

**Untersuchungen zur Struktur und Physiologie des  
hyperglykämischen Hormons (CHH) beim europäischen  
Flusskrebs, *Astacus astacus* L.**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tina Röser

aus Mayen

Bonn, September 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Rainer Keller
2. Referent: Prof. Dr. Heinrich Dirksen

Tag der Promotion: 24. Oktober 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006

Für Jochen und meine Familie

Danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. R. Keller, ehemaliger Leiter des Instituts für Zoophysiology der Universität Bonn, der als Doktorvater mit großem Engagement die vorliegende Arbeit betreute und förderte. Sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft waren eine große Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Dirksen für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit sowie sein fortdauerndes Interesse an meiner Dissertation, auch nach seinem Wechsel zur Universität Stockholm.

Herrn Prof. Dr. W. Kolanus und Frau Prof. Dr. C. E. Müller für ihre Bereitschaft als Mitglieder der Promotionskommission das Promotionsverfahren zu begleiten.

Dr. Patrick Bulau, der die massenspektrometrischen Untersuchungen an der Universität Münster durchgeführt hat und auch nach unserer gemeinsamen Zeit am hiesigen Institut immer und jederzeit für meine Fragen offen war.

Frau Barbara Reichwein für die angenehme Teamarbeit bei der Injektion der Tiere und der Präparation der Gewebe im Rahmen der *in vivo* Experimente zum CHH-Wirkungsmechanismus.

allen langjährigen Freunden und Kollegen am Institut für Zoophysiology für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Patrick, Nadine und Jochen für die Korrekturarbeiten.

meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, sowie meiner ganzen Familie, die mich jederzeit unterstützte und hinter mir stand.

ganz besonders Jochen für ganz vieles.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Neurohormone des X-Organ-Sinusdrüsen-Systems	1
1.2	Die CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie	1
1.2.1	Peptidstruktur	2
1.2.2	Biologische Aktivität und Wirkungsmechanismus des CHH	5
1.3	Aufgaben- und Problemstellung	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Tiere und Tierhaltung	17
2.2	Präparation der Sinusdrüsen	17
2.3	Isolierung und Charakterisierung des hyperglykämischen Hormons aus Sinusdrüsen von <i>Astacus astacus</i>	18
2.3.1	Chromatographische Trennung von Sinusdrüsenextrakt	18
2.3.2	Massenspektrometrische Untersuchungen	19
2.3.2.1	<i>Tryptische CHH-Spaltung im Gel nach Elektrophorese</i>	19
2.3.2.2	<i>Tryptische Spaltung von CHH in Lösung und Aufreinigung der Spaltfragmente</i>	20
2.3.2.3	<i>Nano-ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie</i>	21
2.3.3	Edman-Sequenzierung	22
2.3.4	Aminosäureanalyse	22
2.3.5	Nachweis der L- und D-Phe <sup>3</sup> -Isoform des CHH von <i>Astacus astacus</i>	24
2.3.6	CHH-Quantifizierung	24
2.4	Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des CHH von <i>Astacus astacus</i> und vergleichende Untersuchungen bei <i>Orconectes limosus</i>	25
2.4.1	Hämolymphentnahme und –behandlung	25
2.4.2	Dosis-Wirkungsbeziehung	25
2.4.2.1	<i>Glucose-Bestimmung</i>	25
2.4.3	CHH-ELISA	26
2.4.3.1	<i>Pufferlösungen und Reagenzien für den CHH-ELISA</i>	26
2.4.3.2	<i>Durchführung des CHH-ELISA</i>	28
2.4.4	Bestimmung der Kreuzreaktivität von <i>Astacus astacus</i> -CHH mit anti- <i>Orconectes limosus</i> CHH-Serum	29

---

2.4.5	Bestimmung der <i>in vivo</i> Halbwertszeit von CHH	29
2.4.6	Feedback-Effekt von injizierter Glucose	30
2.4.7	Antiserum-Neutralisation	30
2.4.8	Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie	31
2.4.8.1	<i>Laktat-Bestimmung</i>	32
2.4.9	Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden natürlichen Hypoxie während der Ecdysis	32
<b>2.5</b>	<b>Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskrebs <i>Orconectes limosus</i>: Beteiligung zyklischer Nukleotide</b>	<b>33</b>
2.5.1	Isolierung der CHH-Isoformen aus Sinusdrüsenextrakt und Quantifizierung	33
2.5.2	Injektion der Tiere und Gewebepräparation	34
2.5.3	Bestimmung von zyklischen Nukleotiden	36
2.5.3.1	<i>cAMP-Assay</i>	36
2.5.3.2	<i>cGMP-Assay</i>	38
2.5.4	Protein-Bestimmung	39
2.6	Statistische Analyse	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung des CHH aus der Sinusdrüse</b>	<b>41</b>
3.1.1	Isolierung von CHH mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	41
3.1.2	Tryptische Spaltung von CHH im Gel und massenspektrometrische Untersuchung	44
3.1.3	ESI-Q-TOF Massenspektrometrie nach tryptischer Spaltung von CHH in Lösung und Aufreinigung der Spaltfragmente	45
3.1.4	Sequenzierung der tryptischen Spaltfragmente beider CHH-Formen mittels Nano-ESI-Q-TOF MS/MS	47
3.1.5	Identifizierung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin mittels Aminosäureanalyse	48
3.1.6	Nachweis der Aminosäurereste L- bzw. D-Phe <sup>3</sup> im N-terminalen Oktapeptid der beiden CHH-Formen	49
3.1.7	CHH-Quantifizierung	51

---

<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des CHH von <i>Astacus astacus</i> und vergleichende Untersuchungen bei <i>Orconectes limosus</i></b>	<b>52</b>
3.2.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	52
3.2.2	Bestimmung der Kreuzreaktivität von <i>Astacus astacus</i> -CHH mit anti- <i>Orconectes limosus</i> CHH-Serum	53
3.2.3	Bestimmung der <i>in vivo</i> Halbwertszeit von CHH	54
3.2.4	Feedback-Effekt von injizierter Glucose	56
3.2.4.1	<i>Studien am europäischen Flusskrebs Astacus astacus</i>	56
3.2.4.2	<i>Studien am amerikanischen Flusskrebs Orconectes limosus</i>	58
3.2.5	Antiserum-Neutralisation	60
3.2.5.1	<i>Studien an Astacus astacus</i>	60
3.2.5.2	<i>Studien an Orconectes limosus</i>	62
3.2.6	Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie	66
3.2.6.1	<i>Experimente bei extremer Hypoxie</i>	66
3.2.6.2	<i>Experimente bei partieller Hypoxie</i>	70
3.2.7	Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden, natürlichen Hypoxie während der Ecdysis	75
<b>3.3</b>	<b>Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskrebs <i>Orconectes limosus</i>: Beteiligung zyklischer Nukleotide</b>	<b>79</b>
3.3.1	Injektion über die Gelenkmembranen der Scheren	79
3.3.2	Injektion ins Perikard	86
3.3.3	<i>in vitro</i> Inkubation von Y-Organen	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des hyperglykämischen Hormons (CHH) von <i>Astacus astacus</i></b>	<b>92</b>
<b>4.2</b>	<b>Biologische Aktivität des CHH von <i>Astacus astacus</i> und vergleichende Untersuchungen bei <i>Orconectes limosus</i></b>	<b>96</b>
4.2.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	96
4.2.2	Bestimmung der Kreuzreaktivität von <i>Astacus astacus</i> -CHH mit anti- <i>Orconectes limosus</i> CHH-Serum	97
4.2.3	Bestimmung der <i>in vivo</i> Halbwertszeit von CHH	97

---

4.2.4	Feedback-Effekt von injizierter Glucose auf die CHH-Ausschüttung	99
4.2.5	Antiserum-Neutralisation	102
4.2.6	Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie	104
4.2.7	Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden, natürlichen Hypoxie während der Ecdysis	107
<b>4.3</b>	<b>Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskrebs <i>Orconectes limosus</i>: Beteiligung zyklischer Nukleotide</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2',2' azino-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)
AD	Antennendrüse
ADAM	1-Aminoadamantan
A. dest.	destilliertes Wasser
AG	Abdominalganglien
AS	Antiserum
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchinonsäure
BSA	Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
CG	Cerebralganglion
cGMP	zyklisches Guanosin-5'-monophosphat
CHH	crustacean hyperglycemic hormone
cpm	counts per minute
CPRP	CHH-precursor-related peptide
D	Dunkelheit
d	Tag
Da	Dalton
dBcAMP	Dibutyryl-cAMP
dBcGMP	Dibutyryl-cGMP
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)
ESI	Elektrospray-Ionisation
esx	entsteht
FMOC	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
GIH/VIH	gonad-inhibiting hormone/vitellogenin-inhibiting hormone
Glu	Glucose
MIH	moult-inhibiting hormone
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
H	Herz
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G

---

K	Kiemen
L	Licht
MDD	Mitteldarmdrüse (Hepatopankreas)
min	Minute
MOIH	mandibular organ-inhibiting hormone
NRS	normales Kaninchenserum
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDH	pigment dispersing hormone
Phe	Phenylalanin
PO	Perikardialorgan
ppm	Millionstel
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPCH	red pigment concentrating hormone
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeitanalysator
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA	Van Harreveld Saline
SD	Sinusdrüse
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SM	Schwanzmuskel
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis

# 1 Einleitung

## 1.1 Neurohormone des X-Organ-Sinusdrüsen-Systems

Das Hormon, das Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist, gehört zur Gruppe der sogenannten X-Organ-Sinusdrüsen Neurohormone. Das X-Organ-Sinusdrüsen-System, das in den optischen Ganglien des Augenstiels lokalisiert ist, ist das zentrale neurohormonale System bei dekapoden Crustaceen. Es enthält eine heterogene Population neurosekretorischer Zellen, die mehrere Neuropeptide mit verschiedenen hormonalen Effekten synthetisieren. Diese werden entsprechend ihrer Funktion im wesentlichen in zwei Familien untergliedert. Zum einen gibt es die Chromatophorotropine RPCH (red pigment concentrating hormone; Fernlund und Josefsson, 1972; Keller, 1992; Linck et al., 1993; Klein et al., 1995) und PDH (pigment dispersing hormone; Fernlund, 1976; Keller, 1992; De Kleijn et al., 1993; Lohr et al., 1993; Yang et al., 1999). Die zweite Familie ist die CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie, zu der strukturhomologe Peptide gehören, deren Kurzbezeichnung sich auf die ursprünglich nachgewiesenen biologischen Effekte bezieht: CHH (crustacean hyperglycemic hormone), MIH (moult-inhibiting hormone), VIH/GIH (gonad- oder vitellogenin-inhibiting hormone) und MOIH (mandibular organ-inhibiting hormone) (reviews: Keller, 1992; Van Herp, 1998; Lacombe et al., 1999; Böcking et al., 2002; Soye, 2003).

## 1.2 Die CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie

Abramowitz et al. waren 1944 die ersten, die die Existenz eines „diabetogenen Faktor“ in Augenstielextrakten beschrieben. Die Injektion eines Extraktes aus Augenstielen der Winkerkrabbe *Uca pugilator* führte bei der Schwimmkrabbe *Callinectes sapidus* zu einem erheblichen Anstieg des Blutzuckerspiegels. Dieser Befund sprach für die Existenz eines hyperglykämischen Neurohormons, vermutlich mit Lokalisation in der Sinusdrüse. In weiteren Studien wurde dies bestätigt (Kleinholz et al., 1967) und im Jahre 1989 wurde erstmals der „diabetogene Faktor“, nunmehr als CHH (crustacean hyperglycemic hormone) bezeichnet, von *Carcinus maenas* isoliert und vollständig sequenziert (Kegel et al., 1989). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Peptiden verschiedener Crustaceen-Spezies isoliert und charakterisiert, die aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu einer CHH-Peptidhormonfamilie zusammengefasst wurden. Erweitert wurde diese Familie durch die Entdeckung des strukturell verwandten MIH (moult-inhibiting hormone; Webster und Keller,

1986; Webster, 1991) von *Carcinus maenas*, das seine Bezeichnung ebenfalls aufgrund der ersten nachgewiesenen biologischen Funktion, nämlich der inhibitorischen Wirkung auf die Ecdysteroidsynthese in den Y-Organen, erhielt. Zusätzlich kamen noch GIH/VIH und MOIH hinzu, wobei VIH die Vitellogenese in den Ovarien (Soyez et al., 1991) und MOIH die Synthese von Methylfarnesoat in den Mandibularorganen inhibiert (Wainwright et al., 1996). Die CHH-Peptidhormonfamilie wurde somit zur CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie erweitert. Aufgrund der engeren strukturellen Verwandtschaft von MIH und GIH/VIH im Vergleich zu CHH wurde eine zusätzliche Aufteilung in zwei Subfamilien vorgenommen, die CHH- und die MIH/GIH-Subfamilie (Keller, 1992; Lacombe et al., 1999). Inzwischen konnten mehr als 50 Peptide der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie mittels Edman-Sequenzierung und/oder cDNA-Klonierung identifiziert werden (reviews: Böcking et al., 2002; Soyez, 2003).

### 1.2.1 Peptidstruktur

Die Grundstruktur der Peptide ist durch das Vorhandensein von 6 Cysteinresten, 2 Argininresten (Arg<sup>13</sup>, Arg<sup>31</sup>), einem Aspartatrest (Asp<sup>25</sup>) und einem Phenylalaninrest (Phe<sup>49</sup>) an identischen Positionen der Peptide gekennzeichnet. Die 6 Cysteinreste (Cys<sup>7</sup>, Cys<sup>23</sup>, Cys<sup>26</sup>, Cys<sup>39</sup>, Cys<sup>43</sup>, Cys<sup>52</sup>) bilden immer 3 intramolekulare Disulfidbrücken aus, wobei deren Ausbildung und demzufolge auch die Tertiärstruktur vermutlich in allen Peptiden in derselben Weise organisiert ist (Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>43</sup>, Cys<sup>23</sup>-Cys<sup>39</sup>, Cys<sup>26</sup>-Cys<sup>52</sup>). Im Übrigen ist die CHH/MIH/GIH(VIH)-Familie durch weitere konservierte Aminosäure-Motive gekennzeichnet (Lacombe et al., 1999; Böcking et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, wird die Peptidfamilie aufgrund der Primärstrukturen der Peptide in zwei Subfamilien untergliedert. Die CHH-Subfamilie ist durch eine nahezu invariante Anzahl von 72-73 Aminosäureresten, C-terminale Amidierung und, bei Hummern, Flusskrebsen und Krabben, durch eine N-terminale Blockierung durch eine Pyroglutamyl-Gruppe gekennzeichnet. Die zweite Subfamilie, die MIH/GIH-Familie, umfasst die Peptide MIH, GIH/VIH und MOIH. Die Peptide der MIH/GIH-Subfamilie sind länger und variieren stärker in der Anzahl der Aminosäurereste (bis zu 78 Aminosäuren). Zudem sind die C- und N-Termini der Peptide selten blockiert und es gibt einen zusätzlichen Glycinrest zwischen den ersten beiden Cysteinen. Hinsichtlich der bisher bekannten biologischen Effekte lassen sich die Peptide oft nicht eindeutig voneinander abgrenzen. So besitzen CHHs z. B. auch MIH- und GIH-Aktivität.

Unterstrichen wird die Untergliederung der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie in zwei Subfamilien durch unterschiedliche precursor-Strukturen. Neben den ersten aufgeklärten precursor-Strukturen von GIH in *Homarus americanus* (De Kleijn et al., 1994b), von MIH und CHH in *Carcinus maenas* (Klein et al., 1993; Weidemann et al., 1989), sowie der jeweils 2 CHH-precursor von *Orconectes limosus* (De Kleijn et al., 1994a) und *Homarus americanus* (De Kleijn et al., 1995) wurden inzwischen viele weitere precursor aufgeklärt. Dircksen et al. (2001) klärten zusätzlich die precursor-Struktur des CHH aus Perikardialorganen (PO-CHH) auf. Auffallender Unterschied zwischen den precursor-Strukturen der beiden Subfamilien ist das Vorliegen oder Fehlen einer zusätzlichen Peptidsequenz, bezeichnet als CPRP (CHH-precursor-related peptide). Dieses CPRP ist nur bei der CHH-Subfamilie zu finden und ist zwischen Signalpeptid und der CHH-Hormonsequenz lokalisiert. Eine CPRP-Sequenz fehlt bei allen identifizierten Präprohormonen der MIH/GIH-Subfamilie (Böcking et al., 2002).

Interessanterweise existieren bei einigen Spezies mehrere CHH-Varianten, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. So wurden beim amerikanischen Hummer *Homarus americanus* zwei CHH-Varianten nachgewiesen (Soyez et al., 1990; Tensen et al., 1991; De Kleijn et al., 1995). Bei der Garnelenart *Penaeus japonicus* (Yang et al., 1997) wurden sogar sechs CHH-Formen identifiziert. Erst kürzlich wurden zwei CHH-Formen beim australischen Flusskrebs *Cherax destructor* isoliert und vollständig charakterisiert (Bulau et al., 2003). Deren Existenz kann nach Studien an *Metapenaeus ensis* durch das Vorliegen mehrerer Gene, die in Clustern organisiert sind und die precursor verschiedener CHH-Formen codieren, erklärt werden (Gu und Chan, 1998; Gu et al., 2000). Auch für die Garnelenart *Penaeus monodon* wurde eine ähnliche genomische Organisation nachgewiesen (Udomkit et al., 2000). Eine weitere Erklärung für das Vorliegen mehrerer CHH-Varianten ergab sich aus den Studien von Dircksen et al. (2001), die zur Isolierung einer neuen CHH-Variante aus den Perikardialorganen der Strandkrabbe *Carcinus maenas* führten. Gewebespezifisches alternatives Spleißen der RNA-Primärtranskripte ist danach für die Entstehung der beiden CHH-Varianten verantwortlich.

Neben den bereits beschriebenen, bei Neuropeptiden üblichen posttranslationalen Modifikationen, wie C- oder N-terminale Blockierung, konnte eine weitere Modifikation nachgewiesen werden, die zu CHH-Isoformen führt, die sich ausschließlich in der Konfiguration der dritten Aminosäure (Phenylalanin) unterscheiden. Dabei erfolgt eine Isomerisierung des L-Phe<sup>3</sup>-Restes zu einem D-Phe<sup>3</sup>-Rest. Dieser Prozess ist offenbar präzise gesteuert. So enthält z. B. nur eine Minderheit der etwa 30 CHH-synthetisierenden Zellen des

X-Organen von *Orconectes limosus* D-Phe<sup>3</sup>-CHH (Soyez et al., 1998). L- und D-Isoform werden in einem konstanten Verhältnis zueinander gebildet (Ollivaux und Soyez, 2000). Bislang konnte die Koexistenz solcher CHH-Isoformen nur bei Vertretern der Astacoidea und Parastacoidea nachgewiesen werden, und zwar beim Hummer *Homarus americanus* (Soyez et al., 1994), den Flusskrebse *Procambarus clarkii* (Yasuda et al., 1994), *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1995), *Orconectes limosus* (Soyez et al., 1998) und *Cherax destructor* (Bulau et al., 2003). Von physiologischer Bedeutung könnte diese Isomerisierung insofern sein, als für das D-Phe<sup>3</sup>-CHH eine erhöhte hyperglykämische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte (Soyez et al., 1994; Keller et al., 1999). Zudem zeigte die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform eine höhere Aktivität bei der Hemmung der Ecdysteroidsynthese und -sekretion durch die Y-Organen *in vitro* (Yasuda et al., 1994; Keller et al., 1999).

Wie bereits beschrieben, wird bei Hummern, Flusskrebse und Krabben der N-Terminus oftmals durch eine Pyroglutamyl-Gruppe geschützt. Diese posttranslationale Modifikation durch Zyklisierung von Glutamin zu Pyroglutamat scheint jedoch nicht vollständig abzulaufen, da ein Gemisch beider CHH-Formen in der Sinusdrüse nachweisbar ist und die Isoformen im selben stöchiometrischen Verhältnis in die Hämolymphe sezerniert werden. Die Zyklisierung ist offensichtlich für die hyperglykämische Wirkung ohne Bedeutung. In Studien bei *Carcinus maenas* erwiesen sich die Gln<sup>1</sup>- und die pyroGlu<sup>1</sup>-Isoformen als äquipotent (Chung und Webster, 1996; Chung et al., 1998).

Dass die posttranslationalen Modifikationen Enantiomerenbildung und Glutamin-Zyklisierung durchaus auch in Kombination auftreten können, wurde durch die Studien von Ollivaux und Soyez (2000) belegt. Sie wiesen nach, dass sowohl das L-Phe<sup>3</sup>-CHH als auch das D-Phe<sup>3</sup>-CHH in N-terminal blockierter und unblockierter Form vorliegen.

