmischung (KALEIDOSCOPE PRESTAINED STANDARDS, BIORAD Kat.Nr. 161-0324) verwendet.

Die starke Verbreiterung der einzelnen Spuren ist wahrscheinlich auf einen hohen Restgehalt von Ammoniumsulfat zurückzuführen, sie erschwert die Interpretation des gefärbten Gels, da die Markerspür (Spur 1) zur Seite gedrängt ist und dadurch keine scharfen Banden zu erkennen sind.



(a) (b)

Abb. 9.2.: gefällte Schalenproteine

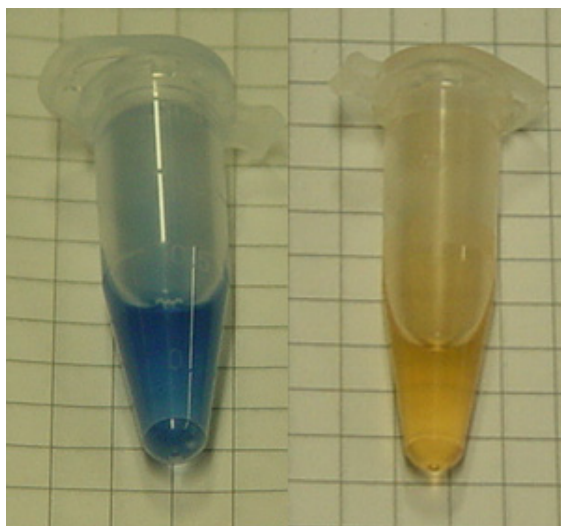
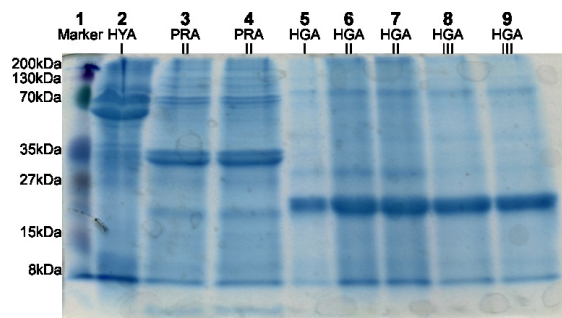


Abb. 9.3.: Vorprobe auf Thermochromie

Abb. 9.4.: SDS-PAGE der Rohextrakte  
24.08.04

Sämtliche Rohextrakte von *H. gammarus* weisen eine deutliche Bande im Bereich zwischen 25 kDa und 15 kDa auf. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Apoproteine von Crustacyanin, die eine Molmasse von etwa 20 kDa besitzen [67, 89]. Interessant ist auch, dass die freien Carotinoide mit der Bromphenolblau-Front mitgewandert sind und sehr schwache orangefarbene Banden an der Gelunterkante gebildet haben. Im Bild sind sie jedoch nicht zu erkennen, da sie beim Waschvorgang mit ausgespült wurden. Eine fortschreitenden Aufreinigung lässt sich daran erkennen, dass die schwache Bande bei etwa 27 kDa in der dritten Fällung (Spuren 8, 9) verschwunden ist. Weitere Verunreinigungen sind im Bereich über 70 kDa zu sehen.

Der Riesengarnelenextrakt weist eine deutliche Doppel-Bande bei etwa 35 kDa auf und eine schwächere auf der Höhe, der Banden von *H. gammarus*. Bei den Spuren 3 und 4 war nach Ablauf der Elektrophorese keine Carotinoid-Bande zu sehen. Es ist daher möglich, dass die Carotinoproteine der Riesengarnele nicht vollständig denaturiert wurden und noch immer als Aggregat vorliegen. Studien an den Carotinoproteinen des Roten Sumpfkrebse *Procambarus clarkii* bestätigen Aggregate von 40 kDa [23].

Der Rohextrakt von *H. araneus* (Spur 2) enthält mit Abstand am meisten Einzelkomponenten. Die meisten davon weisen ein

Molekulargewicht über 50 kDa. Allerdings zeigt sich auch eine schwache Bande zwischen 35 kDa und 27 kDa und eine weitere zwischen 15 kDa und der Elektrophoresefront.

Es ist fraglich, ob überhaupt Typ A Carotinoproteine aus den Seespinnenschalen isoliert werden konnten. Da es über die Pigmentierung adulter Seespinnen keine verwertbare Literatur gibt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob der Panzer überhaupt Carotinoproteine enthält, oder ob diese beim Versand der Krebse beschädigt wurden.

#### 9.4. UV-VIS-Spektren

Die Spektren der Rohextrakte zeigen breite Maxima bei 612 nm (*H. gammarus*) bzw. 590 nm (Riesengarnele) und einen starken Absorptionsanstieg in den Ultravioletten Bereich. Der  $\lambda_{max}$ -Wert beim Hummer liegt genau zwischen den Literaturwerten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Crustacyanin (585 nm bzw. 632 nm) [19], es ist daher davon auszugehen, dass es sich hier um eine Mischung aus beiden Proteinformen handelt. Das abgeschnittenen Maximum im UV-Bereich liegt außerhalb des Messbereiches des Photometers, es ist wahrscheinlich auf Proteinabsorptionen von Verunreinigungen und Crustacyanin zurückzuführen.

Bei der Riesengarnele entspricht der  $\lambda_{max}$ -Wert dem Literaturwert von  $\beta$ -Crustacyanin. Das abgeschnittene Maximum ist ebenfalls auf weitere Proteinabsorptionen zurückzuführen.

Das Spektrum des Carotinoideextraktes aus *C. pagurus* zeigt ein Maximum bei 473 nm, der Literaturwert für Astaxanthin in Aceton liegt bei 480 nm [11]. Da es sich aber, wie erst HPLC-Chromatogramme zeigen, um ein Carotinoidegemisch handelt, besitzt dieser  $\lambda_{max}$ -Wert nur eine geringe Aussagekraft.