Das X-Organ-Sinusdrüsen-System galt lange Zeit als einziger Syntheseort für Peptide der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie. Diese These wurde durch die Entdeckung CHH-immunreaktiver Zellen in den Perikardialorganen von *Carcinus maenas* (Dirksen und Heyn, 1998, Dirksen et al., 2000) und in den zweiten Wurzeln der Thorakalganglien des Hummers *Homarus americanus* (Chang et al., 1999; Dirksen et al., 2000) widerlegt. Aus den Perikardialorganen von *Carcinus maenas* wurde eine neue Variante des CHH isoliert (PO-CHH), die keine hyperglykämische Wirkung zeigte, obwohl es deutliche Homologien zwischen PO-CHH und Sinusdrüsen-CHH gibt (Dirksen et al., 2001). Zudem wurde in Paraneuronen des Darms von *Carcinus maenas* ebenfalls die Expression eines CHH, identisch mit Sinusdrüsen-CHH, nachgewiesen. Die Expression des Peptides ist dabei auf die

Vorhäutungsphase beschränkt, und es wird im Laufe der späten Vorhäutungs- und der Ecdysisphase nahezu vollständig ausgeschüttet (Chung et al., 1999).

Peptide der CHH/MIH/GIH(VIH)-Familie waren lange Zeit nur von Crustaceen bekannt. Immer mehr Daten beweisen ein Vorkommen CHH-ähnlicher Peptide bei den Insekten. Mit der Charakterisierung der ITPs (ion transport peptides) bei den Heuschreckenarten *Schistocerca gregaria* (Audsley et al., 1994; Meredith et al., 1996) und *Locusta migratoria* (Macins et al., 1999) sowie dem Seidenspinner *Bombyx mori* (Endo et al., 2000) wurden Peptide mit hoher Sequenzhomologie zum CHH entdeckt. Weitere Peptide mit Homologien im Hinblick auf Aminosäuresequenz und precursor-Struktur konnten aus den Genomen von *Drosophila melanogaster* (CG 13586) und *Anopheles gambiae* (XP 313928; Riehle et al., 2002) abgeleitet werden. Aus dem Gift der Spinne *Latrodectus mactans* wurde ein Peptid isoliert, das in struktureller Hinsicht (Molekülmasse, Zahl und Position der 3 Disulfidbrücken) den CHHs ähnelt, jedoch kaum Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz aufweist (Gasparini et al., 1994).

### 1.2.2 Biologische Aktivität und Wirkungsmechanismus des CHH

Für Peptide der CHH-Subfamilie sind inzwischen eine Reihe verschiedener biologischer Aktivitäten nachgewiesen, die auf einen multifunktionellen Charakter hindeuten.

Die bestuntersuchte biologische Funktion der CHHs ist deren klassische Rolle als hyperglykämische Hormone. Abgesehen vom PO-CHH aus *Carcinus maenas* (Dircksen et al., 2001) und dem MIH von *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1996), welches aufgrund von Sequenzhomologien in die CHH-Subfamilie eingeordnet wurde, konnte diese Wirkung bei allen isolierten und charakterisierten Peptiden gezeigt werden. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die bei verschiedenen Spezies nachgewiesenen diastereomeren CHH-Isoformen (L- bzw. D-Phe<sup>3</sup>-CHH) in ihrer hyperglykämischen Wirksamkeit (Soyez et al., 1994, Keller et al., 1999).

Es liegt eine größere Zahl von Studien zum Mechanismus und zur Entstehung des hyperglykämischen Effektes vor. Untersuchungen zum Zeitverlauf der Hyperglykämie nach Injektion von Hormon (oder ungereinigtem Sinusdrüsenextrakt) zeigten, relativ unabhängig von der untersuchten Art, einen schnellen Anstieg des Blutzuckerspiegels innerhalb von 5-10 min nach Injektion, der im allgemeinen nach 2 h ein Maximum erreichte und dann verhältnismäßig schnell abfiel (u. a. Keller und Andrew, 1973). Man schloss daraus, dass die Hyperglykämie durch eine schnelle Mobilisierung von Kohlenhydratreserven verursacht wird. Erwartungsgemäß konnte dann auch bei verschiedenen Arten durch Entfernung der

Augenstiele Hypoglykämie hervorgerufen werden (Keller, 1974). Hamann (1974) konnte an *Orconectes limosus* zeigen, dass die selektive operative Entfernung der Sinusdrüse nicht nur zu einer Absenkung des Blutzuckerspiegels, sondern auch zu einer Aufhebung des diurnalen Rhythmus der Hämolymp-*Glucose-Konzentrationen* führte, der bei intakten Tieren einen Peak in der Nacht und ein Minimum am Tag aufweist. Somit scheint das CHH nicht nur an der Aufrechterhaltung der physiologischen Blutzuckerkonzentration, sondern auch an den zeitweiligen Anstiegen der *Glucose-Konzentrationen* in Anpassung an den physiologischen Bedarf beteiligt zu sein. Ebenso ist eine Beteiligung des CHH an stressbedingter Hyperglykämie zu vermuten (Keller, 1974; Kleinholz und Keller, 1979; Chang et al., 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass die Anpassung an höhere Temperaturen mit einer Hyperglykämie korrelierte, die bei entstielten Tieren nicht nachzuweisen war (Dean und Vernberg, 1965; Salminen und Lindquist, 1975). Dies deutete auf eine Funktion des CHH bei der Adaption an wechselnde Umweltbedingungen in Form einer schnellen Bereitstellung von Energiereserven hin. Eine Beteiligung des CHH an einer Reaktion bzw. Anpassung des Stoffwechsels von *Orconectes limosus* an anaerobe Bedingungen, erhöhte Temperaturen und Hunger konnte von Keller und Orth (1990) an *Orconectes limosus* gezeigt werden, die neben den *Glucose-Konzentrationen* der Hämolymphe auch die entsprechenden CHH-Konzentrationen ermittelten. Es zeigte sich, dass die CHH-Ausschüttung vermutlich vom Ernährungszustand des Tieres abhängig ist und dass somit CHH auch eine Rolle bei der Anpassung des Tieres an Hungerzustände spielen kann. Unter anaeroben Bedingungen wurde kurzzeitig eine CHH-Ausschüttung zusammen mit einem drastischen Anstieg der *Glucose-Konzentrationen* in der Hämolymphe beobachtet, wohingegen diese Reaktion bei augenstiellosen Tieren ausblieb. Umweltstress in Form einer Erhöhung der Temperatur führte ebenso zu einer parallelen Erhöhung der CHH- und *Glucose-Konzentrationen*, die sich bei augenstiellosen Tieren nicht zeigte. Studien an *Carcinus maenas* und *Orconectes limosus* führten auch zu der Schlussfolgerung, dass CHH an einer Hyperglykämie nach Umweltstress in Form von Haltung der Tiere an atmosphärischer Luft beteiligt ist (Santos und Keller, 1993a). Bei intakten Tieren wurden unter anoxischen Bedingungen signifikante Erhöhungen der *Glucose- und Laktat-Konzentrationen* in der Hämolymphe beobachtet. Derartige Veränderungen konnten bei entstielten oder mit Van Harreveld Saline injizierten Tieren nicht beobachtet werden. Die Injektion von entstielten Tieren mit CHH zu Versuchsbeginn konnte den Effekt der Augenstielentfernung aufheben. Bei entstielten Tieren unter Normalbedingungen erzeugte die Injektion von CHH lediglich Hyperglykämie, ein Anstieg der *Laktat-Konzentration* blieb aus. Der Anstieg der

Glykolyserate bei intakten Tieren unter Anoxie wurde vermutlich durch eine verstärkte Substratverfügbarkeit infolge eines durch CHH initiierten Glykogenabbaus erleichtert. Bei *Cancer pagurus* führte Haltung an atmosphärischer Luft ebenfalls zu Hyperglykämie und einem raschen Anstieg der Laktat-Konzentrationen. Dabei wurde während der ersten Stunde ein dramatischer Anstieg der CHH-Titer beobachtet, der sich innerhalb der folgenden 3 h abgeschwächt fortsetzte (Webster, 1996). Kurzzeitversuche unter Anoxie ergaben, dass bereits innerhalb von 15 min signifikante Anstiege der CHH-Titer nachzuweisen waren. Obwohl eine vierstündige *in vitro* Inkubation von Hämolympfproben aus Tieren, die zuvor durch zweistündige Haltung an Luft gestresst wurden, eine ziemlich hohe Stabilität von CHH in der Hämolymphe ergab, zeigte die Injektion von CHH eine extrem rasche Entfernung des Hormons aus der Zirkulation mit einer Halbwertszeit von 5-10 min. Man folgerte daraus, dass der Umweltstress in Form von Anoxie zu einer schnellen, massiven und verlängerten CHH-Freisetzung aus der Sinusdrüse führte. Die Untersuchungen von Chang et al. (1998) an *Homarus americanus* lieferten vergleichbare Ergebnisse unter Anoxie. Die Glucose-Titer der Hämolymphe stiegen parallel zu den CHH-Konzentrationen an. Eine Steigerung der CHH-Titer konnte auch bei Temperaturerhöhung beobachtet werden. Die Haltung der Tiere bei unterschiedlicher Salinität erbrachte keine eindeutigen Effekte. Interessant war bei diesen Untersuchungen, dass auch bei entstielten Tieren noch signifikante CHH-Titer nachweisbar waren, die nach Haltung der Tiere unter Anoxie für 4 h ebenfalls anstiegen, wenn auch deutlich geringer als bei intakten Tieren. Eine signifikante Änderung der Glucose-Titer wurde dabei nicht beobachtet.

Die CHH-Sekretion und folglich auch die Konzentration der Glucose in der Hämolymphe unterliegen einem zirkadianen Rhythmus, der von Licht/Dunkel-Phasen gesteuert wird (Hamann, 1974; Keller und Orth, 1990; Kallen et al., 1990). Unter Normalbedingungen erfolgt die Sekretion von CHH mit nachfolgender Hyperglykämie während der Dunkelphase, also während der natürlichen nächtlichen Aktivitätsphase der Tiere. Wie bereits erwähnt, beeinflusst Umweltstress wie Hunger, Anoxie und Temperaturschwankungen die Freisetzung von CHH. Allerdings ist über Faktoren, die die CHH-Sekretion beeinflussen sehr wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, die auf eine Beteiligung von Serotonin, Dopamin und Enkephalinen an einer Regulation der CHH-Sekretion deuten (Keller und Beyer, 1968; Jaros, 1990; Rothe et al., 1991; Lüschen et al., 1993). Santos und Keller (1993b) fanden erste Hinweise auf einen dualen Feedback-Mechanismus im Hinblick auf die Regulation von zirkulierenden Hormonmengen in der Hämolymphe. Die Injektion von Glucose führte bei

*Carcinus maenas* zu einem Abfall der CHH- und der Laktat-Konzentration in der Hämolymphe. Injektion von Laktat zeigte gegenteilige Effekte. Die CHH-Titer und die Glucose-Konzentrationen stiegen an. Demzufolge hat Laktat vermutlich eine stimulatorische und Glucose eine inhibitorische Wirkung auf die CHH-Sekretion aus der Sinusdrüse. Ein Anstieg der Laktat-Titer infolge höherer Glykolyseraten könnte als positiver Feedback-Mechanismus für die CHH-Sekretion dienen, was insofern sinnvoll erscheint, als dass Laktat als einziges Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels in Crustaceen auftritt (Gäde, 1984). Das freigesetzte CHH würde dann den Glykogenabbau stimulieren und die Verfügbarkeit an Glucose erhöhen. Im Falle eines Überschusses an Glucose könnten erhöhte Blutzuckerspiegel auftreten, was schließlich zu einer Inhibierung der CHH-Sekretion führen würde. Die bislang beschriebenen Studien lieferten keine Informationen über eine direkte zelluläre Wirkung der Substanzen auf die CHH-Neurone im X-Organ-Sinusdrüsenstrakt. Mit den Studien von Glowik et al. (1997), konnte erstmals eine selektive, inhibitorische Wirkung von D-Glucose auf die Aktivität von isolierten CHH-Neuronen in Organkultur gezeigt werden, die für eine wichtige Rolle der Glucose bei der Regulation der CHH-Sekretion und der Hämolymphe-Glucose-Konzentrationen spricht. D-Glucose bewirkte an CHH-Zellen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials und eine Aktionspotentialhemmung. Eine Beteiligung von Serotonin an der Kontrolle der CHH-Sekretion konnte ebenfalls gezeigt werden.

Als Ursache der Hyperglykämie nach CHH-Injektion wurde eine glykogenolytische Wirkung des Hormons vermutet. Demzufolge wurde in weiteren Studien die Veränderung des Glykogengehaltes verschiedener Gewebe unter CHH-Einfluss untersucht. Bei *Orconectes limosus* konnte eine Abnahme des Glykogengehaltes im Schwanzmuskel und den Gonaden nachgewiesen werden, bei *Uca pugilator* in den Kiemen und dem Integument (Keller und Andrew, 1973). Eine Abnahme des Glykogengehaltes im Hepatopankreas als dem Hauptspeicherorgan für Kohlenhydrate und Lipide konnte auch in folgenden Studien nicht eindeutig gezeigt werden. Dennoch gab es Hinweise auf eine hormonelle Regulation des Glykogengehaltes im Hepatopankreas, da nach Entstielung eine Zunahme der Glykogengehalte beobachtet werden konnte (Parvathy, 1972; Ramamurthi et al., 1968). In den Studien von Sedlmeier und Keller (1981) konnte schließlich eine Freisetzung von Glucose aus dem Hepatopankreas unter Einfluss physiologischer CHH-Konzentrationen (gereinigtes CHH) beobachtet werden. Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls unter Einfluss von cAMP und cGMP auf das Gewebe gezeigt. Zudem konnte eine Abnahme an radioaktiv markiertem Glykogen im Hepatopankreas in Gegenwart von CHH oder membrangängigen zyklischen Nukleotiden

(dBcAMP, dBcGMP) nachgewiesen werden. Somit wurden Schwanzmuskel und Hepatopankreas als mutmaßliche Hauptquellen für Glucose bei Hyperglykämie nach Hormoneinfluss identifiziert.

Für den Effekt des CHH auf Glykogenebene wurde eine Aktivierung des Glykogenabbaus und/oder die Inaktivierung der Glykogensynthese durch Aktivierung und/oder Inaktivierung der Phosphorylase bzw. Glykogensynthase diskutiert. Entsprechende Studien zum Einfluss des CHH (gereinigt) auf das Phosphorylase-System im Schwanzmuskel führten jedoch, vermutlich aufgrund des Einflusses von Calcium-Ionen, nicht zu eindeutigen Ergebnissen (Keller und Sedlmeier, 1988). Im Hinblick auf die Glykogensynthese konnten an Schwanzmuskelgewebe jedoch eindeutige Befunde erzielt werden. So resultierte die Entstielung von Tieren in einem Anstieg der Synthase I-Aktivität (aktive Form) von 30 auf 70 % der Gesamtzymaktivität. Durch Injektion von gereinigtem CHH konnte dieser Effekt wieder umgekehrt werden und die Synthase I-Aktivität sank innerhalb von 15 min nach CHH-Injektion auf das Grundniveau ab (Sedlmeier, 1982). Nachdem dieser Effekt auch durch Injektion von zyklischen Nukleotiden erzielt werden konnte, wurde eine Vermittlung des CHH-Effektes über zyklische Nukleotide als second messenger vermutet. Durch Aktivierung von Protein-Kinasen über zyklische Nukleotide würde eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Glykogensynthase erfolgen.

Im Hinblick auf die Vermittlung der CHH-Wirkung durch zyklische Nukleotide hatten sich bereits in früheren Studien richtungsweisende Ergebnisse ergeben, die zudem noch Hinweise auf weitere Zielorgane lieferten (Sedlmeier und Keller, 1981). Dabei wurde der Einfluss von elektrophoretisch gereinigtem CHH an Herz, Hepatopankreas, Integument, Antennendrüse und Schwanzmuskel von *Orconectes limosus* untersucht. Für alle Gewebe wurden nach CHH-Injektion Anstiege der Gehalte an cAMP und cGMP gemessen, wobei sich der zeitliche Verlauf in den einzelnen Geweben unterschiedlich gestaltete. Im Hepatopankreas zeigte sich für beide zyklische Nukleotide 5 min nach CHH-Injektion ein Maximum. Beim Schwanzmuskel zeigten die cAMP-Gehalte nach 10 min ein Maximum, welches bei den cGMP-Werten auch nach 20 min noch nicht erreicht war. Die cGMP- und cAMP-Gehalte erreichten bei Antennendrüse und Integument nach 2 min ein Maximum, beim Herzen nach 5 min. Zusätzlich zu diesen *in vivo* Studien wurden für den Hepatopankreas weitere *in vitro* Studien durchgeführt. Dabei stiegen im Laufe der Präinkubationszeit die cAMP-Gehalte so stark an, so dass ein Effekt des CHH nicht mehr zu beobachten war. Auf cGMP-Ebene blieb dieser unspezifische Anstieg im Laufe der Präinkubationszeit aus und nach CHH-Zugabe erfolgte

eine deutliche Zunahme des cGMP-Gehaltes mit einem Maximum nach 5 min. Begleitet wurde dieser Effekt von einer Glucose-Freisetzung ins Inkubationsmedium.

Die beobachteten Effekte des CHH auf die Gehalte an zyklischen Nukleotiden lieferten Hinweise auf verschiedene Gewebe, die als Zielorgane für CHH in Frage kommen. Dabei stehen bei Hepatopankreas und Schwanzmuskel von *Orconectes limosus* die CHH-Effekte ganz eindeutig in Zusammenhang mit dem Glykogenstoffwechsel und Hyperglykämie. Der Nachweis der physiologischen Bedeutung der CHH-Effekte bei den übrigen Geweben steht allerdings noch aus.

Die Untersuchungen von Sedlmeier (1985) an Schwanzmuskelgewebe bewiesen, dass der Anstieg der cAMP-Gehalte unter Einfluss von CHH auf eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase zurückzuführen ist und nicht auf einer Inhibierung der Phosphodiesterase beruht. *In vitro* Untersuchungen mit Membranpräparationen führten zu derselben Schlussfolgerung (Dieberg und Sedlmeier, 1984). Diese wurde insofern bestätigt, als CHH zu einer gesteigerten Aktivität der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterase im Schwanzmuskel führte. Zudem korrelierte der zeitliche Verlauf der Aktivierung der Enzymaktivitäten mit dem Verlauf der Gehalte an zyklischen Nukleotiden. Der Effekt von CHH auf die Aktivität der Guanylat-Zyklase wurde in den beschriebenen Studien nicht untersucht, jedoch fand man 90 % des Enzyms in membrangebundener Form (Sedlmeier, 1985).

Nachdem die CHH-Wirkung möglicherweise von zyklischen Nukleotiden vermittelt wird, sollte auch eine Aktivierung der cAMP- oder cGMP-abhängigen Proteinkinasen nachweisbar sein. Ein entsprechender Befund ergab sich bei *Orconectes limosus*, bei dem eine Steigerung der Aktivitätsrate im Schwanzmuskel unter CHH-Einfluss gezeigt wurde (Sedlmeier, 1985). Diese korrelierte zeitlich ebenfalls mit dem Verlauf der Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden im Schwanzmuskel nach CHH-Injektion der Tiere. Es gibt Hinweise darauf, dass im Schwanzmuskelgewebe eine Proteinkinase vorliegt, die im Gegensatz zu den cAMP- oder cGMP-abhängigen Proteinkinasen bei Vertebraten cAMP und cGMP gleich gut bindet (Christ, 1984).

Neben den bereits beschriebenen Effekten des CHH auf Ebene der zyklischen Nukleotide in verschiedenen Organen wurden auch bei weiteren Crustaceen-Spezies ähnliche Effekte beobachtet. Dircksen et al. (2001) wiesen bei *Carcinus maenas* einen Anstieg der cGMP-Konzentrationen in Y-Organen *in vitro* unter CHH-Einfluss nach. Ein ähnlicher Effekt, wenn auch wesentlich schwächer, konnte für das PO-CHH gezeigt werden. Auch für das Herz wurde *in vitro* ein Anstieg der cGMP-Gehalte durch CHH beobachtet. Das PO-CHH hatte dagegen keine Wirkung auf das Herz. Bei *Homarus americanus* konnte durch *in vitro*

Experimente mit einem zunächst nicht näher charakterisierten Faktor aus der Sinusdrüse eine Erhöhung der cGMP-Konzentrationen in Schwanzmuskelgewebe provoziert werden. Zudem wurden auch bei weiteren Geweben wie Herz, Darm, Hepatopankreas, Hoden und Nervengewebe (Gehirn, Thorakalganglien, Abdominalganglien) Anstiege auf cGMP-Ebene verzeichnet (Goy et al., 1987). Die Aktivität wurde zwei Faktoren aus der Sinusdrüse zugeschrieben, von denen der wirksamere in einer folgenden Studie als ein Peptid teilidentifiziert wurde, dessen Aminosäurezusammensetzung auf eine Verwandtschaft mit der CHH-Familie hinwies (Pavloff und Goy, 1990). Nachdem CHH die Zyklase-Aktivität nur in Membranpräparationen, aber nicht in cytosolischen Fraktionen von Muskelgewebe stimulierte, wurde der Anstieg der cGMP-Gehalte im Gewebe unter CHH-Einfluss als Aktivierung einer membrangebundenen Guanylat-Zyklase interpretiert (Goy, 1990).

Aufgrund der Tatsache, dass bei *Orconectes limosus* Calmodulin im Schwanzmuskel nachgewiesen wurde (Hergenhahn et al., 1984) und die Adenylat-Zyklase (Sedlmeier und Dieberg, 1983) und die Guanylat-Zyklase (Riediger und Sedlmeier, 1985) durch Calcium-Ionen und Calmodulin reguliert werden, besteht durchaus die Möglichkeit, dass erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auch infolge einer CHH-Wirkung über die Phosphatidylinositol-Kaskade die Adenylat- und Guanylat-Zyklase aktivieren. Die Studien von Smullen et al. (1996) lieferten hierfür weitere Hinweise. Nach Inkubation von Hepatopankreas- und Muskelgewebe der Crustaceen-Spezies *Nephrops norvegicus* und *Carcinus maenas* mit Sinusdrüsenextrakt und bei *Carcinus maenas* zusätzlich mit isoliertem CHH konnte eine Zunahme der Inositol-1,4,5-triphosphat-Konzentration nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Rezeptoren der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie existierten lange Zeit nur Informationen aufgrund von klassischen Bindungsstudien. So konnten Kummer und Keller (1993) mit homologen Verdrängungsstudien an Membranpräparationen aus Hepatopankreasgewebe von *Carcinus maenas* und *Orconectes limosus* spezifische, hochaffine Bindungsstellen nachweisen. Ergänzende heterologe Verdrängungsstudien mit den CHHs beider Arten ergaben eine Spezies-Spezifität. Damit wurde die lange beobachtete systematische Gruppen-Spezifität des hyperglykämischen Effektes bestätigt (Keller et al., 1985). Bindungsstudien an Y-Organen von *Carcinus maenas* führten zu der Erkenntnis, dass dieses Gewebe spezifische Rezeptoren für CHH und MIH besitzt und zudem Hepatopankreas, Herz und Epidermis CHH spezifisch binden (Webster, 1993; Webster und Chung, 1999).

Ein interessanter Beitrag zur möglichen Natur des CHH-Rezeptors und zum Wirkungsmechanismus wurde erst kürzlich von Liu et al. (2004) geliefert. Es konnte eine cDNA (PcGC-M2) kloniert werden, die eine membrangebundene Guanylat-Zyklase aus dem Schwanzmuskel von *Procambarus clarkii* codiert. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte charakteristische Erkennungsdomänen von membrangebundenen Guanylat-Zyklasten und zudem Homologien mit Guanylat-Zyklasten von *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae*. Die Expression des PcGC-M2-Transkriptes wurde in zahlreichen Geweben nachgewiesen, darunter Schwanzmuskel, Hepatopankreas, Herz, Ovarien, Hoden und Kiemen. Für alle diese Gewebe konnte in früheren Studien eine funktionelle Regulation durch CHH und/oder CHH-Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Sedlmeier und Keller, 1981; Goy, 1990; Khayat et al., 1998; Spanings-Pierrot et al., 2000), doch ist bisher nicht geklärt, ob CHH tatsächlich der natürliche Ligand dieser Guanylatzyklase ist. Versuche zur Identifizierung des CHH-Rezeptors, z. B. durch „reverse pharmacology“ strategy (Grimmelikhuijzen und Cazzamali, 2002), stehen zur Zeit noch aus.

Abgesehen von der zuvor ausführlich erläuterten hyperglykämischen Funktion des CHH wurden verschiedene andere biologische Aktivitäten des CHH beschrieben. Dazu gehört unter anderem die Kontrolle der Enzymsekretion, speziell die Amylasesekretion im Hepatopankreas. Die Bedeutung der CHH-vermittelten Amylasesekretion, auch im Hinblick auf die Rolle des CHH im Glykogenmetabolismus, wurde bislang jedoch nicht vollständig geklärt (Sedlmeier, 1988). Die Studien von Santos et al. (1997) wiesen dem CHH eine Rolle in der Kontrolle des Lipidstoffwechsels zu. Eine Beteiligung des CHH an der Osmoregulation wurde von Spanings-Pierrot et al. (2000) und Serrano et al. (2003) bewiesen. Bei der Krabbe *Pachygrapsus marmoratus* zeigte sich eine direkte Wirkung des CHH auf den Ionentransport in den Kiemen in Form eines erhöhten Natrium-Einstroms. Die Untersuchungen an *Astacus leptodactylus* ergaben eine erhöhte Osmolalität der Hämolymphe und erhöhte Natrium-Konzentrationen 24 h nach Injektion von D-Phe<sup>3</sup>-CHH. Das L-Phe<sup>3</sup>-CHH bewirkte keine Veränderung der Osmolalität und erhöhte die Natrium-Konzentrationen im Verhältnis schwächer. Ähnliche Beobachtungen wurden bei *Homarus americanus* gemacht. Bei an Bedingungen reduzierter Salinität angepassten Tieren wurde durch das später als D-Phe<sup>3</sup>-Isoform identifizierte CHH (Soyez et al., 1994) eine Hyperosmoregulation stimuliert (Charmantier-Daures et al., 1994).

Eine Beteiligung von CHH an der massiven Wasseraufnahme während der Häutung wurde bei der Krabbenart *Carcinus maenas* gezeigt. Während der Vorhäutungszeit konnte in

erstmalig entdeckten endokrinen Zellen des Vorder- und Enddarms die Expression eines Peptides, identisch mit dem Sinusdrüsen-CHH, demonstriert werden (Chung et al., 1999). Diese endokrinen Zellen schütteten das Peptid nahezu vollständig aus, und in der späten Vorhäutungsphase (D<sub>4</sub>-Stadium) und während der Ecdysis war infolgedessen ein dramatischer Anstieg der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe zu beobachten, der gegen Ende der Ecdysisphase (E<sub>50</sub>-E<sub>100</sub>) ein Maximum erreichte. Unmittelbar nach Vollendung der Ecdysis kehrten die CHH-Konzentrationen wieder auf ein Grundniveau zurück (innerhalb 1 h). Als Funktion wurde dem CHH eine direkte Beteiligung an der Wasser- und Ionenaufnahme über das Darmepithel während der Häutung zugeschrieben. Dabei könnte die Freisetzung des CHH aus den endokrinen Darmzellen aufgrund ihrer anatomischen Lage durch mechanische Reizung infolge eines veränderten pylorischen Rhythmus während der Häutung ausgelöst werden.

Neben dieser Form der Beteiligung des CHH an der Häutung sind noch weitere regulatorische Funktionen auf Ebene der Y-Organe bekannt. So wurde sowohl für *Carcinus maenas* als auch für *Orconectes limosus* und *Procambarus clarkii* eine inhibitorische Wirkung des CHH auf die Ecdysteroidsynthese in den Y-Organen nachgewiesen, die allerdings geringer ist als die des MIH aus denselben Arten (Webster und Keller, 1986; Keller et al., 1999; Yasuda et al., 1994). Hierbei zeigten sich die D-Phe<sup>3</sup>-Isoformen der CHHs beider Flusskrebsarten als deutlich wirksamer im Vergleich zu den L-Phe<sup>3</sup>-Isoformen. Die inhibitorische Wirkung von CHH und MIH auf die Ecdysteroidsynthese wurde bei *Carcinus maenas* zusätzlich im Hinblick auf den Häutungszyklus der Tiere untersucht. Es zeigte sich, dass die Y-Organe in der Vorhäutungsphase nicht auf die Peptide MIH und CHH reagierten, im Laufe der späten Nachhäutung (C<sub>1</sub>) jedoch wieder sensitiv für deren Wirkung wurden (Chung und Webster, 2003). Eine ähnliche Reduktion der biologischen Aktivität zeigte sich auch auf cGMP-Ebene. Die durchgeführten Rezeptorbindungsstudien konnten die fehlenden Effekte nicht erklären, da es keine Änderung der Bindungscharakteristik der Rezeptoren über den Häutungszyklus gab und eine Reduktion der Rezeptorzahl in der Vorhäutungsphase nicht nachweisbar war. Da die Expression und Biosynthese beider Neuropeptide über den Häutungszyklus nicht variierte, wird die Kontrolle der Häutung vermutlich nicht über einen Mechanismus auf dieser Ebene gesteuert. Vielmehr vermutete man, dass die Kontrolle der Häutung auf Ebene der intrazellulären Signaltransduktion im Y-Organ erfolgt.

---

Auch in Hinblick auf die Kontrolle der Reproduktion konnten für CHH biologische Aktivitäten nachgewiesen werden. Bei *Procambarus clarkii* wurde die Synthese von Methylfarnesoat durch CHH-Isoformen inhibiert (Laufer et al., 1994). Ähnliche Befunde ergaben sich bei *Libinia emarginata* infolge der Wirkung verschiedener Peptide vom CHH-Typ (Liu et al., 1997). Auch in den Mandibularorganen von *Orconectes limosus* und *Carcinus maenas* wurde unter CHH-Einfluss die Synthese des als gonadenstimulierendes Hormon diskutierten Methylfarnesoat inhibiert (Keller et al., 1999). Ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation der Reproduktion wurde für das CHH eine Hemmung der Proteinsynthese in der androgenen Drüse gezeigt (Bulau et al., 2002). Auch eine Hemmung der Proteinsynthese in Ovarien von *Penaeus semisulcatus* durch CHH-Isoformen von *Penaeus japonicus* (Khayat et al., 1998) spricht für die Beteiligung von CHH an der Kontrolle der Gonadenreifung.

### 1.3 Aufgaben- und Problemstellung

Seit den ersten Strukturaufklärungen von zwei Neuropeptiden der CHH/MIH/GIH- Familie, dem CHH und MIH von *Carcinus maenas*, ist im Verlauf der letzten 18 Jahre von vielen Labors eine große Zahl von Peptiden dieser Familie aus Vertretern verschiedener Dekapodengruppen identifiziert worden. Innerhalb der Infraordnung Astacidea sind allerdings nur die Aminosäuresequenzen von CHHs dreier amerikanischer Flusskrebsarten (Camboridae), des Hummers *Homarus americanus* (Nephropidae) und des australischen Flusskrebses *Cherax destructor* (Parastacidae) bekannt. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Strukturaufklärung des CHH einer europäischen Art, dem Edelkrebs *Astacus astacus* (Astacidae) zur Kenntnis der Flusskrebs-CHHs beizutragen.

Im Hinblick auf evolutionäre Gesichtspunkte stellte sich u.a. die Frage, ob bei dieser Art, wie bei den amerikanischen Flusskrebsen, nur eine genetische Variante des CHH existiert oder ob, wie beim Hummer und australischen Flusskrebs, zwei Varianten nachweisbar sind. Die Methode der Wahl hierfür ist die HPLC, durch die auch sehr ähnliche Peptide eindeutig getrennt werden können und die gleichzeitig die Isolierung von genügend Material für die Strukturaufklärung erlaubt. Für die Sequenzierung sollte hauptsächlich die neuere, elegante massenspektrometrische Methode benutzt werden, erforderlichenfalls ergänzt durch Edman-Sequenzierung und Aminosäureanalyse.

Neben dem Nachweis typischer posttranslationaler Modifikationen innerhalb der CHH-Familie, wie N- und C-terminaler Blockierung, sollte besondere Aufmerksamkeit dem Auftreten von Isoformen, die durch L- zu D-Isomerisierung von Aminosäureresten charakterisiert sind, gewidmet werden. Die posttranslationale Isomerisierung von Phe<sup>3</sup> ist bisher bei einigen CHHs aus der Gruppe der Astacidea (nicht bei anderen Dekapoden) beschrieben worden, und die eigenen Untersuchungen sollten einen weiteren Beitrag zu unserer Kenntnis hinsichtlich einer allgemeineren Verbreitung dieses Phänomens liefern.

Die meisten Arbeiten über die Neuropeptide der CHH-Subfamilie betreffen die Strukturaufklärung. Dagegen ist über die physiologischen Funktionen immer noch wenig bekannt. Die bisherigen, isolierten Befunde wurden überwiegend an verschiedenen Arten erhoben, und nur selten wurden bisher an ein und derselben Art Studien durchgeführt, bei denen die Isolierung und Strukturaufklärung von CHH durch Untersuchungen über physiologische Aspekte wie Hämolymphtiter, Sekretionsdynamik, Regulation der Sekretion

etc. und physiologische Effekte ergänzt wurden. Es war das Ziel dieser Arbeit, eine derartige Studie an *Astacus astacus* durchzuführen.

Der Schwerpunkt lag dabei auf der regulatorischen Funktion des CHH im Kohlenhydratstoffwechsel. Das wesentliche Werkzeug hierfür war ein empfindlicher ELISA zur Bestimmung des CHH-Titers in der Hämolymphe. Dieser bereits verfügbare ELISA war für das CHH des amerikanischen Flusskrebse *Orconectes limosus* entwickelt worden und wurde in dieser Arbeit für das *Astacus*-CHH adaptiert. Einige ergänzende Versuche wurden auch an *Orconectes* durchgeführt.

Aus der Literatur sind zahlreiche, z.T. indirekte Befunde bekannt, die deutlich machen, dass Umweltstress wie Hunger, Temperaturänderungen und Hypoxie zu einer erhöhten CHH-Sekretion führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte bei *Astacus astacus* der Hypoxiestress eingehender untersucht werden. Im wesentlichen sollte die Arbeitshypothese geprüft werden, ob CHH eine Bedeutung für die Adaption der Tiere an Hypoxie durch Mobilisierung von Glucose für den anaeroben Stoffwechsel hat. Neben der Hypoxie durch Verminderung des O<sub>2</sub>-Angebots im Milieu sollte der Effekt der natürlicherweise mit der Häutung verbundenen physiologischen Hypoxie untersucht werden.

In einem dritten Teilprojekt sollte ein weiterer Aspekt der Physiologie von CHH behandelt werden. Bisherige Befunde ergaben klare Hinweise, dass CHH ein multifunktionelles Hormon ist. Dies impliziert, dass CHH auf verschiedene Zielgewebe wirkt. Der Nachweis der Zielgewebe sollte daher das Konzept der Multifunktionalität stützen und Grundlagen für weiterführende Untersuchungen über Effekte von CHH in den einzelnen Organen liefern. Als Kriterium der Natur eines Gewebes als Zielgewebe wurde der Effekt auf die zyklischen Nukleotidsysteme, cAMP und cGMP, gewählt. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege kann als Hinweis auf das Vorhandensein von CHH-Rezeptoren, durch die ein Gewebe als Zielgewebe definiert ist, gewertet werden. Bei diesen Untersuchungen konnte ich an bereits vorliegende Befunde anknüpfen. Sie sollten hier ergänzt und ausgeweitet werden, indem a) möglichst viele Gewebe einbezogen wurden und b) die Versuche *in vivo* mit genau definierten Hormondosen, die möglichst als physiologisch oder angenähert physiologisch anzusehen waren, durchgeführt werden sollten. Diese Versuche wurden am amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus* durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Tierhaltung

Europäische Edelkrebse, *Astacus astacus*, wurden von einem Züchter bezogen (Dr. Max Keller, erste bayerische Satzkrebszucht Augsburg).

Die amerikanischen Flusskrebse, *Orconectes limosus*, stammten aus der Havel und wurden von einem kommerziellen Fischer (Fischerei Liptow, Berlin) geliefert. Beide Tierarten wurden in großen Durchfluss-Sammelbecken bei einer Temperatur von 14-16 °C und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h (L:D) gehalten.

Die Fütterung der Tiere erfolgte zweimal wöchentlich. Dabei wurden den Tieren wechselweise rote Mückenlarven, Mohrrübenschnitzel, tiefgefrorene Erbsen, sowie Grünfutterchips der Firma Astra und Tetra WaferMix angeboten. *Astacus astacus* wurde zusätzlich noch mit gründlich gewässertem Seelachsfilet gefüttert.

Zur Vorbereitung der physiologischen Untersuchungen wurden die ausschließlich männlichen Tiere in Zwischenhäutungsphase mindestens 24 h vorher in Einzelhaltungsbecken mit angeschlossenem Filtersystem umgesetzt, um Stresseffekte zu minimieren. Die Maße der Einzelkammern waren 19,5 x 19,5 x 17,5 cm für *Astacus astacus* bzw. 10 x 10 x 10 cm für *Orconectes limosus*. Zudem wurde die Fütterung der Tiere mindestens 24 h bis 48 h vor Beginn eines Versuches unterbrochen.

### 2.2 Präparation der Sinusdrüsen

Zum Entfernen der Augensterne wurden die Tiere zunächst für 30 min durch Eiskühlung anästhesiert. Anschließend wurden die Augensterne mit einer Iridektomieschere abgetrennt und in eiskalte physiologische Saline (Van Harreveld, 1936) überführt. Wegen der Größe der Augensterne wurden die Wunden bei *Astacus astacus* durch Aufdrücken eines heißen Spatels kauterisiert, um einen starken Hämolymphverlust zu vermeiden. Dies war bei *Orconectes limosus* nicht erforderlich. Zusätzlich wurden beide Tierarten nach Entfernung der Augensterne für weitere 20 bis 30 min auf Eis gehalten, um den Hämolympffluss zu verlangsamen und größere Verluste aus der Wundstelle zu vermeiden.

Zur Präparation der Sinusdrüsen wurde die Kutikula der Augensterne entfernt und die Sinusdrüse, ein stark opaleszierendes Gewebe, in eiskalter Van Harreveld Saline sorgfältig aus dem Ganglienkomplex herauspräpariert, von Fremdgewebe befreit und in ein Gefäß mit

2 N Essigsäure überführt, das permanent in flüssigen Stickstoff eingetaucht war. Das schnelle Einfrieren der Sinusdrüsen ist insofern von entscheidender Bedeutung für die chromatographische Trennung der Extrakte, als sehr viel weniger peaks, die Abbauprodukte darstellen, auftreten als bei länger dauernder Sammlung der Sinusdrüsen bei 0-4°C. Die Sinusdrüsen wurden wie von Webster und Keller (1986) beschrieben extrahiert. Hierzu wurden sie für 3 x 30 sec in der aufgetauten 2 N Essigsäure mit einem Ultraschallstab beschallt und zwischenzeitlich auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in 2 N Essigsäure resuspendiert und erneut beschallt. Insgesamt wurde dieser Vorgang 3mal wiederholt und die Überstände jeweils vereinigt. Der Sinusdrüsenextrakt wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant) auf ein Volumen von 150-200 µl eingengt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.3 Isolierung und Charakterisierung des hyperglykämischen Hormons aus Sinusdrüsen von *Astacus astacus***

#### **2.3.1 Chromatographische Trennung von Sinusdrüsenextrakt**

Die chromatographische Trennung der Sinusdrüsenextrakte wurde an einem RP-HPLC-System der Firma Waters GmbH (Eschborn) mit den folgenden Systemkomponenten durchgeführt: zwei Model 510 Pumpen, eine Gradientensteuerungseinheit (Modell 680), eine U6K-Injektionseinheit sowie ein UV-Detektor (Modell 481). Zur Aufzeichnung der Chromatogramme und deren weitere Bearbeitung wurde die Software McDAcq32 Chromatography Data System, Version 1.51 (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg) verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die eingengten Extrakte zunächst 2 min im Ultraschallbad beschallt und 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Es wurden zwei HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften verwendet: 1) Eine µBondaPak Phenylsäule (3,9 x 300 mm, Waters) mit Vorsäule. Die Trennung erfolgte hier mit einem linearen Gradienten von 30-80 % Lösung B in 60 min bei einer Flussrate von 0,9 ml/min. 2) Eine Luna® 5µ-Phenyl-Hexyl-Säule (4,6 x 250 mm, Phenomenex, Aschaffenburg). Bei dieser wurde ein linearer Gradient von 45-60 % Lösung B in 60 min bei ansonsten identischen Bedingungen angelegt. Als polares Lösungsmittel wurde 0,11 % TFA (Lösung A) eingesetzt, Lösung B bestand aus 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA. Die Messung der Absorption erfolgte bei 210 nm und die

Fraktionen wurden manuell aufgefangen. Die Luna-Säule wurde eingesetzt, nachdem Trennungen von Sinusdrüsenextrakt gezeigt hatten, dass strukturell sehr ähnliche CHH-Isoformen und andere peaks im Elutionsbereich des CHH (die bei *Orconectes limosus* bekannt sind) bis zur Basislinie getrennt werden; so etwa die D-Phe<sup>3</sup>- und L-Phe<sup>3</sup>-Isomere von CHH. Dieses Säulenmaterial liefert offensichtlich bessere Trennungen von CHH-Neuropeptiden als die übrigen, gängigen Materialien. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass die guten Trenneigenschaften der Säule mit erheblich größeren Materialverlusten verbunden sind. Demzufolge wurde der Einsatz der Trennsäulen dem jeweiligen Bedarf angepasst. Die Phenyl-Hexyl-Säule wurde für analytische Untersuchungen der Sinusdrüsenextrakte auf enthaltene Neuropeptide eingesetzt, die Phenyl-Säule zur präparativen Reinigung von CHH bei höherem Materialbedarf.