#### 9.5. Thermochromie

Es ist schön zu erkennen, wie das Crustacyanin-Maximum beim Erhitzen verschwindet, während das Carotinoide-Maximum zunimmt.

#### 9.6. HPLC-Vorversuche

##### 9.6.1. Detektortest

Der Detektor spricht ohne Probleme auf die Carotinoide in der Probelösung an.

##### 9.6.2. Reproduzierbarkeit

Die Retentionszeiten des Hauptpeaks sind sehr stabil, größte Fehlerquelle dürfte in Synchronisation von Handinjektion und Datenerfassung liegen.

##### 9.6.3. Trennversuch

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich wird, sind im Schalenextrakt eine Vielzahl von Komponenten enthalten. Eine verbesserte Auftrennung und die Identifizierung der Einzelkomponenten war mir aus zeitlichen Gründen noch nicht möglich.

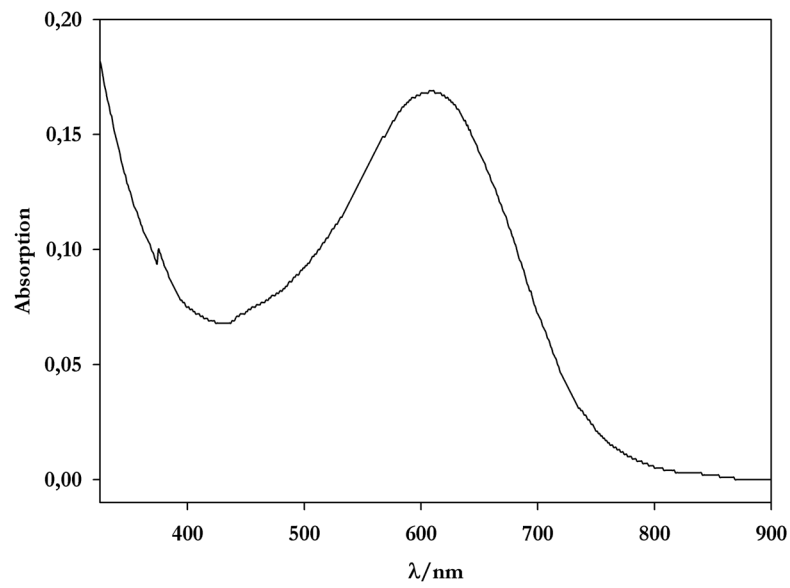
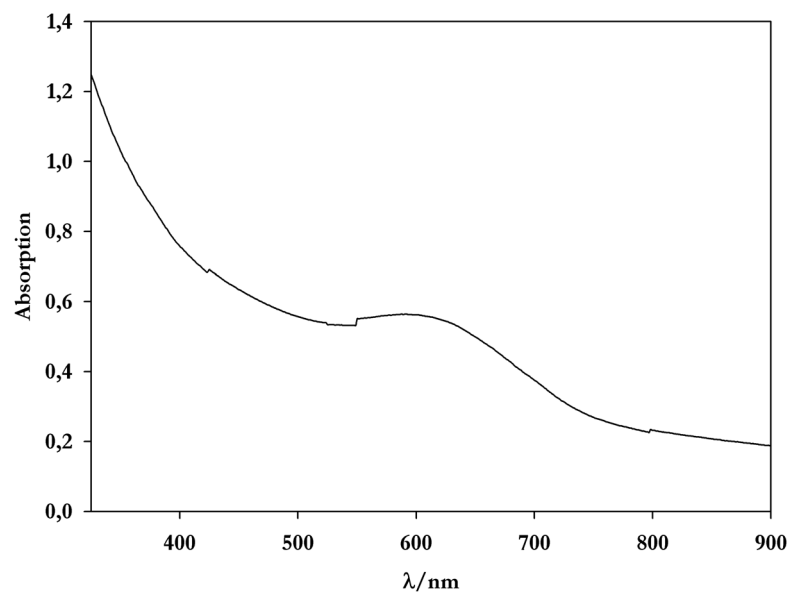
Abb. 9.5.: Proteinextrakt aus *H. gammarus*

Abb. 9.6.: Proteinextrakt aus der Riesengarnele



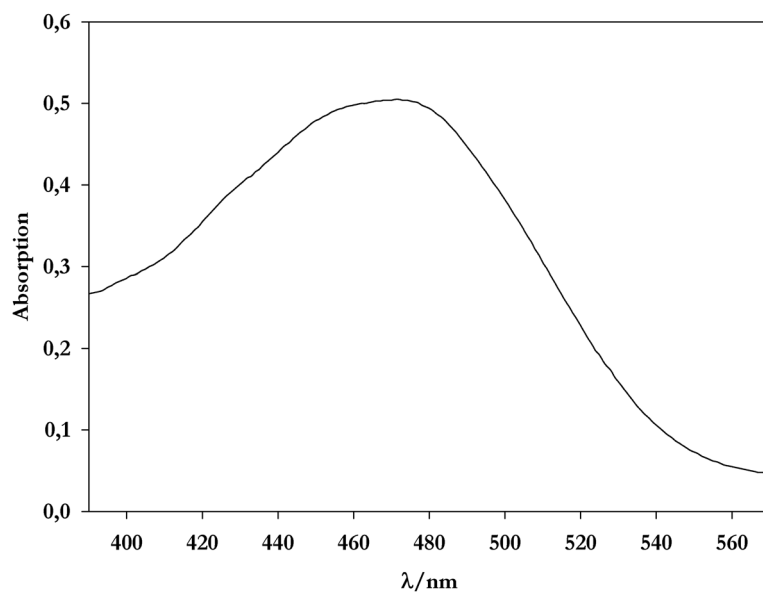
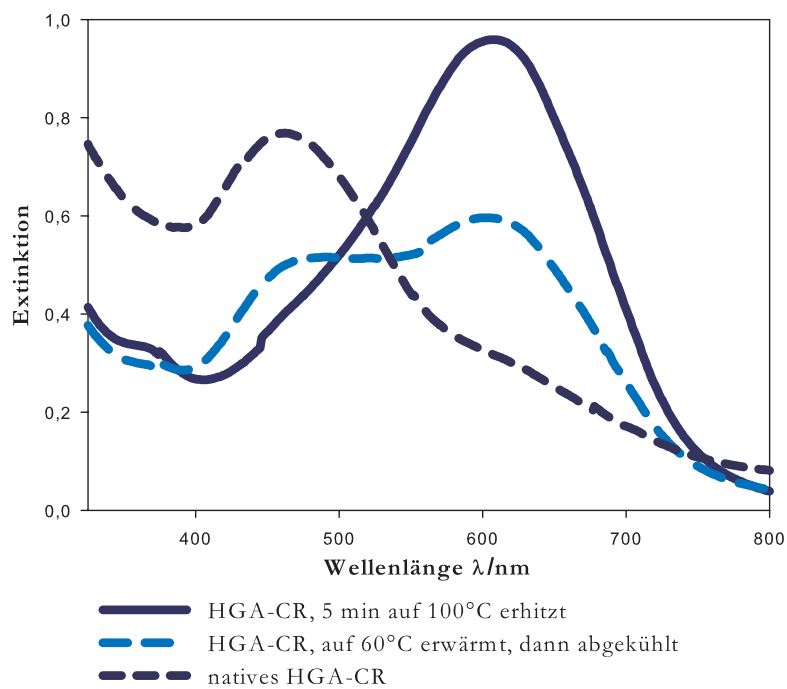
Abb. 9.7.: Carotinextrakt aus *C. pagurus*