### 2.3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen

#### 2.3.2.1 Tryptische CHH-Spaltung im Gel nach Elektrophorese

Zur Vorbereitung auf die proteolytische Spaltung mittels Trypsin wurden die RP-HPLC-gereinigten CHH-Fraktionen zunächst einer eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die aus 12 Sinusdrüsen extrahierten Peptide wurden mit einem 12 % Bis-Tris Fertiggel der Firma Invitrogen (Karlsruhe) in einer Xcell II Apparatur (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bei einer Spannung von 200 V (konstant) getrennt. Nach einer Laufzeit von 45-60 min erfolgte eine 30minütige Fixierung in 12,5 % Trichloressigsäure. Anschließend wurde das Gel für 30-60 min mit Coomassie-Lösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in 20 % Methanol mit 5 % Essigsäure) gefärbt und zuletzt in Entfärbelösung (30 % Methanol mit 5 % Essigsäure) überführt. Nach Entfärbung über Nacht wurden die markierten Peptidbanden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Um den Coomassie-Farbstoff zu entfernen wurden die Gelstückchen in verschiedenen Lösungen nach folgendem Schema inkubiert:

1. 30 min: 25 nM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 50 % Methanol:A. dest. (v/v)
2. 30 min: Essigsäure:Methanol:A. dest. (10/45/45, v/v/v)
3. 30 min: A. dest.
4. 15 min: Acetonitril

Das Volumen der eingesetzten Lösungen (in der Regel 100 µl) wurde in Abhängigkeit von der Größe der Gelstückchen gewählt.

Zur tryptischen Spaltung, die in einer Modifikation des Verfahrens von Shevchenko et al. (1996) durchgeführt wurde, wurden die Gelbanden im SpeedVac getrocknet. Zur Reduktion der Disulfidbrücken der Peptide wurden sie in 50 µl 10 mM DTT in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  eine Stunde bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden die Gelbanden mit 50 µl 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen. Um die Rückbildung der Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die SH-Gruppen mit 50 µl 55 mM Iodacetamid in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss alkyliert. Nach erneutem Waschen mit 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und Acetonitril für jeweils 20 min wurden die Gelbanden abermals im SpeedVac getrocknet und in 20 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8,5), enthaltend 300 ng Trypsin (sequencing grade, Boehringer, Mannheim), suspendiert. Nach völliger Aufnahme der Trypsinlösung durch die Gelstückchen wurden diese mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  überschichtet und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Extraktion der Spaltpeptide aus den Gelstücken erfolgte in nachfolgend beschriebenen Schritten:

1. 20 min: 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
2. 2 x 20 min: 5 % Ameisensäure in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
3. 20 min: 100 % Acetonitril

Von jeder Lösung wurden 100 µl verwendet. Das Volumen wurde gegebenenfalls der Größe der Gelstückchen angepasst.

Nach Vereinigung der einzelnen Extraktionslösungen wurden diese im SpeedVac bis zur Trockene eingengt, die extrahierten Spaltpeptide in 8 µl A. dest. aufgenommen und über ZipTips $\text{C}_{18}$ -Pipettenspitzen (Millipore, Schwalbach) entsalzt.

### ***2.3.2.2 Tryptische Spaltung von CHH in Lösung und Aufreinigung der Spaltfragmente***

Hierfür wurden 80 SD-Äquivalente des über die µBondaPak Phenylsäule gereinigten Peptids eingesetzt. In Anlehnung an das von Tarr (1986a) beschriebene Verfahren zur chemischen Modifikation von Cysteinresten wurde das CHH reduziert und alkyliert. Die entsprechende Peptid-Fraktion wurde dazu bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde das Peptid in 50 µl Präinkubationspuffer (100 mM Tris-HCL (pH 8,3), 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 10 mM DTT) gelöst und unter Stickstoff für 4 h bei 33°C im Dunkeln inkubiert (Kegel et al., 1991). Im Folgenden wurde der Ansatz mit 10 µl Alkylierungsreagenz (2,2 µl 4-Vinylpyridin (Sigma-Aldrich, Steinheim) ad 100 µl Präinkubationspuffer) versetzt, gründlich vermischt und mit Stickstoff begast. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 33°C im

Dunkeln. Vor der HPLC-Aufreinigung wurde der Reaktionsansatz mit Lösung A (0,11 % TFA) auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. Die Isolation des pyridylethylierten CHH erfolgte über eine  $\mu$ BondaPak Phenylsäule (3,9 x 300 mm, Waters) bei einem Gradienten von 45-90 % Lösung B in 60 min. Die Absorption wurde bei 220 nm gemessen, die Flussrate betrug 0,9 ml/min. Lösung A: 0,11 % TFA; Lösung B: 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA. Die pyridylethylierte CHH-Fraktion wurde in der Vakuumzentrifuge eingeengt.

Zur Spaltung wurde das modifizierte Peptid in 42,5  $\mu$ l Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 8,5) gelöst. Der Lösung wurden 5  $\mu$ l Trypsinlösung (25  $\mu$ g Trypsin (sequencing grade, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gelöst in 250  $\mu$ l A. dest.) und 2,5  $\mu$ l Acetonitril zugefügt. Die Inkubationszeit betrug 18 h bei 37°C. Zur Auftrennung der tryptischen Spaltfragmente wurde der Ansatz mit 100  $\mu$ l Lösung A aufgefüllt und eine HPLC mit einer Luna® 5 $\mu$ -Phenyl-Hexyl-Säule (4,6 x 250 mm) bei einem Gradienten von 7-68 % Lösung B in 70 min gefolgt von 68-75 % Lösung B in 28 min durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,9 ml/min, die Fraktionierung der Spaltpeptide wurde auf Grundlage der Absorptionsmessung bei 220 nm manuell durchgeführt. Als Lösung A wurde 0,11 % TFA eingesetzt, Lösung B bestand in diesem Falle aus 80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA.

### ***2.3.2.3 Nano-ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie***

Alle Experimente zur Massenbestimmung der intakten Peptide und zur Identifizierung und Sequenzierung der tryptischen Spaltpeptide von CHH mittels ESI-Q-TOF MS wurden freundlicherweise von Dr. Patrick Bulau am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster durchgeführt. Die Methodik sei daher nur kurz beschrieben. Es wurde ein Quadrupol-Flugzeit (Q-TOF) Massenspektrometer der Firma Micromass (Manchester, Großbritannien) eingesetzt. Für die ESI-Q-TOF Analyse von tryptischen Peptiden wurde ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Essigsäure (50/48/2, v/v/v) als Lösungsmittel verwendet. Zur Massenbestimmung des intakten Peptidhormons wurde ein Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch (50/25/25, v/v/v) als Lösungsmittel eingesetzt. Alle Peptidproben wurden ausschließlich im positiven Ionenmodus untersucht. Die Messbedingungen für MS und MS/MS-Experimente wurden für jeden Versuch optimiert. Die Kapillarspannung lag im allgemeinen bei 1-1,4 kV, die Konusspannung zwischen 40 und 70 V und die Temperatur der Ionenquelle betrug 80°C. Die Fragmentierungsbedingungen wurden durch Variation der Beschleunigungsspannung (20-80 V) und des Drucks in der Kollisionszelle ( $3-4 \times 10^{-5}$  mbar) optimiert.

Die Kalibrierung erfolgte mit einer Lösung von Myoglobin (12,5 pmol/ $\mu$ l) aus Pferdeherz (Sigma). Durch eine Serie hoher Ladungszustände lässt sich ein  $m/z$ -Bereich von 500-2500 kalibrieren. Die Auswertung der Massenspektren der Fragmentationen wurde durch bereits vorliegende Sequenzinformationen für Peptide der CHH-Hormonfamilie von Crustaceen erleichtert. (Lacombe et al., 1999; Böcking et al., 2002). Daraus lassen sich Sequenzabschnitte ableiten, die bei allen bislang untersuchten decapoden Spezies konserviert sind. Somit konnte in den CID-Spektren der proteolytischen Spaltpeptide nach typischen Massendifferenzen gesucht werden, die jenen konservierten Sequenzabschnitten entsprechen.

### 2.3.3 Edman-Sequenzierung

Nach HPLC-Auftrennung der tryptischen Spaltfragmente des CHH konnte das 22 Aminosäuren lange C-terminale Peptid durch Massenspektrometrie nicht vollständig charakterisiert werden. Es wurde deshalb mittels Edman-Abbau sequenziert. Diese Sequenzanalyse wurde am Institut für Physiologische Chemie der Universität Münster an einem automatisierten Edman-Sequenzierer (Protein-/Peptid-Sequencer, Model Procise 492-01, Applied Biosystems, Foster City, USA) nach dem pulsed liquid-Verfahren durchgeführt.

### 2.3.4 Aminosäureanalyse

Abgesehen von den 22 C-terminalen Aminosäuren wurde das CHH von *Astacus astacus* vollständig durch massenspektrometrische Analysen sequenziert. Aufgrund ihrer identischen molekularen Massen ist eine Unterscheidung von Leucin (Leu) und Isoleucin (Ile) mittels Massenspektrometrie jedoch nicht möglich. Daher wurden die Leu- oder Ile-haltigen tryptischen Spaltpeptide einer Aminosäureanalyse zugeführt. Zur Überprüfung der Analyseergebnisse für die einzelnen Spaltpeptide, insbesondere des Fragmentes 19-21, das bei der HPLC mit dem Lösungsmittelpeak eluiert, wurde zusätzlich intaktes CHH hydrolysiert und ebenfalls einer Aminosäureanalyse unterzogen. Das sich daraus ergebende Verhältnis zwischen Leucin und Isoleucin sollte mit dem aus den Einzelanalysen der Spaltpeptide bestimmten Verhältnis übereinstimmen.

Zur Hydrolyse wurden die in 0,75-3,75  $\mu$ l A. dest. gelösten Peptide in spezielle Hydrolyseröhrchen überführt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Anschließend wurde das Hydrolysegefäß nach Tarr (1986b) mit 300  $\mu$ l konzentrierter Salzsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim), einigen Phenolkristallen (Sigma-Aldrich) und den Hydrolyseröhrchen beschildert und mit einem Schraubdeckel fest verschlossen. Über ein Ventil im Schraubdeckel

wurde die Luft durch wechselweise Evakuierung und Einleiten von Stickstoff entfernt. Somit entstand im Hydrolysegefäß eine mit Salzsäure gesättigte Atmosphäre. Die Hydrolyse der Peptide erfolgte im Vakuum für 1,5 h bei 150°C. Danach wurde das Hydrolysegefäß wieder belüftet und die Hydrolyseröhrchen wurden 5-10 min in der Vakuumzentrifuge zentrifugiert.

Die Analyse der Aminosäuren erfolgte durch Vorsäulenderivatisierung mit FMOC/ADAM. Hierbei wird durch Anlagerung von FMOC (9-Fluorenyloxycarbonylchlorid) deren Aminogruppe derivatisiert.

Die getrockneten Hydrolysate der CHH-Spaltpeptide wurden für die Vorsäulenderivatisierung in 10 µl A. dest. gelöst. Dann wurden 10 µl Boratpuffer (0,5 M, pH 7,7) und 20 µl FMOC zugesetzt und der Derivatisierungsansatz 45 sec bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl ADAM (1-Aminoadamantan, 4,56 mg in 300 µl Boratpuffer + 300 µl Aceton), welches den Überschuss an FMOC umsetzt. Nach weiteren 45 sec Inkubationszeit bei RT wurde der Ansatz mit 35 µl Lösungsmittel A versetzt. Die Trennung der derivatisierten Aminosäuren wurde auf einer beheizbaren GROM-SIL FMOC-2-Säule (4 x 250 mm, GROM Analytik + HPLC GmbH, Rottenburg-Hailfingen) bei 40°C durchgeführt. Es wurde ein Gradient von 5-6 % Lösung B in 15 min, gefolgt von 5 min isokratischen Bedingungen und den Gradienten 6-40 % Lösung B in 34 min, 40-70 % Lösung B in 10 min und 70-100 % in 5 min angelegt. Die Flussrate des Lösungsmittels betrug 1,3 ml/min. Als Lösung A wurde 20 % Acetonitril in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,2) und als Lösung B 80 % Acetonitril in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,2) eingesetzt. Die Detektion der FMOC-Aminosäuren erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei 310 nm (Anregungswellenlänge: 263 nm). Bei der Aminosäureanalyse wurden folgende Instrumente eingesetzt: eine Gradientensteuerungseinheit mit 3 Pumpen (Waters 600 Multisolvent Delivery System), ein Fluoreszenzdetektor (Model 821-FP Intelligent Spectrofluorometer, Japan Spectroscopic Co., Ltd), ein automatischer Probengeber (Modell BT9100E, Eppendorf Biotronik, Maintal) sowie ein Schreiber (Model C-R1B Chromatopac, Shimadzu GmbH) zur Aufzeichnung der Chromatogramme. Zusätzlich wurden die Chromatogramme der Analysenläufe mit der Software McDAcq32 Chromatography Data System, Version 1.51 (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg) aufgenommen. Zur Identifizierung der Aminosäuren im Chromatogramm wurde ein Standard-Aminosäuregemisch herangezogen. Dieses wurde ebenfalls mit FMOC/ADAM derivatisiert und unter gleichen Bedingungen chromatographiert. Pro Analyse wurden 12,5 bzw. 25 pmol der derivatisierten Standard-Aminosäuren, entsprechend 5 bzw. 10 µl des Derivatisierungsansatzes, eingesetzt. In Abhängigkeit von der geschätzten Menge an

hydrolysiertem CHH-Spaltpeptid wurden zwischen 50 und 95  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Derivatisierungsansätze injiziert.

### 2.3.5 Nachweis der L- und D-Phe<sup>3</sup>-Isoform des CHH von *Astacus astacus*

Zum Nachweis der L- bzw. D-Phe<sup>3</sup>-Isoform wurde Sinusdrüsen-CHH mittels HPLC über eine  $\mu\text{BondaPak}$  Phenylsäule (3,9 x 300 mm, Waters) gereinigt, pyridylethyliert und mit Trypsin gespalten (vgl. Kapitel 2.3.1 und 2.3.2.2). Die tryptischen Peptidfragmente wurden durch Chromatographie über eine 5 $\mu$ -Wide Pore C<sub>18</sub>-Säule (4,6 x 250 mm, J. T. Baker, Griesheim) aufgetrennt. Hierzu wurde ein linearer Gradient von 10-90 % Lösung B in 70 min verwendet (Lösung A: 0,11 % TFA; Lösung B: 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA). Die Flussrate betrug 0,9 ml/min und die UV-Absorption wurde bei 220 nm gemessen. Durch Vergleich des resultierenden Chromatogramms mit dem eines Trypsinverdaus des CHH B vom australischen Flusskrebis *Cherax destructor* (Bulau et al., 2003) konnten die beiden Isoformen anhand der Retentionszeiten der für beide Arten identischen N-terminalen Oktapeptide eindeutig identifiziert werden. Für das CHH B des australischen Flusskrebses wurden die L- und die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform von Bulau et al. (2003) mittels ELISA sowie einem von Scaloni et al. (1991) beschriebenen Verfahren bestimmt.

### 2.3.6 CHH-Quantifizierung

Die zur Durchführung physiologischer Untersuchungen erforderliche Quantifizierung des CHH erfolgte mittels Aminosäureanalyse. Hierzu wurde aus 44 Sinusdrüsen mittels HPLC über eine  $\mu\text{BondaPak}$  Phenylsäule (3,9 x 300 mm, Waters) wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben CHH aufgereinigt. Aus der 88  $\mu\text{l}$  umfassenden CHH-Fraktion, welche sowohl die L- als auch die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform enthielt, wurden 2  $\mu\text{l}$  entnommen und hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend einer Vorsäulenderivatisierung unterzogen und analysiert (vgl. Kapitel 2.3.4). Zur Berechnung der eingesetzten CHH-Menge wurden analog durchgeführte Trennläufe des Standard-Aminosäuregemisches (12,5 pmol bzw. 25 pmol pro Standard-Aminosäure) herangezogen. Anhand der Peakflächen der Aminosäuren Alanin, Leucin und Phenylalanin, welche mit der angewendeten Methode quantitativ besonders gut erfasst werden, wurde dann die CHH-Konzentration der eingesetzten Probe berechnet.

## 2.4 Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des CHH von *Astacus astacus* und vergleichende Untersuchungen bei *Orconectes limosus*

### 2.4.1 Hämolymphentnahme und –behandlung

Die Hämolympfproben von *Astacus astacus* (200 µl) wurden mittels Drummond Wiretrol-Kapillaren (100-200 µl, Drummond Scientific Company, Broomall (PA)), an deren Öffnung eine verkürzte Kanülenspitze (0,9 x 40 mm) über einen Polyethylenschlauch luftdicht befestigt war, entnommen. Bei *Orconectes limosus* (50 µl Probenvolumen) wurde eine kleinere Wiretrol-Kapillare (50-100 µl) ohne aufgesetzte Kanülenspitze verwendet. Die Entnahme erfolgte aus dem Blutsinus an der Basis des zweiten bis vierten Peraeopoden-Paares. Anschließend wurde die Hämolymphe sofort mit dem gleichen Volumen an Antikoagulans (s. u.) verdünnt und bei 4°C gelagert.

Zusammensetzung des Antikoagulans:	9,4 ml	PBS (0,1 M, pH 7,4; siehe CHH-ELISA)
	0,6 ml	6 %ige EDTA-Lsg.
	0,2 g	Glycinethylester

### 2.4.2 Dosis-Wirkungsbeziehung

Zur Untersuchung der Dosis-Abhängigkeit des hyperglykämischen Effektes bei *Astacus astacus* wurden männlichen Tieren von ca. 100 g Lebendgewicht definierte Mengen an CHH (Gemisch beider Isoformen) durch die Gelenkmembranen der Scheren injiziert. Dabei wurde das Peptid in Van Harreveld Saline so verdünnt, dass sich für jede CHH-Dosis (6,25; 12,5; 50; 62,50; 93,75 pmol) ein Injektionsvolumen von 10 µl ergab. Den Kontrolltieren wurden 10 µl Van Harreveld Saline injiziert. Jedem Tier wurden im Untersuchungszeitraum drei Hämolympfproben zu je 200 µl entnommen, und zwar eine sogenannte Nullprobe direkt vor der Injektion mit CHH bzw. Saline sowie weitere Proben nach 1 h und 2 h.

#### 2.4.2.1 Glucose-Bestimmung

Die Messung der Glucosekonzentration der Hämolympfproben erfolgte mit dem Testkit Glucose Wako 20R/30R (Wako Chemicals GmbH, Neuss). Das Versuchsprotokoll wurde im

Hinblick auf das begrenzte Probenvolumen zur Durchführung in Mikrotiterplatten modifiziert.

Zunächst wurde das Glucose-Reagenz 2a vollständig in 50 ml Reagenz 2 gelöst und in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt. Ausgehend von einem 100 mg/100 ml Glucose-Standard wurde eine Verdünnungsreihe (0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 mg/100 ml) angesetzt. Dabei wurde der Glucose-Standard jeweils mit A. dest. verdünnt. Da die Hämolympfproben 1:2 mit Antikoagulans verdünnt vorlagen, wurde auch jeder Einzelstandard 1:2 mit Antikoagulans verdünnt. Anschließend wurden jeweils 20 µl/well der Standards bzw. Proben dreifach bzw. doppelt in eine Mikrotiterplatte (Nunc Immuno<sup>TM</sup> Modules F16 Maxisorp) pipettiert und mit 150 µl Glucose-Reagenz (2+2a) versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 492 nm in einem Titertek Multiskan Plus MKII Photometer (Thermo Labsystems, Finnland) gemessen. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte über einen angeschlossenen Personal Computer durch ein spezielles EIA-Programm (EIA3 Version 2.0, Flow Laboratories).

### 2.4.3 CHH-ELISA

Die Messung des CHH-Gehaltes der Hämolympfproben erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISA für CHH. Dieser wurde in Anlehnung an das von Keller et. al (1994) beschriebene Verfahren unter Einsatz eines anti-*Orconectes limosus* CHH-Antikörpers durchgeführt.

#### 2.4.3.1 Pufferlösungen und Reagenzien für den CHH-ELISA

*Phosphat-Puffer (PB), 0,1 M, pH 8,0*

Lsg. A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O     17,790 g/l

Lsg. B: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                 13,609 g/l

Lsg. A mit Lsg. B auf pH 8,0 titrieren

*Primärer Antikörper*

Protein A-Sepharose gereinigte IgG-Fraktion aus anti-*O. limosus* CHH-Serum

Antikörper-Konzentration: 10 µg/ml in PB

*Sekundärer Antikörper, biotinyliert*

Protein A-Sepharose gereinigte, biotinylierte IgG-Fraktion aus anti-*O. limosus* CHH-Serum; Antikörper-Konzentration: 0,31 µg/ml in Probenpuffer

*Blockierungspuffer*

2 % BSA (Fraktion V) in PBS mit 0,02 % Natriumazid

*Phosphatgepufferte Saline (PBS), pH 7,2*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,80 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l

PBS 10fach konzentriert ansetzen, pH-Wert stimmt nach Verdünnung

*Waschpuffer (PBS-T)*

1ml Tween 20 (0,1 %) auf 1l PBS

*Probenpuffer*

2 % BSA (RIA grade) in PBS mit 0,02 % Natriumazid

*Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Boehringer, Mannheim)*

1:28000 vorverdünnte Stammlösung 1:10 in A. dest. verdünnen  
12,5 µl davon ad 35 ml mit PBS-T auffüllen

*Enzymsubstratlösung*

## 1. Citratpuffer (immer frisch ansetzen)

Lsg. A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O            1,78 g/50 ml  
Lsg. B: Citronensäuremonohydrat 1,05 g/50 ml  
31 ml Lsg. A mit 19 ml Lsg. B auf pH 4 titrieren

## 2. Substratlösung

4 mg        ABTS (2',2'-azino-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)  
10 ml       Citratpuffer  
3 µl        H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (immer zuletzt zugeben)  
Lösung erst kurz vor Gebrauch ansetzen und gut mischen

### 2.4.3.2 Durchführung des CHH-ELISA

#### Beschichtung der Mikrotiterplatten mit primärem Antikörper

1. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  des primären Antikörpers (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in jedes well (Nunc Immuno<sup>TM</sup>Modules F16 Maxisorp) pipettiert. Anschließend wurde die Platte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert.
2. Der Überstand wurde verworfen und die Platte viermal mit PB gewaschen.
3. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die wells mit 400  $\mu\text{l}$  Blockierungspuffer gefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.
4. Durch Ausschlagen der Platten wurde der Blockierungspuffer entfernt. Die beschichteten Platten wurden entweder direkt für Messungen eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Eingefrorene Platten waren bis zu vier Wochen nutzbar.

#### Probenauftragung und Nachweisreaktion

1. Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe (20-0,3125 fmol/100  $\mu\text{l}$ ), ausgehend von einer CHH-Stammlösung (2 pmol/100  $\mu\text{l}$ ), in Probenpuffer angesetzt.
2. Von den Standards und Proben wurden je 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  aufgetragen. Zur Ermittlung unspezifischer Bindungen (Leerwert) wurden 100  $\mu\text{l}$  Probenpuffer eingesetzt. Die Standards wurden immer dreifach, die Proben immer doppelt angesetzt. Anschließend folgte eine Inkubation bei 4°C (feuchte Kammer) über Nacht.
3. Nach Ausschlagen der Überstände wurde die Mikrotiterplatte viermal mit Waschpuffer (PBS-T) gewaschen.
4. Es erfolgte die Auftragung des sekundären, biotinylierten Antikörpers (0,31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Hierbei wurden pro well 100  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung pipettiert und anschließend über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
5. Die Antikörperlösung wurde durch Ausschlagen der Platte entfernt und diese viermal mit Waschpuffer gewaschen.
6. Zum Nachweis der gebundenen biotinylierten Antikörper wurden in jedes well 100  $\mu\text{l}$  des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates pipettiert und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.
7. Die Mikrotiterplatte wurde erneut ausgeschlagen und viermal mit Waschpuffer gewaschen.
8. Zuletzt wurden 100  $\mu\text{l}$  der Enzymsubstratlösung in jedes well gegeben. Daran schloss sich eine 45-60minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln an.

9. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm (Titertek Multiskan Plus MKII Photometer), die Auswertung der erhobenen Daten mit Hilfe des EIA3-Programms.

Sofern die Messungen der *Astacus astacus*-Proben mit dem *Orconectes limosus*-Standard erfolgten, wurden die berechneten CHH-Konzentrationen mit dem Kreuzreaktivitätsfaktor multipliziert. Nach Vorliegen eines quantifizierten CHH-Standards von *Astacus astacus* wurde dieser im ELISA eingesetzt, so dass diese Korrektur entfiel.

#### **2.4.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität von *Astacus astacus*-CHH mit anti-*Orconectes limosus* CHH-Serum**

Mangels eines Antikörpers gegen das neu sequenzierte CHH von *Astacus astacus* wurden die ELISA-Messungen der Hämolympheproben aus physiologischen Untersuchungen mit CHH von *Orconectes limosus* als Standard durchgeführt. Um genaue Aussagen über die absoluten physiologischen CHH-Titer in der Hämolymphe treffen zu können, wurde die Kreuzreaktivität als Maß für die Antigenerkennung durch das *Orconectes limosus*-Antiserum bestimmt. Hierzu wurde zunächst aus dem quantifizierten *Astacus astacus*-Material eine Stammlösung (20 pmol/ml Probenpuffer) angesetzt. Anschließend wurde eine Standardverdünnungsreihe (20-0,3125 fmol/100 µl) in Probenpuffer erstellt. Zur Ermittlung der Kreuzreaktivität wurden die CHH-Verdünnungsreihen der Flusskrebse *Astacus astacus* und *Orconectes limosus* im CHH-ELISA gemessen und direkt miteinander verglichen. Die Kreuzreaktivität wurde als Quotient aus den Antigenkonzentrationen beider CHH-Standards bei einer optischen Dichte von 0,50 berechnet.

#### **2.4.5 Bestimmung der *in vivo* Halbwertszeit von CHH**

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden 4 männlichen Tieren von je 95-100 g Lebendgewicht 25 pmol CHH durch die Gelenkmembranen der Scheren injiziert. Hämolympheproben wurden nach 2, 5, 10, 15, 30 und 60 min entnommen. Zusätzlich wurde eine Probe zur Bestimmung der endogenen Hormonkonzentration unmittelbar vor der Injektion genommen. Die Messung des CHH-Gehaltes der Hämolympheproben erfolgte mit dem CHH-ELISA.

#### 2.4.6 Feedback-Effekt von injizierter Glucose

a) *Astacus astacus*: Den Tieren wurde eine definierte Menge an Glucose (8 mg in 40 µl Van Harreveld Saline) durch die Gelenkmembranen der Scheren injiziert. Unmittelbar zuvor wurde eine Hämolympheprobe zur Kontrolle der CHH-Konzentration bei Versuchsbeginn entnommen (Nullprobe). Im Folgenden wurden Hämolympheproben nach unterschiedlichen Zeitintervallen (10, 20 bzw. 60 min) entnommen und im CHH-ELISA gemessen. Kontrolltiere erhielten 40 µl Van Harreveld Saline, und Hämolympheproben wurden in identischer Weise entnommen.

b) *Orconectes limosus*: Die Versuche wurden prinzipiell gleich angelegt, jedoch wurden aufgrund des geringeren Körpergewichtes (15-18 g) und der entsprechend geringeren Hämolymphemenge nur 2 mg Glucose in 10 µl Van Harreveld Saline injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine Saline-Injektion von 10 µl Volumen. Neben der Nullprobe unmittelbar vor der Injektion wurde bei jedem Tier eine weitere Probe nach 20, 40 bzw. 60 min entnommen.

#### 2.4.7 Antiserum-Neutralisation

Durch Injektion von anti-*Orconectes limosus* CHH-Serum sollte in der Hämolymphe zirkulierendes CHH abgefangen werden. Die zu injizierende Mindestmenge an Antiserum wurde unter Berücksichtigung der im Durchschnitt gemessenen CHH-Titer anhand der aus dem CHH-ELISA vorliegenden Daten über die Bindungskapazität des Antikörpers berechnet. Für das Experiment sollte die 4fache Menge davon eingesetzt werden. Aufgrund dieser Abschätzungen ergab sich für *Astacus* eine Injektionsmenge von 30 µl Antiserum. Kontrolltiere erhielten 30 µl normales Kaninchenserum sowie, alternativ, 30 µl Van Harreveld Saline. Um eine reine Antikörperlösung injizieren zu können und um mögliche Störfaktoren im Antiserum zu beseitigen, wurde zudem die IgG-Fraktion mittels Protein A-Sepharose aus dem Antiserum isoliert und in äquivalenter Menge in 50 µl injiziert. Für die Kontrollexperimente wurde die IgG-Fraktion auch aus normalem Kaninchenserum in identischer Weise isoliert und in 50 µl injiziert. Die Hämolympheproben wurden den Tieren unmittelbar vor der Injektion (Nullwert) und nach 1 h und 2 h entnommen.

Entsprechende Versuche wurden bei *Orconectes limosus* durchgeführt. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen CHH-Gehalte der Hämolymphe wurden den Tieren zunächst 2 µl und in weiteren Experimenten dann 20 µl Antiserum injiziert, bei den Kontrolltieren wurden dieselben Mengen an normalem Kaninchenserum verwendet. Die

Nullproben und die nach 1 h und 5 h bzw. nach 1 h und 2 h entnommenen Hämolympfproben wurden im CHH-ELISA gemessen. Auch bei *Orconectes limosus* wurde zusätzlich eine IgG-Injektion (16,5 µl) mit Nullprobe, 1 h- und 2 h-Wert durchgeführt. Des Weiteren wurde in Kontrollexperimenten mit kombinierter Sinusdrüsenextrakt- und Antiserum- bzw. Normalserum-Injektion (jeweils in 2minütigem Abstand) die Wirksamkeit des Antiserums untersucht. Dabei wurden jeweils 10 µl Antiserum oder normales Kaninchenserum und 0,1 SD-Äquivalente injiziert. Das Abfangen von extern zugeführtem CHH aus Sinusdrüsenextrakt durch die Antikörper sollte sich in einem Ausbleiben des erwarteten Anstiegs der Hämolympf-Glucose-Werte widerspiegeln. Durch Variation der Injektionsreihenfolge (zuerst Antiserum, dann Sinusdrüsenextrakt und umgekehrt) wurde ein entsprechender Effekt überprüft.

#### **2.4.8 Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie**

Dabei wurden die Tiere einerseits atmosphärischer Luft (extreme Hypoxie), andererseits einem Haltungswasser mit 50 % O<sub>2</sub>-Sättigung ausgesetzt (partielle Hypoxie).

Extreme Hypoxie wurde durch Haltung der Tiere in wassergesättigter Luft erzeugt. Die Untersuchungen zur partiellen Hypoxie wurden in Kunststoffboxen mit passendem Deckel durchgeführt. Diese wurden zu etwa  $\frac{3}{4}$  mit Wasser gefüllt und fest verschlossen. Anschließend wurde durch einen luftdicht über den Deckel eingeführten Schlauch mit Sprudelstein ein Spezialgas (300 ppm mol CO<sub>2</sub>, 10 % mol O<sub>2</sub>, 89,97 % mol N<sub>2</sub>) eingeleitet. Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration des Wassers wurde regelmäßig mit einer Sauerstoffelektrode überwacht. Diese lag bei der gegebenen Raumtemperatur von 15°C zwischen 9,5 und 10 mg/l. Erst nach Erreichen der halben Sauerstoffkonzentration, in diesem Falle entsprechend 4,75 bis 5 mg/l, wurden die Experimente gestartet.

In beiden Untersuchungsreihen wurden den Tieren drei Hämolympfproben pro Experiment entnommen: die Nullprobe zu Beginn des Experimentes und zwei weitere Proben nach 1 h und 2 h.

Um die zu untersuchende Funktion des CHH bei der Adaption des Stoffwechsels an Umweltstress genauer eingrenzen zu können, wurden mehrere Versuchsansätze bei partieller und bei extremer Hypoxie gestartet. Dementsprechend wurden sowohl intakte Tiere, als auch entstielte Tiere untersucht. Ebenso wurden entstielte Tiere direkt vor Beginn des Experimentes mit CHH (*Orconectes limosus*-CHH in 10 µl Van Harreveld Saline) oder Sinusdrüsenextrakt bzw. Van Harreveld Saline (10 µl, Kontrolle) injiziert und im weiteren

Verlauf unter den jeweiligen Hypoxie-Bedingungen beobachtet. In einem Kontrollexperiment wurden zudem intakte Tiere bei Normalsauerstoffgehalt des Wassers untersucht. Zur Beurteilung der Veränderungen im Stoffwechsel der Tiere unter Hypoxie und der Bedeutung des CHH in diesem Zusammenhang wurden alle Hämolympfproben auf ihre Glucose-, Laktat- und CHH-Werte hin untersucht. Der CHH-ELISA und der Glucose-Test wurden bereits in vorangegangenen Kapiteln eingehend beschrieben.

#### **2.4.8.1 Laktat-Bestimmung**

Zur Ermittlung der Laktat-Konzentrationen der Hämolympfproben wurden ein Laktat-Standard (40 mg/ml) sowie das Laktat-Reagenz der Firma Trinity Biotech plc. eingesetzt. Zunächst wurde eine Laktat-Standardverdünnungsreihe (0, 10, 20 und 40 mg/100 ml) angesetzt. Dazu wurde der Original-Standard entsprechend mit A. dest. vermischt und zudem jeder Einzelstandard nochmals 1:2 mit Antikoagulans verdünnt, da auch die Hämolympfproben 1:2 mit Antikoagulans verdünnt vorlagen. Im Folgenden wurden von allen Standards und Hämolympfproben 20 µl in die wells der Mikrotiterplatte (Nunc Immuno<sup>TM</sup>Modules F16 Maxisorp) pipettiert. Dabei wurden die Standards dreifach, die Proben doppelt aufgetragen. Zur Entwicklung mussten noch 200 µl des Laktat-Reagenz in jedes well pipettiert werden. Dieses wurde erst nach dem Probenauftrag in 10 ml A. dest. aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte in einem dunklen Fläschchen, da sich das Reagenz bei Tageslicht langsam selbständig verfärbt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurde die Mikrotiterplatte in einem Titertek Multiskan Plus MKII Photometer bei 540 nm gemessen. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte über einen angeschlossenen Personal Computer durch ein spezielles EIA-Programm (EIA3 Version 2.0, Flow Laboratories).

#### **2.4.9 Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden, natürlichen Hypoxie während der Ecdysis**

Hierzu wurden aus der vorhandenen Population Vorhäutungstiere ausgesondert und in ein Einzelhaltungsbecken überführt, dessen Wasser permanent umgewälzt, belüftet und gefiltert wurde. Die Tiere wurden kontinuierlich beobachtet und ihre Häutungsstadien nach Drach (1939) bestimmt. In der späten D<sub>3</sub>-Phase bzw. bei Eintritt in das D<sub>4</sub>-Stadium, erkennbar an einer deutlichen Decalcifizierung am ersten Peraeopoden (Phlippen et al., 2000), wurde die

Hämolyphentnahme begonnen, die sich über die Häutung bis hin zu einem Zeitraum von mehreren Stunden nach Ende der Ecdysis hinzog. Dabei war es besonders wichtig Hämolympfproben im Zeitraum unmittelbar vor oder mit Beginn der Ecdysisphase, sowie während und kurz nach Vollendung des Ecdysisprozesses zu gewinnen. Insgesamt wurden 10 Tiere untersucht. Dabei konnten die Zeitpunkte der Hämolympfentnahme nicht gleich gehalten werden, da die Tiere individuelle Schwankungen im zeitlichen Ablauf des Häutungsprozesses zeigten. Dies äußerte sich insbesondere in einer unterschiedlichen Dauer des D<sub>4</sub>-Stadiums bis zum Beginn der Ecdysisphase. Somit war die Planbarkeit des Experimentes besonders erschwert, und die Messreihen einiger Tiere waren für Vor- und Nachhäutungsphase weniger vollständig. Die entnommene Hämolymphe wurde auf CHH-, Laktat- und Glucose-Konzentrationen hin analysiert.

## **2.5 Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus*: Beteiligung zyklischer Nukleotide**

### **2.5.1 Isolierung der CHH-Isoformen aus Sinusdrüsenextrakt und Quantifizierung**

Die Sinusdrüsenextrakte wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben hergestellt. Anschließend wurden die CHH-Isoformen mittels RP-HPLC gereinigt. Die Durchführung der HPLC erfolgte an der bereits in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Anlage. Es wurde eine µBondaPak Phenylsäule (3,9 x 300 mm, Waters) mit Vorsäule verwendet, wobei ein linearer Gradient von 30-80 % Lösung B in 60 min bei einer Flussrate von 0,9 ml/min angelegt wurde. Als polares Lösungsmittel wurde 0,11 % TFA (Lösung A) eingesetzt, Lösung B bestand aus 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA. Die Absorption wurde bei 210 nm gemessen und die Fraktionen wurden manuell aufgefangen. Da der Einsatz der Phenylsäule keine ausreichende Trennung der CHH-Isoformen erbrachte, wurden diese gemeinsam aufgefangen und rechromatographiert. Die Rechromatographie wurde mit einer Luna® 5µ-Phenyl-Hexyl-Säule (4,6 x 250 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) durchgeführt. Hierbei wurde ein linearer Gradient von 45-60 % Lösung B (Lösungen wie zuvor) in 60 min verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte wie gewohnt bei 210 nm und die eluierenden Fraktionen wurden manuell aufgefangen.

Im Anschluss an die Isolierung wurde eine Quantifizierung der isolierten Peptide vorgenommen. Diese erfolgte mittels Aminosäureanalyse (vgl. Kap. 2.3.4 und 2.3.6).

### 2.5.2 Injektion der Tiere und Gewebepräparation

In den Experimenten wurden ausschließlich männliche Zwischenhäutungstiere mit einem Gewicht von 15-18 g eingesetzt. Zudem wurde jedes Tier einem Glucose-Biotest unterzogen, um sicherzustellen, dass die Versuchstiere auf die injizierte Substanz ansprechen. Dabei wurden jedem Tier 10 pmol CHH (L-Phe<sup>3</sup>-Isoform) durch die Gelenkmembranen der Scheren injiziert und die Änderung des Glucose-Titers in der Hämolymphe nach 2 h im Vergleich zur Nullprobe unmittelbar vor der Injektion gemessen. Das Volumen der Hämolympheproben war stets 50 µl. Die Bestimmung der Glucose-Konzentrationen erfolgte mittels des bereits beschriebenen Glucose-Tests (vgl. Kapitel 2.4.2.1). Versuchstiere mit einem positiven Glucose-Biotest wurden nach einer Ruhephase von mindestens 24 h für die Experimente eingesetzt.

In Vorbereitung auf die Injektionen wurden die CHH-Isoformen so in Van Harreveld Saline verdünnt, dass sich die gewünschte CHH-Konzentration in pmol/10 µl ergab. Die Kontrolltiere erhielten 10 µl Van Harreveld Saline. Die Injektionen wurden durch die Gelenkmembranen der Scheren bzw., in Parallelexperimenten, ins Perikard vorgenommen. Die Tiere wurden sofort ins Wasser zurückgesetzt. Nach definierten Zeitpunkten (2, 5, 10 bzw. 20 min, bei Perikard-Injektion nur 5 und 10 min) wurden die Tiere durch einen medioventralen Schnitt von der Mundöffnung bis zum Ende des Thorax getötet und die zu untersuchenden Gewebe zügig entfernt. Dies waren Gehirn, Antennendrüse, Kiemen, Mitteldarmdrüse, Herz, Abdominalganglien und Schwanzmuskel. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und dauerhaft bei -20°C gehalten.