Abb. 9.8.: Thermochromie von Hummer-Crustacyanin

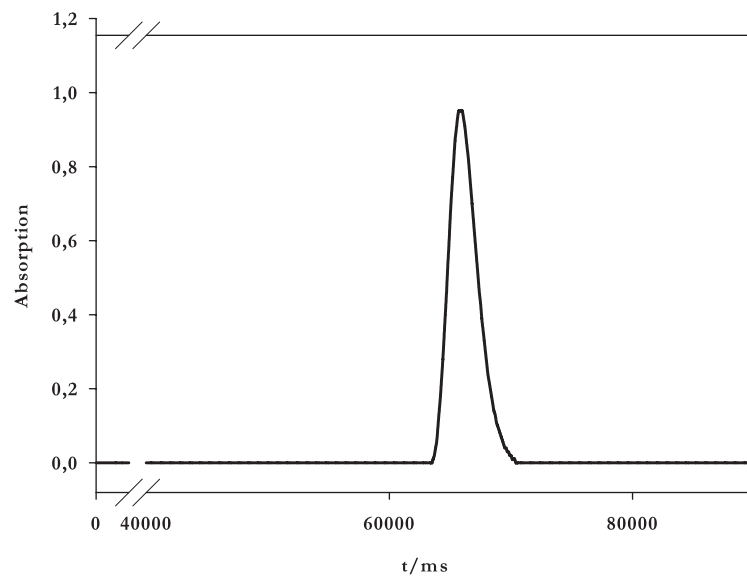


Abb. 9.9.: Detektortest

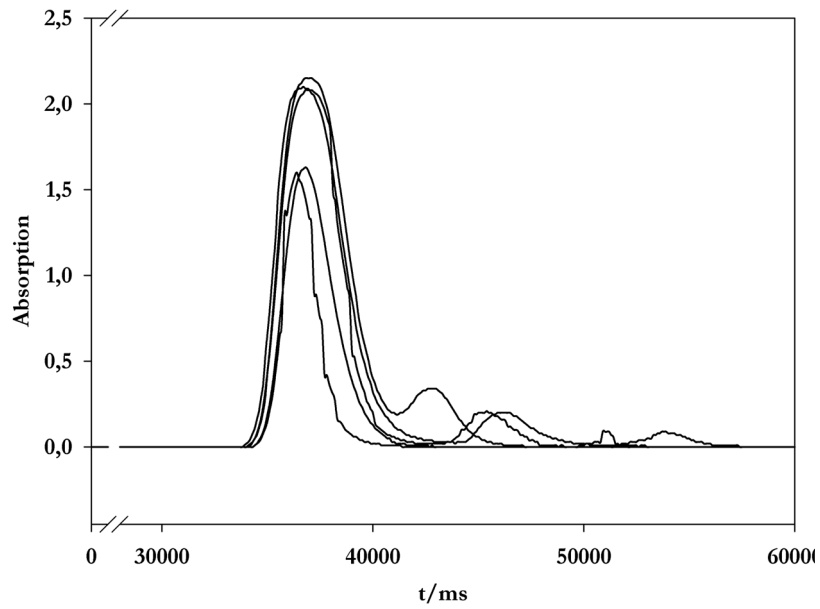


Abb. 9.10.: Reproduzierbarkeit von Chromatogrammen

## 10. Fazit und Ausblick

Die Betrachtung des Phänomens der „errötenden Krustentiere“ hat gezeigt, dass es sich hierbei um eine komplexe Interaktion von Astaxanthin und einem Protein handelt. Im ersten Teil der Arbeit konnte ich zeigen, wie dieser Mechanismus in seinen strukturellen Details funktioniert, und welche Anstrengungen es die Wissenschaft im Verlauf von mehr als 120 Jahren gekostet hat, diese Details zu entschlüsseln. Besonders faszinierend fand ich dabei zu sehen, wie der Erkenntnisstand mit den technischen und methodischen Fortschritten mitgewachsen ist.

Der experimentelle Teil meiner Arbeit steht erst am Anfang, dennoch kann ich einige Ergebnisse präsentieren:

Mir ist es gelungen, Crustacyanin aus Hummerschalen zu isolieren und über sein Absorptionsspektrum und seine Molmasse zu identifizieren, sowie sein thermochromes Verhalten zu zeigen.