Aufgrund der bedeutend längeren Präparationszeit für die Y-Organen wurden diese nicht im Rahmen der *in vivo* Injektionsversuche untersucht, sondern für *in vitro* Studien eingesetzt. Zur Präparation der Y-Organen wurden die Tiere durch einen medioventralen Schnitt von der Mundöffnung bis zum Ende des Thorax getötet, in den lateralen Carapax beiderseits um die Ansatzstelle des Mandibelmuskels ein ca. 2 cm<sup>2</sup> großes Fenster geschnitten und die Kutikulastücke mit einem Skalpell vorsichtig entfernt. Nach Überführung der Tiere in eine mit Van Harreveld Saline (4°C) gefüllte Schale wurden die Y-Organen, die sich in der Vertiefung einer Endoskelettspange befinden, herausgetrennt. Unmittelbar nach der Präparation wurden die Y-Organen einzeln in mit 200 µl sterilem Kulturmedium (s. u.) gefüllte Wells von Mikrotiterplatten (Nunc Immuno<sup>TM</sup> Modules F16 Maxisorp) überführt. Nach 1 h Präinkubationszeit wurden die Y-Organen für die zweistündige Hauptinkubation in frisches Kulturmedium umgesetzt. In der Hauptinkubationsphase wurden dem Kulturmedium CHH

(L-Phe<sup>3</sup>-CHH, 10 pmol/5 µl Van Harreveld Saline; entspricht 50 nM Endkonzentration im well) bzw. 5 µl Van Harreveld Saline zugesetzt. Dabei wurde immer ein Y-Organ eines Tieres mit CHH, das kontralaterale Y-Organ mit Van Harreveld Saline (Kontrolle) inkubiert. Nach 2 h wurden die Y-Organen entnommen, einzeln in Eppendorf-Caps mit flüssigem Stickstoff überführt und dauerhaft bei -20°C gehalten.

Kulturmedium für Y-Organen nach Keller und Schmid (1979):

1,1 g	Medium 199
0,0398 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,244 g	NaCl
0,238 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,477 g	HEPES Puffer
1,0 ml	Antibiotic/Antimycotic Solution (GIBCO)

auf 100 ml mit A. dest.; pH 7,5; 440 mOsmol

Mit Ausnahme des Schwanzmuskels wurden alle Gewebe vollständig extrahiert. Vom Schwanzmuskel wurden jeweils 0,4 g eingesetzt.

Die Extraktion der Kiemen und des Schwanzmuskels erfolgte mit Hilfe eines Motorantriebs (Art-Micra D-1, Art moderne Labortechnik, München) und eines für die Nutzung in 2 ml Eppendorf-Caps geeigneten Dispergierwerkzeugs (DS-5/K, Art, Mülheim). Zunächst wurden die gefrorenen Gewebe mit 600 µl eiskaltem Ethanol (absolut) versetzt und mit einer Schere zügig vorzerkleinert. Anschließend wurden weitere 600-800 µl Ethanol zugegeben und das Gewebe mittels des Dispergierwerkzeugs vollständig homogenisiert. Anschließend wurde der Extrakt für 15 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Überstände der Gewebeextrakte wurden im SpeedVac bis zur Trockene eingengt und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der cGMP- und cAMP-Konzentrationen wurden die Rückstände in 175 µl Tris/EDTA-Puffer (s. u.) aufgenommen. Das Pellet eines jeden Gewebeextraktes wurde für die Proteinbestimmung aufgehoben und bei 4°C gelagert.

Die weiteren Gewebe (Herz, Antennendrüse, Gehirn, Abdominalganglien, Mitteldarmdrüse) wurden in einem Glashomogenisator mit passendem Glaspistill extrahiert. Dabei wurden die noch gefrorenen Gewebe mit 300 µl eiskaltem absoluten Ethanol versetzt und zerkleinert. Für die Extraktion der Mitteldarmdrüse wurden aufgrund des hohen Fettgehaltes anstelle von Ethanol 600 µl eiskalter Tris/EDTA-Puffer verwendet. Die Extrakte wurden anschließend mit einer fein ausgezogenen Glaspasteurpipette abgesaugt und auf Eis gelagert. Anschließend

wurde der Glashomogenisator mit weiteren 300 µl Ethanol bzw. 600 µl Puffer nachgespült, die ebenfalls abgesaugt und mit dem ersten Extrakt vereinigt wurden. Es folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen, im SpeedVac eingengt und der Rückstand nach Trocknung in 175 µl Tris-EDTA-Puffer aufgenommen. Die Proteinpellets wurden ebenfalls für eine Proteinbestimmung aufgehoben. Die Extraktion der Y-Organe erfolgte in Eppendorf-Caps mit passendem Teflon-Stempel. Die noch gefrorenen Organe wurden mit 200 µl eiskaltem absoluten Ethanol versetzt und zerkleinert. Die Extrakte wurde entnommen und die Caps mit weiteren 200 µl Ethanol nachgespült, die mit den ersten Extrakten vereinigt wurden. Nach 8minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurden die Überstände abgenommen, im SpeedVac eingengt und der Rückstand in 125 µl Tris/EDTA-Puffer gelöst. Die Proteinpellets wurden für eine Proteinbestimmung aufbewahrt.

### 2.5.3 Bestimmung von zyklischen Nukleotiden

Die Messung der Gehalte an cGMP und cAMP in den einzelnen Gewebeextrakten wurde mit kommerziellen Testkits der Firma Amersham (Cyclic GMP [<sup>3</sup>H]assay System bzw. Cyclic AMP [<sup>3</sup>H]assay System) durchgeführt.

#### 2.5.3.1 cAMP-Assay

Prinzip dieses Assays ist die Konkurrenz des zu messenden cAMP der Probe mit einer festgelegten Menge [<sup>3</sup>H]cAMP um die Bindung an ein Bindungsprotein mit hoher Affinität und Spezifität für zyklisches AMP. Demzufolge bindet im Verhältnis umso weniger radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]cAMP an das Protein, je höher der Gehalt an cAMP in der Probe ist. Nach Entfernung des ungebundenen cAMP mittels einer Aktivkohlelösung und Zentrifugation wird die verbleibende Radioaktivität (cpm) im Überstand bestimmt. Durch Vergleich der gemessenen cpm-Werte der Proben mit denen einer Standardkurve kann der cAMP-Gehalt der Probe genau berechnet werden.

#### Benötigte Lösungen:

Tris/EDTA-Puffer, pH 7,5:	0,05 M	Tris/HCL
	0,004 M	EDTA
cAMP-Standard:	1600 pmol cAMP	in 5 ml A. dest.

Bindungsprotein:	gereinigt aus Rindermuskel, in A. dest.
[ <sup>3</sup> H]cAMP-Lösung:	zyklisches [8- <sup>3</sup> H] Adenosin 3', 5'-phosphat 180 pmol in 10 ml A. dest, enthält ca. 185 kBq, 5 µCi
Aktivkohle:	in A. dest.

**Durchführung:**

Die Durchführung des cAMP-Assays erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Caps. Wie bereits zuvor beschrieben, wurden die getrockneten Extrakte in 175 µl Tris/EDTA-Puffer aufgenommen. Alle Standards und Proben wurden jeweils doppelt angesetzt. Die einzelnen Komponenten wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Cap Nr.	Tris/EDTA-Puffer	Standard	Proben	[ <sup>3</sup> H]cAMP	Bindungsprotein
1, 2	75 µl (Aktivkohleblank)	-	-	25 µl	-
3, 4	25 µl	-	-	25 µl	50 µl
5, 6	-	25 µl (0,5 pmol)		25 µl	50 µl
7, 8	-	25 µl (1 pmol)		25 µl	50 µl
9, 10	-	25 µl (2 pmol)		25 µl	50 µl
11, 12	-	25 µl (4 pmol)		25 µl	50 µl
13, 14	-	25 µl (8 pmol)		25 µl	50 µl
15, usw.	-	-	25 µl	25 µl	50 µl

Nachdem alle Komponenten pipettiert waren, wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Folgenden wurde zu allen Ansätzen 50 µl Aktivkohlesuspension gegeben, gründlich gemischt und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Von jedem Ansatz wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und in ein Szintillationsgefäß mit 10 ml Szintillationscocktail (Ready Safe, Beckman Coulter) überführt. Die cpm-Werte wurden mit einem β-Szintillationszähler der Firma Packard (TriCarb Series) über 10 min bestimmt.

### 2.5.3.2 cGMP-Assay

Ähnlich wie beim cAMP-Assay konkurrieren auch bei diesem Test das cGMP der zu messenden Probe und [<sup>3</sup>H]cGMP um die Bindung an ein Protein, in diesem Fall ein spezifisches Antiserum gegen cGMP. Am Antiserum gebundenes cGMP wird durch Ammoniumsulfat als Antigen-Antikörper-Komplex gefällt und somit von dem ungebundenen cGMP getrennt. Nach Wiederauflösen des Präzipitates kann die Radioaktivität des Ansatzes gemessen werden und anhand der Standardkurve die Berechnung des cGMP-Gehaltes erfolgen.

#### Benötigte Lösungen:

Tris/EDTA-Puffer, pH 7,5:	0,05 M	Tris/HCL
	0,004 M	EDTA
cGMP-Standard:	400 pmol cGMP in 5 ml A. dest.	
Antiserum:	spezifisch gegen cGMP, in A. dest.	
[ <sup>3</sup> H]cGMP-Lösung:	zyklisches [8- <sup>3</sup> H] Guanosin 3', 5'-phosphat 80 pmol in 10 ml A. dest, enthält ca. 59 kBq, 1,6 µCi	
Blank-Reagenz:	in A. dest	
Ammoniumsulfat:	58,5 g in 150 ml A. dest. (zu 60 % gesättigte Lösung)	

#### Durchführung:

Die getrockneten Probenextrakte wurden in 175 bzw. 125 µl Tris/EDTA-Puffer aufgenommen. Sowohl Standards als auch Proben wurden doppelt angesetzt. Reaktionsgefäße waren 1,5 ml Eppendorf-Caps. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Cap Nr.	Tris/EDTA-Puffer	Standard	Proben	[ <sup>3</sup> H]cGMP	Blank-Reagenz	Antiserum
1, 2	50 µl	-	-	25 µl	-	25 µl
3, 4	-	50 µl (0,25 pmol)	-	25 µl	-	25 µl
5, 6	-	50 µl (0,5 pmol)		25 µl	-	25 µl
7, 8	-	50 µl (1 pmol)		25 µl	-	25 µl
9, 10	-	50 µl (2 pmol)		25 µl	-	25 µl
11, 12	-	50 µl (4 pmol)		25 µl	-	25 µl
13, 14	(Blank)	-		25 µl	50 µl	25 µl
15, usw.	-	-	50 µl	25 µl	-	25 µl

Anschließend wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Dann wurden die Reaktionsansätze mit 1 ml eiskalter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt und für weitere 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 3,5 min bei 12000 rpm wurden die Überstände abgenommen. Das Pellet wurde vollständig in 1,1 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert und im Anschluß daran wurde jeweils 1 ml davon in ein Szintillationsgefäß mit 10 ml Szintillationscocktail pipettiert.

#### 2.5.4 Protein-Bestimmung

Um die Gehalte an cGMP und cAMP der einzelnen Gewebe zu normieren, sollten diese auf die Proteinmenge (mg) bezogen werden. Hierzu wurden zunächst alle Pellets der Gewebeextrakte in 1 N Natronlauge aufgelöst. Dabei wurden für die einzelnen Gewebe folgende Volumina an Natronlauge benötigt: Gehirn (50 µl), Antennendrüse (150 µl), Kiemen (600 µl), Mitteldarmdrüse (600 µl), Herz (50 µl), Abdominalganglien (100 µl), Schwanzmuskel (600 µl), Y-Organ (50 µl). Da sich die Proteinpellets zum Teil nicht vollständig lösten, wurden sie zusätzlich auf 80°C erhitzt. Nachdem die Pellets gelöst waren, wurden von allen Proben Verdünnungen in 1 N Natronlauge angesetzt, um im idealen Messbereich der Standardkurve zu liegen.

Die Proteinbestimmung wurde mit einem Testkit der Firma Uptima unter Benutzung der folgenden zugehörigen Lösungen durchgeführt:

Lösung A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, BCA (Bicinchinonsäure), Natriumtartrat in 0,2 N NaOH

Lösung B: 4 % CuSO<sub>4</sub>-Lösung

Lösung C: Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 mischen

BSA (bovine serum albumin)-Lösungen verschiedener Konzentrationen (200-1200 µg/ml 1 N NaOH) dienten als Standards. Es wurden 10 µl der BSA-Standards (Dreifachbestimmungen) bzw. Proben (Doppelbestimmungen), sowie 10 µl 1 N NaOH (Blank) in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl Lösung C vermischt. Die Platten wurden anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm mit einem Titertek Multiskan MKII Photometer (Thermo Labsystems, Finnland). Die Proteinmengen der einzelnen Proben wurden anhand der BSA-Standardkurve bestimmt.

## **2.6 Statistische Analyse**

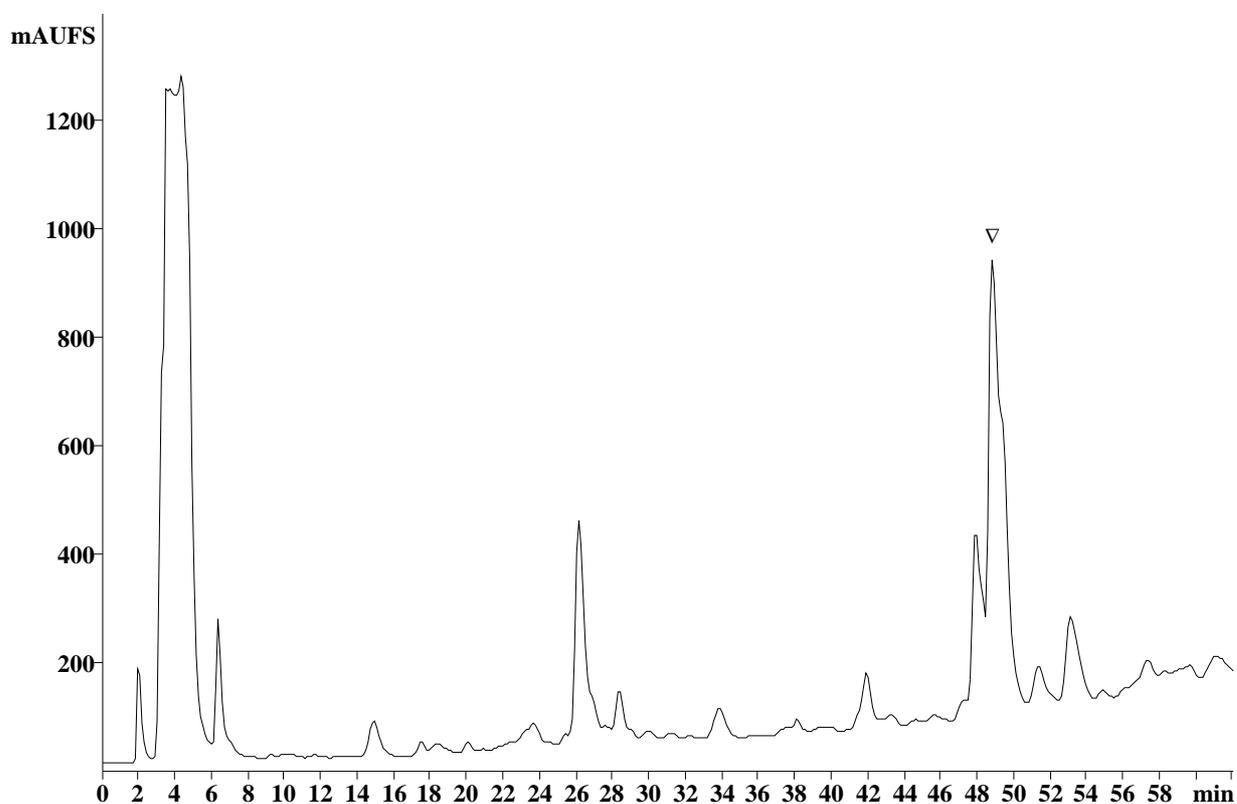
Bei der statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde zum Vergleich unabhängiger Proben der Students *t*-Test eingesetzt. Zum Vergleich der Werte abhängiger Proben, d. h. von Proben eines Tieres, wurde der Friedman-Test verwendet. Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest überprüft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung und Charakterisierung des CHH aus der Sinusdrüse

#### 3.1.1 Isolierung von CHH mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Identifizierung der bei *Astacus astacus* noch unbekanntenen Neuropeptide der CHH-Hormonfamilie und zu ihrer Isolierung wurden die Sinusdrüsenextrakte unter Einsatz zweier verschiedener Trennsäulen chromatographisch aufgetrennt. Dabei ergaben sich die im Folgenden dargestellten Chromatogramme.



**Abb. 3.1** Chromatographie eines Extraktes aus 80 Sinusdrüsen von *Astacus astacus* über eine  $\mu$ Bondapak Phenylsäule. Chromatographische Bedingungen: linearer Lösungsmittelgradient von 30-80 % Lösung B in 60 min (Lösung A: 0,11% TFA; Lösung B: 60 % Acetonitril mit 0,1% TFA); Flussrate: 0,9 ml/min. Die UV-Absorption wurde bei 210 nm gemessen. Der vermutete CHH-Peak ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.



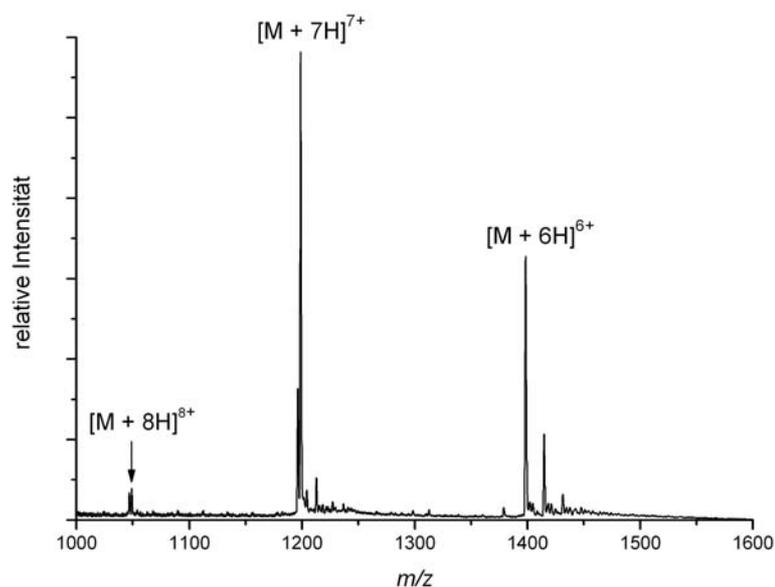
**Abb. 3.2** Chromatographie eines Extraktes aus 40 Sinusdrüsen von *Astacus astacus*. Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer Phenyl-Hexyl-Säule und einem linearen Lösungsmittelgradienten von 45-60 % Lösung B in 60 min und einer Flussrate von 0,9 ml/min. Lösung A: 0,11 % TFA; Lösung B: 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA. Die UV-Absorption wurde bei 210 nm gemessen. Die Ziffern markieren die beiden vermuteten CHH-Isoformen.

Die Analyse von Sinusdrüsenextrakt mittels HPLC lieferte Chromatogramme mit einem charakteristischen Peakmuster (vgl. Abb. 3.1 und 3.2), das dem von Sinusdrüsenextrakten des Flusskrebsses *Orconectes limosus* unter gleichen chromatographischen Bedingungen ähnelt. Die Trennung über die Phenylsäule ergab im Elutionsbereich zwischen 46 und 50 min zwei größere Peaks, wobei der hintere, dominante Hauptpeak eine Schulter aufweist (Abb. 3.1). Aus Untersuchungen von Sinusdrüsenextrakten des Flusskrebsses *Orconectes limosus* ist bekannt, dass es sich bei dem analogen Hauptpeak mit Schulter um zwei CHH-Isoformen handelt, die sich ausschließlich in der absoluten Konfiguration des Phenylalanin-Restes an Position 3 unterscheiden. Dabei stellt die L-Phe<sup>3</sup>-Isoform den Hauptanteil des CHH, die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform taucht in Form einer Schulter des Hauptpeaks auf (Kegel et al., 1991; Soyez et al., 1998). Der bei *Astacus astacus* unmittelbar zuvor eluierende Peak (Abb. 3.1) könnte in Analogie zu den Beobachtungen bei *Orconectes limosus* zwei weitere Peptide vom CHH-Typ enthalten, die bei *Orconectes* jedoch nicht näher charakterisiert wurden (Keller et al., 1999). Bei dem nach 42 min auftretenden Peak könnte es sich im Hinblick auf die nahezu identische

Retentionszeit um ein dem MIH von *Orconectes limosus* entsprechendes Peptid handeln. Dies wurde nicht näher untersucht.

Die Anwendung der Phenyl-Hexyl-Säule führte zu einer Basislinientrennung der beiden CHH-Fractionen (vgl. Abb. 3.2, Peak 1 und 2) sowie zu einer Aufspaltung des Vorpeaks in zwei Einzelpeaks. Dies zeigt die bedeutend bessere Trenneigenschaft dieser HPLC-Säule für Peptide vom CHH-Typ. Wie für den Flusskrebs *Orconectes limosus* bereits nachgewiesen wurde (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse), geht dieser Vorteil allerdings mit einem erheblichen Verlust an MIH einher, so dass z. B. in dem entsprechenden Chromatogramm der kleine potentielle MIH-Peak nicht mehr erkennbar ist.