Ein Crustacyanin-ähnliches Protein konnte aus den Schalen der Riesengarnele gewonnen werden, sein Absorptionsmaximum liegt bei 590 nm, die Molekulargewichtsbestimmung zeigte Banden in den Größenordnungen von 20 und 35 kDa. Vorproben zeigten ein thermochromes Verhalten, ähnlich dem von Hummer-Crustacyanin.

Im ersten Anlauf konnten keine nachweisbaren Mengen eines intakten Pigmentproteins aus der Seespinne *Hyas araneus* isoliert werden. Der Rohextrakt bestand allerdings aus einer Vielzahl von Komponenten, deren Identität noch zu klären ist.

Aus den Schalen des Taschenkrebses *Can-*

*cer pagurus* konnte ein Mehrkomponenten-Carotinoidgemisch isoliert werden, das bei 473 nm ein Absorptionsmaximum zeigt.

Für den weiteren Fortgang meiner experimentellen Untersuchungen strebe ich eine Aufreinigung der Carotinoproteine an – durch Elektrophorese oder Ionenaustausch-Chromatographie. Desweiteren möchte ich untersuchen, inwieweit sich Unterschiede zwischen den Carotinoproteinen von *H. gammarus* und der Riesengarnele finden lassen. Der optimale Weg dafür wäre eine Sequenzierung der Proteine und ein anschließender Sequenzvergleich. Die Kenntniss der Sequenz würde auch die Anwendung bioinformatischer Modellierungsmethoden ermöglichen, mit denen man ein erstes Bild der unerforschten Proteine gewinnen könnte.

Da die Sequenzierung ein sehr aufwändiger Weg ist, hoffe ich auch schon mit einfacheren Mitteln Ergebnisse zu erhalten. Dabei strebe ich elektrophoretische Studien sowie eine quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung an.

Neben den Untersuchungen der Proteine möchte ich meine HPLC-Studien an den Carotinoiden vorantreiben. Hier sind weitere Trennexperimente mit beiden Phasensystemen, sowie die Bestimmung der Einzelkomponenten durch spektroskopische Methoden vorgesehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die hoffentlich noch folgenden werde ich im Rahmen einer Projektarbeit beim Wettbewerb „Jugend forscht“ 2005 vorstellen.

## Danksagungen

Eine derart umfangreiche Arbeit wäre ohne die Hilfe Vieler nicht zu realisieren gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuungslehrerin **Frau Nickel**, die dieser Arbeit nicht nur über einige bürokratische Hürden geholfen hat, sondern auch mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich all denen danken, die in vielen Gesprächen, Diskussionen und Kursstunden die fachliche Basis für diese Arbeit gelegt haben oder mir bei Problemen und fachlichen Fragen zur Seite gestanden haben:

**Dr. Judith Günther** und **Dr. Andrea Schafferhans** für den großartigen Structural Genomics-Kurs. **Prof. Naomi Chayen** (Imperial College, London) und **Prof. Peter Zalgalsky** (Royal Holloway, University of London) für wertvolle Hinweise zur Isolierung und Aufarbeitung der Crustacyanine. **Dr. Bernhard Müller** (CIBA SC, Basel) für wertvolle Hinweise bei technischen Problemen der HPLC-Analysen. **Dr. Thomas Wendt** (explO, Heidelberg) für die Möglichkeit am explO zu arbeiten. **Dr. Thomas Schutz** (LSL, Heidelberg), **Dr. Karsten Pelz** für viele anregende Diskussionen. **Herrn Strauch** für die Unterstützung bei der anfänglichen Datenerfassung. **Wolfgang Tresser** für die technischen Informationen zu HPLC-Komponenten

Ein ganz großes Dankeschön gilt – auch wenn der praktische Teil erst am Anfang steht – all denen, die durch Spenden die experimentelle Arbeit erst möglich gemacht haben:

Allen voran **Christian Steiner** (Fischer Scientific) für die großzügige Spende fast aller verwendeten Chemikalien und **Olaf Goemann** (Biologische Anstalt Helgoland) für die Spende der Krustentiere. Desweiteren **Margit Tenhaeff** und **Ralf Althaus** (Eppendorf) für die Spende einer Pipette und diverser Verbrauchsmaterialien, **Wolfgang Knappek** (Schott-Geräte GmbH) für die Spende einer pH-Elektrode und eines Temperatursensors, **Günter van Bonn** (Beckman Coulter) für die Spende einer HPLC-Säule und vieler HPLC-Ersatzteile und -Verbrauchsmaterialien, **Dr. Christa Jansen** (Merck KGaA) für die Spende einer HPLC-Säule, **Michael Schlüsener** (Universität Duisburg-Essen) für die Spende einer HPLC-Säule und der **BASF AG** für die Spende einer Zentrifuge und diverser Chemikalien.

Dem SWR2 danke ich für das ARD Nachtkonzert, meinem ständigen Begleiter während der Niederschrift.

Und, last but not least, möchte ich mich bei **meinen Eltern**, besonders **meiner Mutter**, für ihre immerwährende Unterstützung, die vielen kritischen Anregungen und das Korrekturlesen bedanken.

Mit freundlicher Unterstützung von



## **Teil III.**

### **Verzeichnisse und Anhänge**

## Literaturverzeichnis

- [1] ÅKERSTROM, B., FLOWER, D. und SALLIER, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 1–8 (2000)
- [2] ASSELBORN, W., JÄCKEL, M. und RISCH, K., *Chemie heute*, Schroedel Verlag (1998)
- [3] AUTOR UNBEKANNT, *P. monodon*, [http://www.seafarmers.com.au/images/pics/prawn\\_product.jpg](http://www.seafarmers.com.au/images/pics/prawn_product.jpg) (2004)
- [4] BECKER, H. ET AL., *Organikum*, Wiley-VCH, 21. Aufl. (2001)
- [5] BERMAN, H. ET AL., *Nucl. Acids. Res.* **28**(1), 235–242 (2000)
- [6] BERNSTEIN, H., *Trends in Biochemical Sciences* **25**(9), 453–455 (2000)
- [7] BLISS, D., *Shrimps, Lobsters and Crabs*, Columbia University Press (1982)
- [8] BÖRSCH-SUPAN, P., *Vom Krustentier zum Kunststoff - Herstellung und Optimierung von Werkstoffen aus Hummerschalen*, Wettbewerbsarbeit Jugend forscht (2003)
- [9] BÖRSCH-SUPAN, P., *Akademie Roßleben Kurs 7.2 - Structural Genomics*, Kursmitschrift (2004)
- [10] BRITTON, G., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1B*, Kap. 2, S. 13, Birkhäuser (1995)
- [11] BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H., *Isolation and Analysis, Carotenoids*, Bd. 1A, Birkhäuser (1995)
- [12] BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H., *Carotenoids Handbook*, Birkhäuser (2004)
- [13] BRITTON, G. ET AL., *Pure Appl. Chem.* **69**(10), 2075–2084 (1997)
- [14] BUCHWALD, M. und JENCKS, W., *Biochem.* **7**(2), 834–843 (1968)
- [15] BUCHWALD, M. und JENCKS, W., *Biochem.* **7**(2), 844–859 (1968)
- [16] CHAYEN, N., GORDON, E. und ZAGALSKY, P., *Acta Cryst.* **D52**(1), 156–159 (1996)
- [17] CHAYEN, N. ET AL., *Acta Cryst.* **D52**, 409–410 (1996)
- [18] CHAYEN, N. ET AL., *Acta Cryst.* **D56**(8), 1064–1066 (2000)
- [19] CHAYEN, N. ET AL., *Acta Cryst.* **D59**, 2072–2082 (2003)
- [20] CIANCI, M. ET AL., *Acta Cryst.* **D57**, 1219–1229 (2001)
- [21] CIANCI, M. ET AL., *PNAS* **99**(15), 9795–9800 (2002)
- [22] CLAYDEN, J. ET AL., *Organic Chemistry*, Oxford University Press (2001)
- [23] CREMADES, O. ET AL., *Food Chemistry* **82**, 559–566 (2003)
- [24] DELLISANTI, C. ET AL., *FEBS Letters* **544**, 189–193 (2003)
- [25] DURBEEJ, B. und ERIKSSON, L., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**(16), 4190–4198 (2004)
- [26] DURBEEJ, B. und ERIKSSON, L., *Chem. Phys. Letters* **375**, 30–38 (2003)
- [27] DYER, M., *J. mar. biol. Ass. U.K.* **65**, 195–201 (1985)

- [28] FALBE, J. und REGITZ, M., *CD Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, 9. Aufl. (1995)
- [29] FLOWER, D., NORTH, A. und SANSOM, C., *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9–24 (2000)
- [30] FOCILLON, *Comp. Rend. Soc. Biol.* **T. 33**, 384–385 (1851)
- [31] GARATE, A. ET AL., *Biochim. Biophys. Acta* **881**, 446–455 (1986)
- [32] GERRITSEN, V., *Protein Spotlight* (26) (2002)
- [33] GORDON, E. ET AL., *Acta Cryst.* **D57**(9), 1230–1237 (2001)
- [34] GREHN, J. und KRAUSE, J., *Metzler Physik*, Schroedel Verlag (1998)
- [35] GÜNTHER, J. ET AL., in *Dokumentation zur Akademie Roßleben 2004-7*, Bildung und Begabung e.V., Bonn - Bad Godesberg (2004)
- [36] HABASH, J. ET AL., *Acta Cryst.* **D60**, 493–498 (2004)
- [37] HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, 3. Aufl. (1987)
- [38] HOISCHEN, D. ET AL., *Bioorganic Chemistry* **26**(6), 365–374 (1998)
- [39] HOLTZHAUER, M., *Biochemische Labormethoden*, Springer Verlag, 3. Aufl. (1997)
- [40] JANSEN, F. ET AL., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **113**(12), 552–562 (1994)
- [41] JENCKS, W. und BUTEN, B., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 511–520 (1964)
- [42] KEEN, J. ET AL., *Eur. J. Biochem.* **197**(2), 407–417 (1991)
- [43] KEEN, J. ET AL., *Eur. J. Biochem.* **202**, 31–40 (1991)
- [44] KOHLER, B., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1B*, Kap. 1, S. 1, Birkhäuser (1995)
- [45] KRUKENBERG, C., *Vergleichend-Physiologische Studien*, Bd. II.3, Carl Winter's Universitätsbuchhandlung (1882)
- [46] KUHN, R. und KÜHN, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **5**(11), 957 (1966)
- [47] KUHN, R. und KÜHN, H., *Eur. J. Biochem.* **2**, 349–360 (1967)
- [48] KUHN, R. und SÖRENSEN, N., *Angew. Chem.* **51**, 465–466 (1938)
- [49] LEE, T., JUNG, J. und SONG, P., *J. Biochem.* **88**, 663–668 (1980)
- [50] LESK, A., *Bioinformatik - Eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag (2003)
- [51] LIAAEN-JENSEN, S., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1B*, Kap. 9, S. 343, Birkhäuser (1995)
- [52] LIU, J., SHELTON, N. und LIU, R., *Organic Letters* **4**(15), 2521–2524 (2002)
- [53] LUGTENBURG, J. ET AL., *Pure Appl. Chem.* **71**(12), 2245–2251 (1999)
- [54] MATSUNO, T. ET AL., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**(9), 1589–1592 (1984)
- [55] MEYER, V., *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern*, Handbibliothek Chemie, Hüthig Verlag (1996)
- [56] MEYER, V., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Wiley-VCH, 9. Aufl. (2004)