Um zu verifizieren, dass es sich bei den isolierten Peptid-Fractionen tatsächlich um Peptide vom CHH-Typ handelt, wurden sie massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 3.3** Nano-ESI-Q-TOF Massenspektrum von Peak 1 (Abb. 3.2) aus SD-Extrakten nach RP-HPLC. Peak 2 ergab ein identisches Massenspektrum. Aus den  $m/z$ -Werten ergaben sich molekulare Massen von 8384,18 Da.

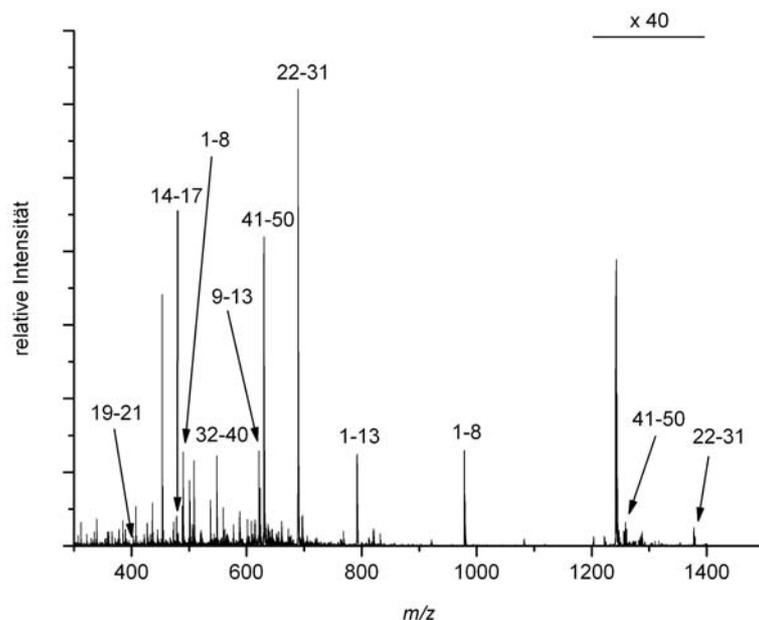
Bei der Massenanalyse wurden für die Peptide der Fraktionen 1 und 2 (vgl. Abb. 3.2) Molekulargewichte ermittelt, wie sie für Peptidhormone der CHH-Familie typisch sind. Für beide Proben ergab sich eine durchschnittliche Masse von 8384,18 Da (vgl. Abb. 3.3). Die Tatsache, dass die Peptide jedoch getrennt voneinander von der HPLC-Säule eluierten, ist ein deutlicher Hinweis auf das von anderen Flusskrebsarten bekannte Vorliegen zweier CHH-Isoformen mit gleicher Aminosäuresequenz, jedoch unterschiedlicher Konfiguration einer einzelnen Aminosäure. Danach sollte es sich bei Peak 1 vermutlich um die L-Isoform, bei

Peak 2 um die D-Isoform handeln. Dies wurde in zusätzlichen Experimenten untersucht (s. u., Seite 50, Abb. 3.7).

Die massenspektrometrische Untersuchung der beiden kleinen Peaks vor 1 und 2 (Abb. 3.2) lieferte keine verwertbaren Daten.

### 3.1.2 Tryptische Spaltung von CHH im Gel und massenspektrometrische Untersuchung

Aufgrund der Ergebnisse aus der Massenbestimmung der intakten, HPLC-isolierten Peptide konnte man mit weitgehender Sicherheit davon ausgehen, dass es sich um CHH-Formen handelt. Zur weitergehenden massenspektrometrischen Charakterisierung wurden die beiden CHH-Fraktionen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Ausschneiden der entsprechenden Gelbanden einer Trypsinspaltung im Gel unterzogen. Die resultierenden tryptischen Fragmente beider CHH-Formen wurden aus den Gelstücken extrahiert und anschließend mittels ESI-Q-TOF Massenspektrometrie untersucht. Aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz von *Orconectes limosus*-CHH und unter der Annahme, dass zwischen *Astacus*- und *Orconectes*-CHH ein hoher Grad von Sequenzhomologie vorliegt, wurden die zu erwartenden Massen der tryptischen Fragmente ermittelt und die Spaltpeptidgemische auf diese Massen hin untersucht.

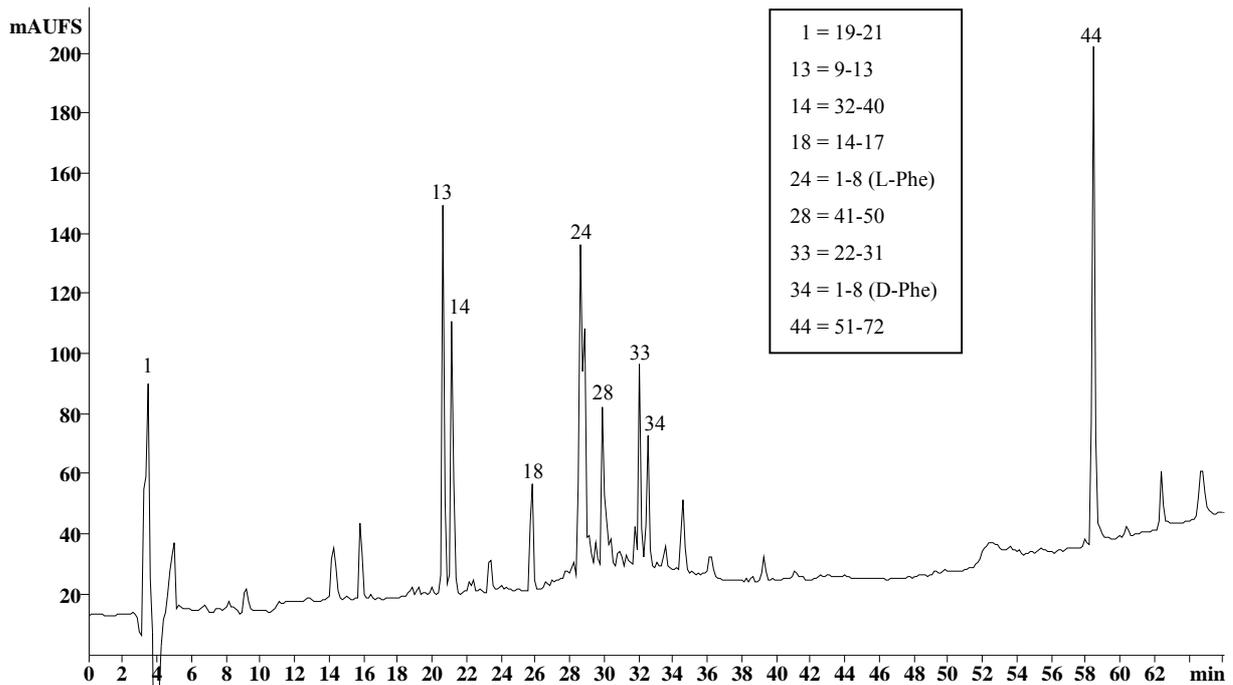


**Abb. 3.4** ESI-Q-TOF Massenspektrum der tryptischen Spaltfragmente nach In-Gel Verdau. Die beiden isolierten CHH-Fraktionen lieferten identische Spektren. Tabelle 3.1 gibt eine Zusammenfassung der experimentell bestimmten und theoretischen  $m/z$ -Werte der Molekül-Ionen sowie der zugehörigen Aminosäuresequenzen.

Wie aus Abb. 3.4 ersichtlich, konnten für beide CHH-Formen nahezu alle erwarteten Fragmente mittels ESI-Q-TOF MS eindeutig nachgewiesen werden. Das relativ große C-terminale tryptische Spaltpeptid (Aminosäurereste 51-72) konnte jedoch nicht im Massenspektrum detektiert werden. Des Weiteren wurde der nach Trypsinspaltung isoliert vorliegende Aminosäurerest 18 des CHH, nach Sequenzinformationen von *Orconectes limosus* vermutlich ein Lysin-Rest (Lys<sup>18</sup> ist bei den CHHs hochgradig konserviert), im Peptidgemisch der Trypsin-Verdaue nicht nachgewiesen. Zur Detektion und Sequenzierung dieser Fragmente wurde eine alternative Trypsin-Spaltung der CHH-Isoformen, diesmal in Lösung, vorgenommen, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden. Die Übereinstimmung der Massenspektren beider untersuchter CHH-Fraktionen ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf die Existenz zweier CHH-Isoformen, die sich lediglich in der Konfiguration einer einzigen Aminosäure unterscheiden.

### **3.1.3 ESI-Q-TOF Massenspektrometrie nach tryptischer Spaltung von CHH in Lösung und Aufreinigung der Spaltfragmente**

Nachdem bei der massenspektrometrischen Analyse der In-Gel Verdaue beider CHH-Formen das C-terminale Spaltpeptid (AS 51-72) nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine alternative Methode der Trypsin-Spaltung in Lösung angewendet. Hierzu wurden die reduzierten Disulfidgruppen durch Pyridylethylierung der SH-Gruppen stabilisiert. Nach Trypsinspaltung wurden die Spaltpeptide durch HPLC aufgetrennt. Die beiden CHH-Formen wurden hierzu aufgrund der Identität ihrer Massenspektren und zur Erhöhung der Ausbeute an Spaltpeptiden vereinigt. Die resultierenden pyridylethylierten, tryptischen Spaltfragmente wurden für die ESI-Q-TOF Massenspektrometrie (Detektion und Sequenzierung), zur Edman-Sequenzierung des C-terminalen Spaltpeptids (AS 51-72) sowie zur Bestimmung der isobaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin eingesetzt.

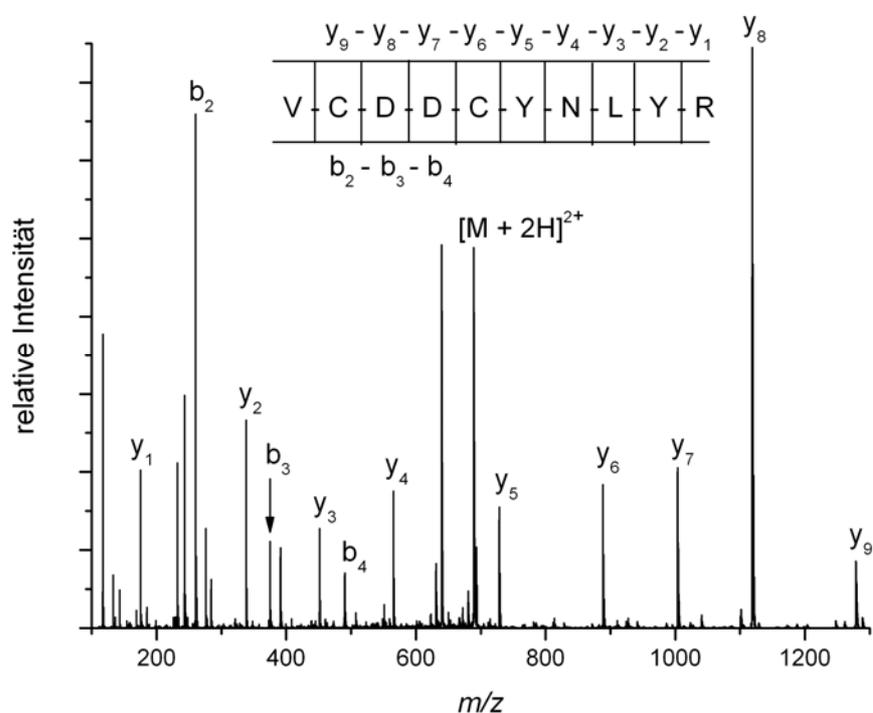


**Abb. 3.5** HPLC-Chromatogramm der tryptischen Spaltfragmente beider vereinigten CHH-Formen. Die Auftrennung erfolgte über eine Phenyl-Hexyl-Säule bei einem Gradienten von 7-68 % Lösung B in 70 min (0,9 ml/min; Lösung A: 0,11 % TFA; Lösung B: 80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA). Die UV-Absorption wurde bei 220 nm gemessen. Die mittels ESI-Q-TOF Massenspektrometrie detektierten und identifizierten Spaltfragmente sind im Chromatogramm entsprechend markiert. In Tabelle 3.1 sind die experimentell bestimmten und theoretischen  $m/z$ -Werte der Molekül-Ionen sowie die zugehörigen Aminosäuresequenzen aufgelistet. Die D- bzw. L-Phe<sup>3</sup>-Zuordnung der beiden N-terminalen Oktapeptide wird in Kapitel 3.1.6 näher erläutert.

Mittels ESI-Q-TOF MS konnten alle erwarteten Fragmente eindeutig nachgewiesen und somit die vollständige Aminosäuresequenz der beiden CHH-Formen abgedeckt werden. Zudem tauchte das N-terminale Oktapeptid an zwei unterschiedlichen Retentionszeiten im Chromatogramm auf, wodurch erneut ein Hinweis auf die Existenz zweier CHH-Isoformen geliefert wurde. Die Identifizierung des einzelnen Aminosäurerestes (AS 18) war möglich durch das Auftreten des Fragmentes 18-31 infolge unvollständiger proteolytischer Spaltung des intakten CHH (Ergebnisse der MS-Analyse hier nicht dargestellt).

### 3.1.4 Sequenzierung der tryptischen Spaltfragmente beider CHH-Formen mittels Nano-ESI-Q-TOF MS/MS

In den bisher dargestellten Experimenten wurden für beide CHH-Formen die zu erwartenden tryptischen Fragmente nachgewiesen. Nun galt es, deren Aminosäuresequenzen zu bestimmen. Die Sequenzierung der einzelnen Spaltpeptide erfolgte mittels low-energy CID (collision induced dissociation). Hierzu wurden die Sequenzinformationen von *Orconectes limosus* unterstützend herangezogen.



**Abb. 3.6** Low-energy CID-Spektrum der doppelt geladenen Molekularionen des tryptischen Fragmentes AS 22-31. Der Leucin-Rest an Position 29 ( $y_3$ ) wurde durch Aminosäureanalyse identifiziert.

Abbildung 3.6 gibt exemplarisch für alle untersuchten Spaltpeptide das low-energy CID-Spektrum mit den Sequenzinformationen des Fragmentes AS 22-31 wieder. Abgesehen vom C-terminalen Spaltpeptid 51-72, konnten alle Fragmente auf diesem Wege sequenziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Tryptische Peptide von CHH					
Fragment	Sequenz	[M + H] <sup>+</sup> experimentell	[M + H] <sup>+</sup> theoretisch	[M + 2H] <sup>2+</sup> experimentell	[M + 2H] <sup>2+</sup> theoretisch
1-8	Pyr-EVFDQACK	978.5*	978.5	489.7	489.7
9-13	GIYDR	623.3*	623.3	ND	
1-13	Pyr-EVFDQACKGIYDR	ND		791.9*	791.9
14-17	AIFK	478.3*	478.3	ND	
19-21	LDR	403.2*	403.2	ND	
22-31	VCDDCYNLYR	1377.7	1377.6	689.3*	689.3
32-40	KPYVATTCR	ND		548.3*	548.3
41-50	QNCYANSVFR	1258.7	1258.6	629.8*	629.8
51-72	QCLDLLLLIDVVDEYISGVQIV	ND		???	???

**Tab. 3.1** Aminosäuresequenzen der tryptischen Peptide beider CHH-Formen von *Astacus astacus*. Die Fragmente wurden mittels Nano-ESI-Q-TOF Massenspektrometrie detektiert und sequenziert. Für das C-terminale Spaltpeptid AS 51-72 wurden die Sequenzinformationen durch Edman-Abbau ermittelt. Die Leucin- bzw. Isoleucin-Reste der übrigen Fragmente wurden mittels Aminosäureanalyse identifiziert. Zur kollisionsinduzierten Fragmentierung verwendete Molekularionen sind mit \* markiert. ND: nicht detektierte doppelt bzw. einfach geladene Molekularionen.

### 3.1.5 Identifizierung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin mittels Aminosäureanalyse

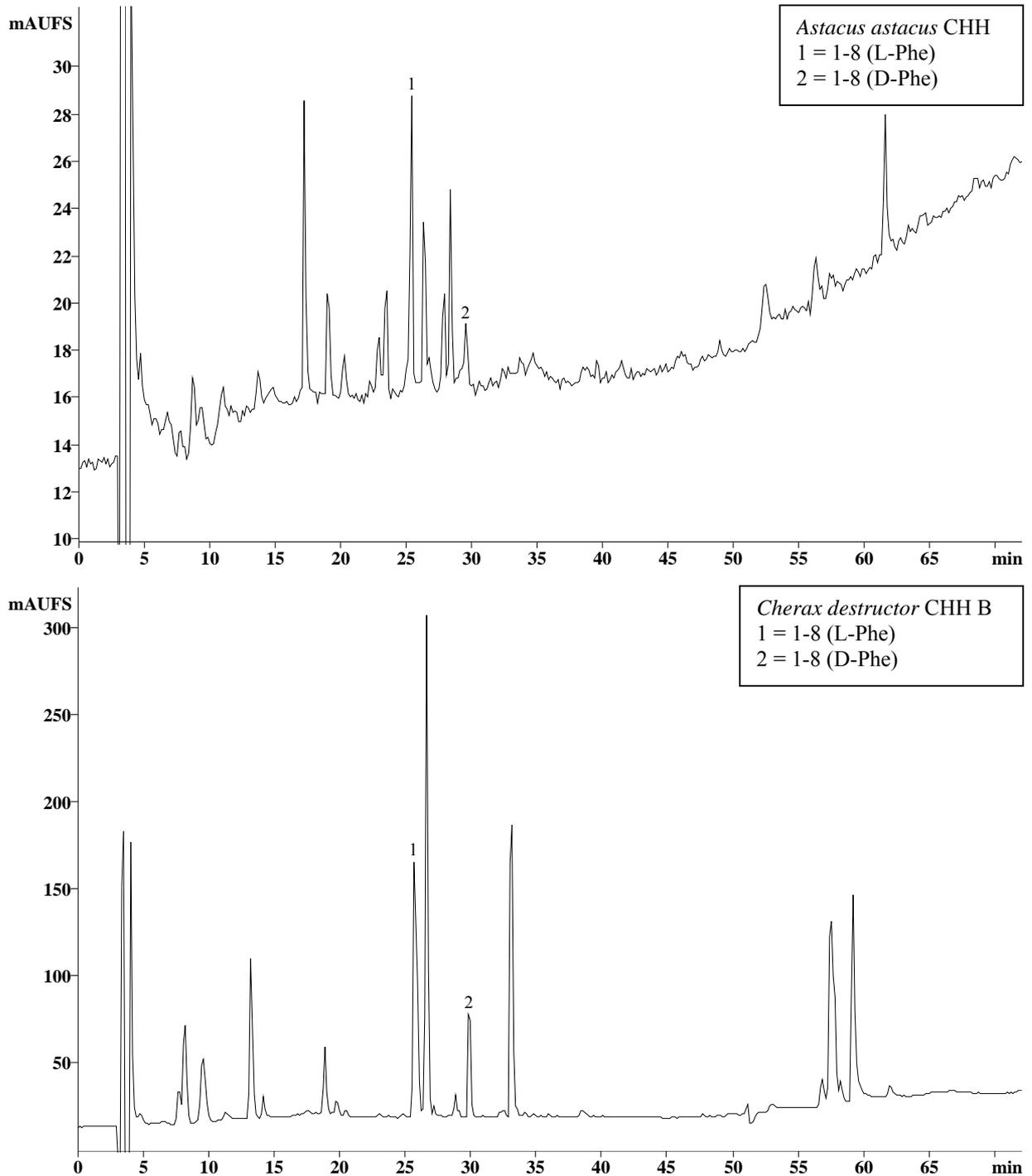
Aufgrund der identischen Molekülmassen ist es mit Hilfe von low-energy CID nicht möglich, zwischen Leucin und Isoleucin zu unterscheiden. So galt es, die Sequenzinformationen in Hinblick auf diese beiden Aminosäuren mittels Aminosäureanalyse zu vervollständigen. Dazu wurden die einzelnen, nur jeweils ein Leucin bzw. Isoleucin enthaltenden tryptischen Spaltpeptide zunächst hydrolysiert, die Hydrolysate mit FMOC derivatisiert und chromatographisch getrennt. Der C-Terminus der CHH-Formen (AS 51-72), der durch Edman-Abbau bereits eindeutig charakterisiert war, wurde zur Kontrolle mituntersucht.