- [57] MINICHINO, A. ET AL., *Acta Cryst.* **D59**(5), 843–849 (2003)
- [58] MÜLLER, B., *persönliche Kommunikation*
- [59] MÜLLER, R., BERNHARD, K. und VECCHI, M., in BRITTON, G. und GOODWIN, T. (Hg.) *Carotenoid Chemistry & Biochemistry*, S. 27, Pergamon Press (1982)
- [60] MURIANA, F. ET AL., *J. Biochem.* **114**(2), 223–229 (1993)
- [61] NEWBIGIN, M., *J. Physiology* **21**, 237–257 (1897)
- [62] NOACK, K., in BRITTON, G. und GOODWIN, T. (Hg.) *Carotenoid Chemistry & Biochemistry*, S. 135, Pergamon Press (1982)
- [63] PFANDER, H. und RIESEN, R., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1A*, Kap. 6, S. 145, Birkhäuser (1995)
- [64] PFANDER, H., TRABER, B. und LANZ, M., *Pure Appl. Chem* **69**(10), 2047–2060 (1997)
- [65] PICTON, B. und MORROW, C., *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland*, <http://www.habitas.org.uk/marinelif/> (2002)
- [66] PINGOUT, A. ET AL., *Biochemical Methods*, Wiley-VCH (2002)
- [67] QUARMBY, R. ET AL., *Comp. Biochem. Biophys.* **56B**, 55–61 (1977)
- [68] RCSB, *The Protein Data Bank*, [www.pdb.org](http://www.pdb.org) (2004)
- [69] RENSTRØM, B. ET AL., *Comp. Biochem. Biophys.* **71B**, 249–252 (1982)
- [70] SALARES, V. ET AL., *Biochim. Biophys. Acta* **576**, 176–191 (1979)
- [71] SAYLE, R. und MILNER-WHITE, E., *Trends in Biochemical Sciences* **20**(9), 374 (1995)
- [72] SCHIEDT, K. und LIAAEN-JENSEN, S., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1A*, Kap. 5, S. 81, Birkhäuser (1995)
- [73] SHINDYALOV, I. und BOURNE, P., *Protein Eng.* **11**(9), 739–747 (1998)
- [74] SNELL, E. ET AL., *Acta Cryst.* **D53**(3), 231–239 (1997)
- [75] UDEKEM D'ACÓZ, C., *Crustikon - Crustacean photographic website*, <http://www.tmu.uit.no/crustikon/> (2003)
- [76] VECCHI, M. ET AL., *J. High Res. Chromatogr.* **10**, 348–351 (1987)
- [77] VERNE, J., *Bull. Soc. Biol. Fr.* **46**, 61–65 (1921)
- [78] VONK, N., BAARS, B. und SCHALLER, H., *Troubleshooting in der HPLC*, Birkhäuser (1990)
- [79] WALD, G. ET AL., *Biol. Bull. (Woods-hole, MA)* **95**, 249–250 (1948)
- [80] WEESIE, R. ET AL., *FEBS Letters* **362**, 34–38 (1995)
- [81] WEESIE, R. ET AL., *Biochem.* **36**(24), 7288–7296 (1997)
- [82] WEESIE, R. ET AL., *Pure Appl. Chem.* **69**(10), 2085–2090 (1997)
- [83] WEESIE, R. ET AL., *Biospectr.* **5**, 358–370 (1999)
- [84] WEISS, J. und WINKENBACH, M., *Der Brockhaus Naturwissenschaft und Technik*, Bibliographisches Institut &



- F.A. Brockhaus, Spektrum Akademischer Verlag (2003)
- [85] WENDT, T., *persönliche Kommunikation*
- [86] WINTER, R. und NOLL, F., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner (1998)
- [87] ZAGALSKY, P., *Comp. Biochem. Biophys.* **73B**, 997–1000 (1982)
- [88] ZAGALSKY, P., *Comp. Biochem. Biophys.* **71B**, 235–236 (1982)
- [89] ZAGALSKY, P., *Methods in Enzymology* **111**, 216–247 (1985)
- [90] ZAGALSKY, P., in BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hg.) *Carotenoids 1A*, S. 287, Birkhäuser (1995)
- [91] ZAGALSKY, P., *Acta Cryst.* **D59**(8), 1529–1531 (2003)
- [92] ZAGALSKY, P. und CHEESMAN, D., *Biochem. J.* **89**(1), 21P (1963)
- [93] ZAGALSKY, P., CLARCK, R. und FAIRCLOUGH, D., *Comp. Biochem. Biophys.* **75B**, 169–170 (1983)
- [94] ZAGALSKY, P. und JONES, R., *Comp. Biochem. Biophys.* **71B**, 237–242 (1982)
- [95] ZAGALSKY, P. ET AL., *Comp. Biochem. Biophys.* **75B**, 163–167 (1983)

## Abbildungsverzeichnis

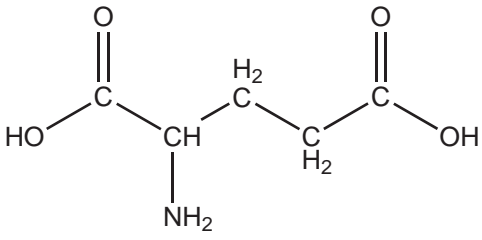
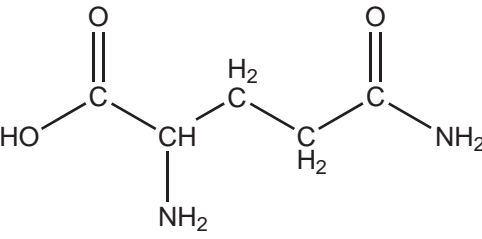
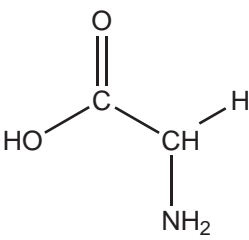
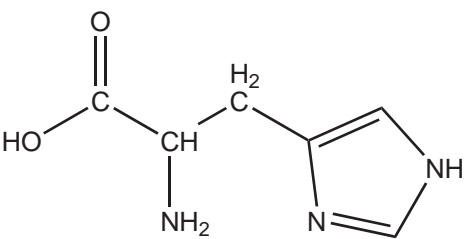
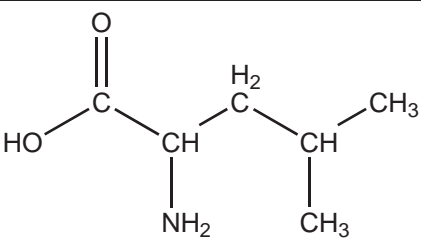
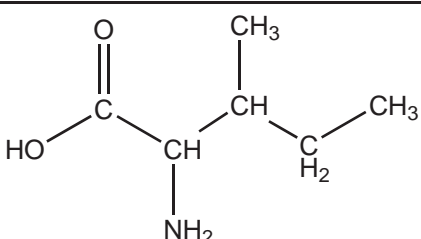
2.1. Die HPLC-Apparatur . . . . .	4
2.2. Forschen am explO . . . . .	5
4.1. Krustentierspezies . . . . .	12
4.2. Grundstruktur einer Aminosäure . . . . .	13
4.3. Isopren . . . . .	15
4.4. Isopreneinheiten in $\beta$ -Carotin . . . . .	15
4.5. Nummerierungsschema . . . . .	15
4.6. $\beta$ -Endring . . . . .	16
4.7. Stereoisomere von Astaxanthin . . . . .	16
5.1. Struktur von SDS . . . . .	18
5.2. Struktur von DTT . . . . .	18
5.3. Elektrophorese-Apparatur . . . . .	19
5.4. Chromatographie . . . . .	19
5.5. HPLC-Apparatur . . . . .	20
5.6. Aufbau eines Spektralphotometers . . . . .	21
6.1. Astaxanthin . . . . .	22
6.2. $\beta$ -Crustacyanin ( $A_1/A_3$ -Dimer) mit gebundenem Astaxanthin . . . . .	23
6.3. AXT1-C(1-6)-Endring in der Bindungstasche . . . . .	25
6.4. AXT2-C(1-6)-Endring in der Bindungstasche . . . . .	25
6.5. AXT1-C(1'-6')-Endring in der Bindungstasche . . . . .	27
6.6. AXT2-C(1'-6')-Endring in der Bindungstasche . . . . .	27
6.7. Umgebung der Polyketten . . . . .	29
9.1. Hummerschalen-Rohextrakt . . . . .	38
9.2. gefällte Schalenproteine . . . . .	39
9.3. Vorprobe auf Thermochromie . . . . .	39
9.4. SDS-PAGE der Rohextrakte 24.08.04 . . . . .	39
9.5. Proteinextrakt aus <i>H. gammarus</i> . . . . .	41
9.6. Proteinextrakt aus der Riesengarnele . . . . .	41
9.7. Carotinextrakt aus <i>C. pagurus</i> . . . . .	42
9.8. Thermochromie von Hummer-Crustacyanin . . . . .	42
9.9. Detektortest . . . . .	43
9.10. Reproduzierbarkeit von Chromatogrammen . . . . .	43

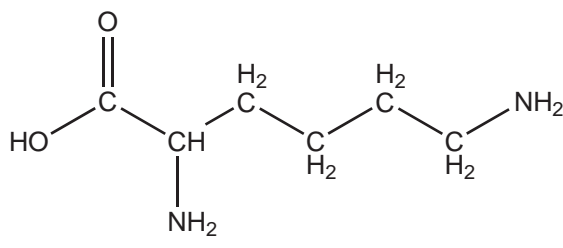
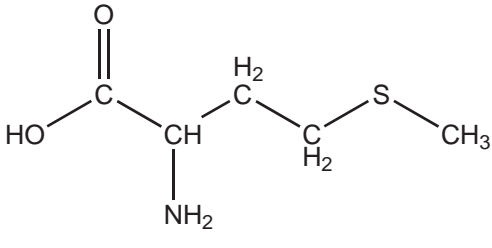
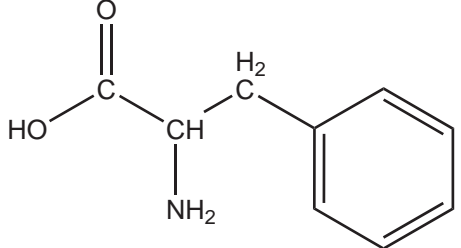
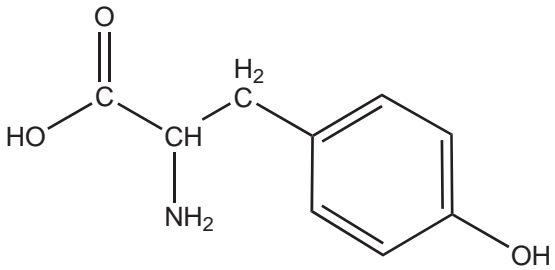
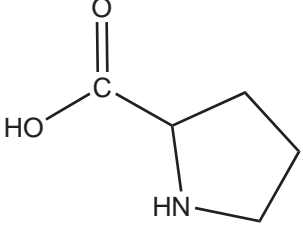
## A. Liste der verwendeten Abkürzungen

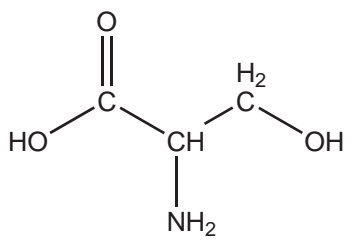
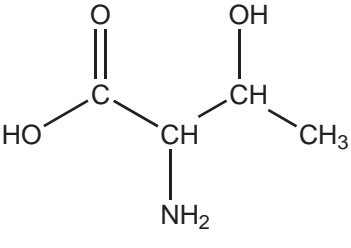
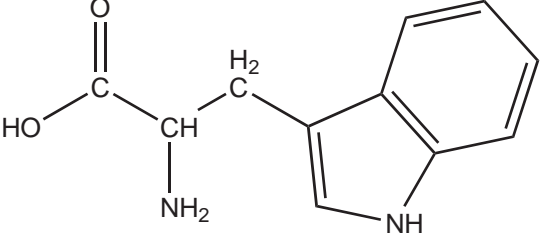
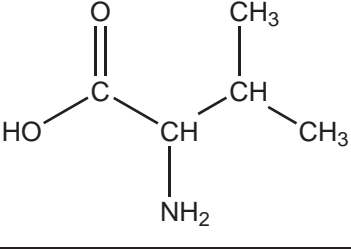
AXT	Astaxanthin
CD	Circulardichroismus
<sup>13</sup> C-NMR	<sup>13</sup> C-Kernresonanzspektroskopie
Da	Dalton, 1 Da = 1,66*10 <sup>-19</sup> g
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol, 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-Na <sub>2</sub>	Dinatrium-Salz der EDTA
<sup>19</sup> F-NMR	<sup>19</sup> F-Kernresonanzspektroskopie
HGA	<i>Homarus gammarus</i>
HYA	<i>Hyas araneus</i>
HPLC	high performance/pressure chromatography
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KRG	Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium
$\lambda_{max}$	Wellenlänge des höchsten Absorptionsmaximums
LSL	Heidelberger LifeScienceLab
NP	normal phase, Normalphasen-
ODS	Octadecylsilicat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein Data Base [68, 5]
PDB ID	Identifikationscode eines Proteins in der PDB [68, 5]
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences
PRA	Riesengarnele
RMSD	root mean squared deviation
RP	reversed phase, Umkehrphasen-
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VIS	sichtbar

## B. Liste der proteinogenen Aminosäuren

Strukturformel	Name	Kürzel
$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{HO}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	Alanin	Ala, A
$  \begin{array}{c}  \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{NH} \\  \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\  \text{HO}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \\    \qquad \qquad \qquad \text{H}_2 \qquad \text{H}_2 \qquad \qquad \qquad \text{H} \\  \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{H}_2 \qquad \text{H}_2  \end{array}  $	Arginin	Arg, R
$  \begin{array}{c}  \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\  \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\  \text{HO}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{C} \\    \qquad \qquad \qquad \text{H}_2 \qquad \qquad \qquad \parallel \\  \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2  \end{array}  $	Asparigin	Asn, N
$  \begin{array}{c}  \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\  \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\  \text{HO}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\    \qquad \qquad \qquad \text{H}_2 \qquad \qquad \qquad \parallel \\  \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{O}  \end{array}  $	Aspariginsäure	Asp, D
$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{HO}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{SH} \\    \qquad \qquad \qquad \text{H}_2 \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	Cystein	Cys, C

	Glutamin	Glu, Q
	Glutaminsäure	Gln, E
	Glycin	Gly, G
	Histidin	His, H
	Leucin	Leu, L
	Isoleucin	Ile, I

 <chem>NC(CCCCN)C(=O)O</chem>	Lysin	Lys, K
 <chem>CSCCC(N)C(=O)O</chem>	Methionin	Met, M
 <chem>Nc1ccc(cc1)CC(N)C(=O)O</chem>	Penylalanin	Phe, F
 <chem>Oc1ccc(cc1)CC(N)C(=O)O</chem>	Tyrosin	Tyr, Y
 <chem>C1CCNC1C(=O)O</chem>	Prolin	Pro, P

 <chem>NC(CO)C(=O)O</chem>	Serin	Ser, S
 <chem>CC(O)C(N)C(=O)O</chem>	Threonin	Thr, T
 <chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)CC(N)C(=O)O</chem>	Tryptophan	Trp, W
 <chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem>	Valin	Val, V

## C. Liste verwendeter Puffer und Reagenzien

### C.1. Borat-TRIS-Puffer, pH 6,8 (BT-Puffer)

18,55 g (0,3 mol) Borsäure werden in etwa 750 mL Aqua dest. gelöst, der Puffer wird mit festem TRIS auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt und auf 1 L aufgefüllt; der pH-Wert gegebenenfalls korrigiert.

### C.2. EDTA-Puffer, pH 7,5

100 g EDTA-Na<sub>2</sub> (0,27 mol) werden in etwa 750 mL Aqua dest. suspendiert, der pH-Wert wird mit verdünnter Natronlauge nach und nach auf pH 7,5 eingestellt, bis alles Salz gelöst ist. Der Puffer wird mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt; der pH-Wert gegebenenfalls korrigiert.

### C.3. Phosphatpuffer

27,82 g (0,2 mol) Kaliumdihydrogenphosphat werden in etwa 750 mL Aqua dest. gelöst, der pH-Wert wird mit verdünnter Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt, mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt und der pH-Wert wird gegebenenfalls korrigiert.

### C.4. SDS-PAGE-Elektrodenpuffer nach Laemmli

Der vorgefertigte Elektrodenpuffer enthielt 25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 10% SDS

bei einem pH-Wert von 8,3.

### C.5. SDS-PAGE-Probenpuffer nach Laemmli

Der vorgefertigte Probenpuffer war dreifach konzentriert und enthielt 6% SDS, 30% Glycerin, 0,3% Bromphenolblau und 180 mM TRIS-Cl. Unmittelbar vor Benutzung wurden 150 mM DTT zugegeben.

### C.6. Karottenextrakt

Etwa 30 g einer Karotte werden in feine Stücke geraspelt, zum Aufbrechen der Zellen bei -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Die Karottenraspeln werden in 100 mL Aceton übertragen und einige Stunden bei 5 °C extrahiert. Der Acetonextrakt wird abfiltriert, im Wasserstrahlvakuum auf etwa ein Zehntel eingengt und in einem Schütteltrichter mit demselben Volumen Hexan versetzt um die Carotinoide zu extrahieren. Die Hexan-Phase wird entfernt und der Prozess solange wiederholt, bis die Hexan-Phase fast klar bleibt. Die organischen Phasen werden vereinigt, auf wenige mL eingengt und bei 5 °C aufbewahrt.



## **D. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Philipp Börsch-Supan, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Neustadt, den 21. Oktober 2004

\_\_\_\_\_