Bei der Analyse der Spaltpeptide fand sich Leucin in folgenden Fragmenten: AS 19-21, AS 22-31. In den Fragmenten AS 9-13, AS 14-17 wurde Isoleucin nachgewiesen. Nach den Ergebnissen des Edman-Abbaus sollten sich Leucin und Isoleucin beim C-terminalen Fragment AS 51-71 im Verhältnis 4:3 wiederfinden. Der Vergleich der Peakflächen beider Aminosäuren im Chromatogramm ergab einen Faktor von 1,18. Somit wurde das Ergebnis des Edman-Abbaus mittels Aminosäureanalyse bestätigt. Da das tryptische Fragment AS 19-21 im Lösungsmittelpeak eluierte, was die Eindeutigkeit der Aminosäureanalyse durch Begleitsubstanzen beeinträchtigte, wurde in einem Kontrollexperiment zusätzlich intaktes CHH hydrolysiert, derivatisiert und anschließend chromatographisch analysiert. Im Hinblick auf die Aminosäuren Leucin und Isoleucin fand sich im Chromatogramm ein Peakflächenverhältnis von 1,24. Dies entsprach einem Leucin/Isoleucin-Verhältnis von 6:5,

womit die Existenz von Leucin in diesem Fragment sowie die gesamten in Tabelle 3.1 dargestellten Sequenzinformationen bestätigt wurden.

### **3.1.6 Nachweis der Aminosäurereste L- bzw. D-Phe<sup>3</sup> im N-terminalen Oktapeptid der beiden CHH-Formen**

Im Laufe der Untersuchungen zur Charakterisierung der beiden CHH-Formen von *Astacus astacus* ergaben sich einige Hinweise, die für eine Isomerisierung des L-Phe<sup>3</sup>-Restes zu D-Phe<sup>3</sup> bei den ansonsten sequenzgleichen Peptiden sprachen. Im Rahmen der Untersuchungen zur Struktur von zwei CHHs des australischen Flusskrebsses *Cherax destructor* wurde ein eindeutiger, direkter Nachweis für die Existenz dieser CHH-Isoformen von CHH A und CHH B mittels ELISA sowie Enantiomerenanalyse erbracht. Außerdem konnten die D- und L-Oktapeptide in der HPLC sehr deutlich voneinander getrennt werden (Bulau et al., 2003). Im Chromatogramm der tryptischen Spaltpeptide des *Astacus*-CHH tritt das Oktapeptid ebenfalls zweimal auf. Damit ergab sich die Möglichkeit, die isomeren Oktapeptide von *Astacus astacus* durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit denen der *Cherax*-Oktapeptide zu identifizieren, denn die Sequenz 1-8 ist bei beiden Arten identisch (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7** Vergleichende Darstellung der RP-HPLC-Chromatogramme nach Auftrennung der tryptischen Spaltpeptide von pyridylethyliertem CHH von *Astacus astacus* bzw. *Cherax destructor*. Die Chromatographien wurden mit einer C<sub>18</sub>-Säule durchgeführt. Hierzu wurde ein linearer Gradient von 10-90 % Lösung B in 70 min verwendet (Lösung A: 0,11 % TFA; Lösung B: 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA). Die Flussrate betrug 0,9 ml/min und die UV-Absorption wurde bei 220 nm gemessen. Die D- bzw. L-Phe<sup>3</sup>-Fragmente (AS 1-8) sind in den Chromatogrammen entsprechend beschriftet. (Chromatogramm von *Cherax destructor* aus: Bulau et al., 2003)

Durch Vergleich der Trypsin-Spaltungen der hyperglykämischen Hormone beider Flusskrebsarten konnte somit eine eindeutige Identifizierung der beiden N-terminalen Oktapeptide im Hinblick auf die Konfiguration des Phenylalanin-Restes (AS 3) erfolgen, da sich nahezu identische Retentionszeiten ergaben. Bei dem früher eluierenden Peptid handelt es sich um die L-Phe<sup>3</sup>-Form des Oktapeptids, die dazu isomere D-Phe<sup>3</sup>-Form eluiert etwa 3-4 min später. Da die CHH B-Isoformen des Flusskrebses *Cherax destructor* mit zwei unabhängigen spezifischen Methoden identifiziert wurden, lieferte dieses Experiment den endgültigen Beweis für die Existenz zweier CHH-Isoformen, welche sich durch Sequenzgleichheit bei unterschiedlicher Konfiguration einer einzigen Aminosäure auszeichnen.

### 3.1.7 CHH-Quantifizierung

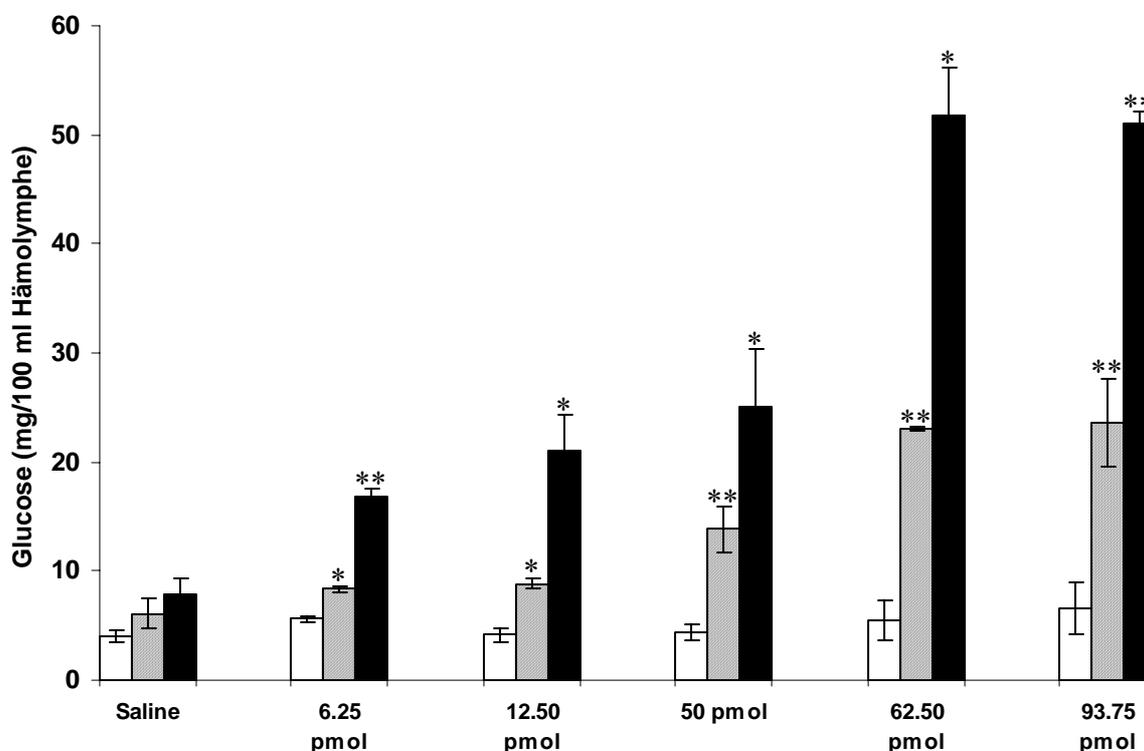
Im Rahmen der bislang dargestellten Untersuchungen wurden die beiden CHH-Formen des europäischen Flusskrebses *Astacus astacus* vollständig charakterisiert. Aufgrund der vorhandenen Sequenzinformationen war eine Quantifizierung des Hormons durch Aminosäureanalyse möglich. Dies war erforderlich für eine exakte Dosierung der Hormone bei den physiologischen Experimenten. Zudem ergaben sich Informationen über die in der Sinusdrüse gespeicherten Mengen an hyperglykämischem Hormon.

Die Untersuchung der mittels HPLC isolierten Peptide aus 44 Sinusdrüsen (die Isoformen wurden nicht getrennt) ergab eine Menge an hyperglykämischem Hormon von 5581 pmol. Dies entspricht einem durchschnittlichen Gehalt von 127 pmol CHH (= 1,065 µg) pro Sinusdrüse. Einschränkend muss man jedoch hinzufügen, dass die RP-HPLC-Reinigung mit Materialverlusten verbunden ist, so dass die tatsächliche Gesamtkonzentration beider Isoformen durchaus höher liegen kann.

## 3.2 Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des CHH von *Astacus astacus* und vergleichende Untersuchungen bei *Orconectes limosus*

### 3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Das namengebende Charakteristikum der Peptide vom CHH-Typ ist ihre hyperglykämische Aktivität. Bei *Astacus astacus* wurde der hyperglykämische Effekt in Abhängigkeit von der Dosis sowie, in begrenztem Maße, durch Messung zu 2 Zeitpunkten der zeitliche Verlauf des Effekts untersucht (Abb. 3.8).



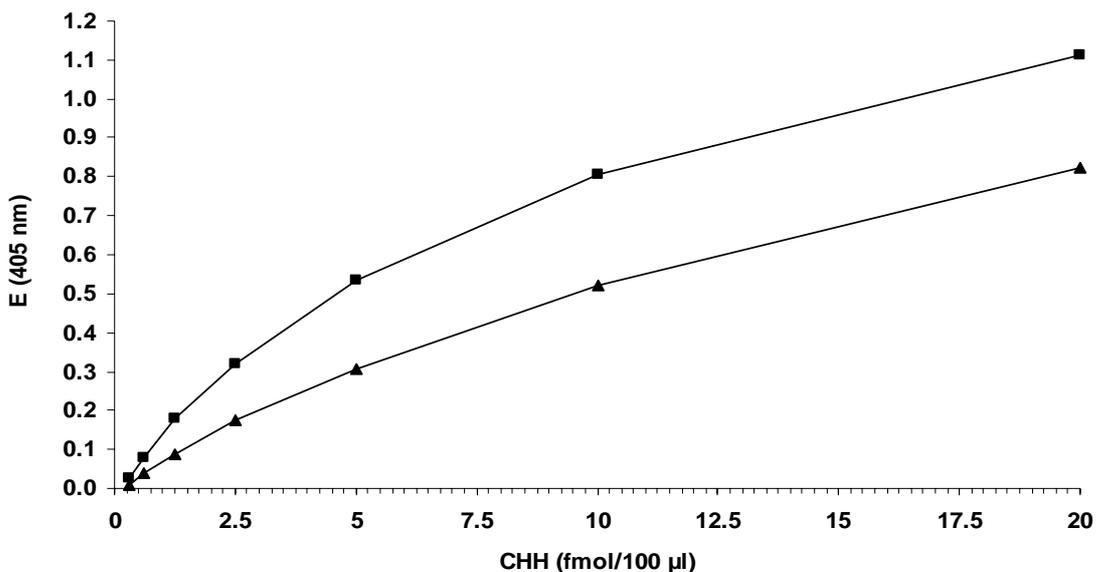
**Abb. 3.8** Hyperglykämische Aktivität von CHH des europäischen Flusskrebse *Astacus astacus*. Es wurde ein Gemisch beider CHH-Isoformen injiziert, wobei sich die Mengenverhältnisse der Isoformen wie bei dem in die Hämolymphe sezernierten Hormon verhielten. Die jeweils injizierten CHH-Dosen sind an der x-Achse angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der Hämolymphe-Glucose-Konzentrationen mit Standardabweichung ( $\pm$  SD); n = 3-6; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte.

Mit \* gekennzeichnete Mittelwerte sind signifikant verschieden vom entsprechenden Saline-Kontrollwert (Students *t*-Test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ).

Die Injektion von CHH führte bei allen Tieren, sowohl nach 1 h als auch nach 2 h, zu einem signifikanten Anstieg der Hämolymphe-Glucose-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollwerten bei Saline-injizierten Tieren. Da sich die Glucose-Spiegel der Hämolymphe bei den geringeren CHH-Dosen von 6,25 und 12,5 pmol nicht drastisch änderten, wurde die CHH-Dosis in größeren Schritten erhöht. Insgesamt war aber eine klare Abhängigkeit von der injizierten CHH-Menge erkennbar, die sich insbesondere bei den 2 h-Werten deutlich bemerkbar machte. So stiegen die Glucose-Spiegel der Hämolymphe im Vergleich zum Nullwert mit zunehmender CHH-Dosis von der dreifachen Menge bei 6,25 pmol bis hin zu der zehnfachen Menge bei 62,50 und 93,75 pmol injiziertem CHH an.

### 3.2.2 Bestimmung der Kreuzreaktivität von *Astacus astacus*-CHH mit anti-*Orconectes limosus* CHH-Serum

Bei den physiologischen Experimenten wurde zur Bestimmung der CHH-Konzentrationen mittels ELISA stets ein *Orconectes limosus* CHH-Antiserum eingesetzt, da kein spezifisches Antiserum für die neuentdeckten CHH-Isoformen vorlag. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der hyperglykämischen Hormone beider Spezies wurde aber ein ausreichend hohes Maß an Antigenerkennung durch das Antiserum erwartet. Um diese genauer zu ermitteln, wurden CHH-Standardkurven beider Flusskrebsarten im ELISA miteinander verglichen.



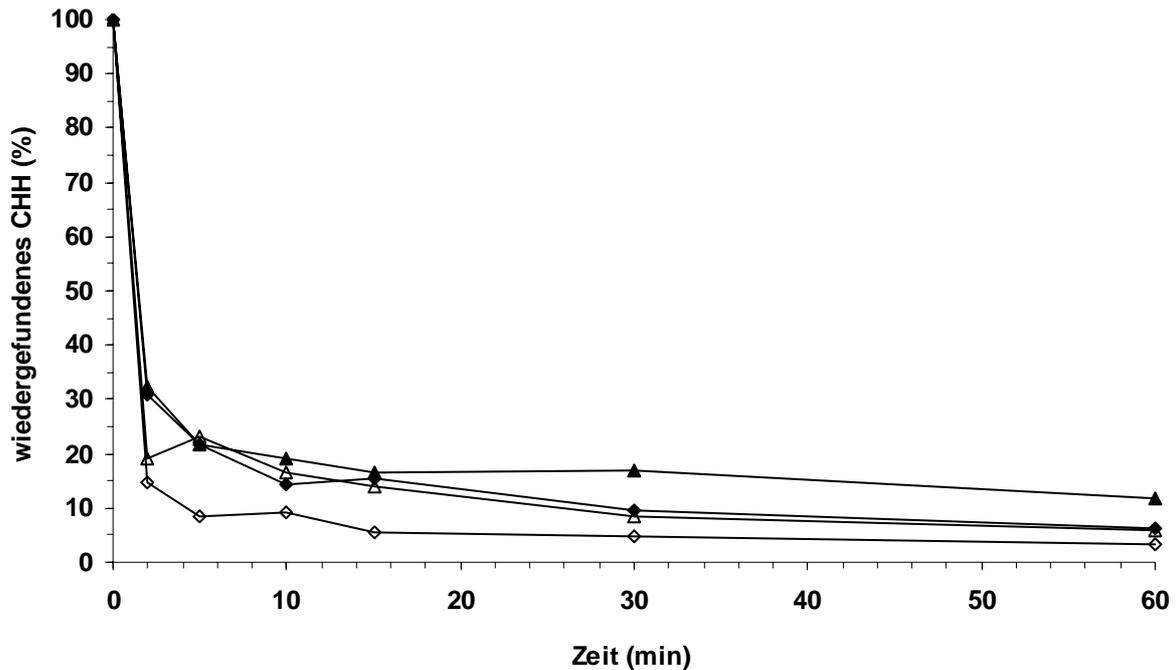
**Abb. 3.9** CHH-Standardkurven der Flusskrebsarten *Astacus astacus* (▲) und *Orconectes limosus* (■) im ELISA. Die Standardkurve des *Astacus astacus*-CHH ist im Vergleich zu der von *Orconectes limosus*-CHH deutlich nach rechts verschoben.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften des *Orconectes limosus* Antiserums für die CHH-Isoformen von *Astacus astacus* führte zu einer zufriedenstellenden Standardkurve, deren Extinktionswerte bei gleicher CHH-Konzentration jedoch deutlich niedriger ausfielen, d. h. die nach rechts verschoben war. Um einen Wert der optischen Dichte von 0,5 zu erzielen, reichte beim *Orconectes limosus* Standard eine Konzentration von 4,6 fmol/100 µl aus. Bei dem *Astacus astacus* Standard war hierzu eine Konzentration von 9,5 fmol/100 µl erforderlich. Daraus ergibt sich ein Kreuzreaktivitätsfaktor von 48,43 %. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, der vergleichbare Standardkurven ergab und zu einem Kreuzreaktivitätsfaktor von 54,35 % führte. Im Mittel lässt sich die Kreuzreaktivität des *Orconectes limosus* Antiserums für *Astacus astacus* CHH folglich mit etwa 50 % beschreiben.

Als Konsequenz daraus wurden alle mit dem *Orconectes limosus* Standard gemessenen Proben mit dem Faktor 2 multipliziert. Nachdem die Standardkurve mit dem *Astacus astacus* Standard einen ordentlichen Verlauf zeigte und gut reproduzierbar war, wurden die nachfolgenden Messungen mit diesem Standard durchgeführt. Somit konnte der Kreuzreaktivitätsfaktor ignoriert werden.

### 3.2.3 Bestimmung der *in vivo* Halbwertszeit von CHH

Die Bestimmung der Halbwertszeit des CHH, also der Zeit, in der die Hälfte des Hormons aus dem Hämolymphekreislauf entfernt wird, war von besonderer Bedeutung, da auf dieser Basis die hormonale Wirkung des CHH besser beurteilt werden kann. Dazu wurden 4 Versuchstieren 25 pmol CHH in 10 µl Van Harreveld Saline injiziert, und der Verlauf der CHH-Konzentration in der Hämolymphe wurde sukzessive gemessen. Der prozentuale Anteil an wiedergefundenem CHH wurde auf Grundlage des aus dem Körpergewicht geschätzten Hämolymphevolumens berechnet. Im Detail wurde die CHH-Konzentration der Nullprobe eines jeden Tieres auf eine CHH-Gesamtkonzentration in der Hämolymphe hochgerechnet. Dabei wurde ein Hämolymphevolumen von 25 ml (entsprechend etwa 26 % des Körpergewichtes von 95-100 g) zugrunde gelegt. Anschließend wurden die injizierten 25 pmol CHH hinzuaddiert und der resultierende Wert mit 100 % gleichgesetzt. Die CHH-Gesamtkonzentrationen zu den übrigen Zeitpunkten wurden ebenfalls auf Grundlage des Hämolymphevolumens hochgerechnet. Durch Vergleich mit der mit 100 % gleichgesetzten Ausgangskonzentration wurde die Rate an wiedergefundenem CHH berechnet. Dabei ergaben sich nachfolgend dargestellte Verlaufskurven (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** *in vivo* Abnahme der Konzentration von CHH in der Hämolymphe von *Astacus astacus* nach Injektion von 25 pmol CHH. Die CHH-Konzentrationen der Hämolympfproben wurden mittels CHH-ELISA ermittelt und daraus unter Berücksichtigung des geschätzten Hämolympfvolumens der Tiere die prozentualen Werte an wiedergefundenem CHH nach definierten Zeitpunkten berechnet. Δ: Tier 1; ▲: Tier 2; ◇: Tier 3; ◆: Tier 4

Die Analyse des Verlaufs der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe der injizierten Tiere ergab einen rapiden Abfall unmittelbar nach der Injektion (vgl. Abb. 3.10). Bereits nach 2 min lag die Rate an wiedergefundenem CHH in der Hämolymphe aller vier Tiere unter 35 %. Bei den Tieren 1 und 3 lag sie sogar unterhalb von 20 %. Die *in vivo* Halbwertszeit für das CHH (50 % Wiederfindungsrate) bei *Astacus astacus* lag zwischen 1,5 und 2 min (vgl. Abb. 3.10), wobei alle Tiere einen einheitlichen Grundverlauf der CHH-Konzentration zeigten. Offensichtlich wurde innerhalb von 2 min ein Großteil des CHH aus der Hämolymphe eliminiert, sei es durch Degradation oder Bindung an Gewebe. Danach nahmen die CHH-Konzentrationen nur noch sehr langsam ab. Einschränkend muss man bei diesem Experiment jedoch beachten, dass der Einfluss des endogenen CHH der Tiere nicht beurteilt werden kann, da die ELISA-Messung sowohl endogenes als auch exogen zugeführtes CHH gleichermaßen detektiert. Zudem wurde bei verschiedenen Crustaceen-Spezies eine Zirkulationszeit von etwa 2 Minuten bestimmt, die für die gleichmäßige Verteilung einer injizierten, inerten Substanz ( $^{14}\text{C}$ -Inulin, unveröffentlichte Ergebnisse aus dem hiesigen Labor) erforderlich ist. Somit wäre der Zeitpunkt für die Entnahme der Nullprobe auf 2 Minuten nach der Injektion festzusetzen. Da aber nach 2 min bereits wesentlich weniger CHH in der Hämolymphe nachzuweisen war

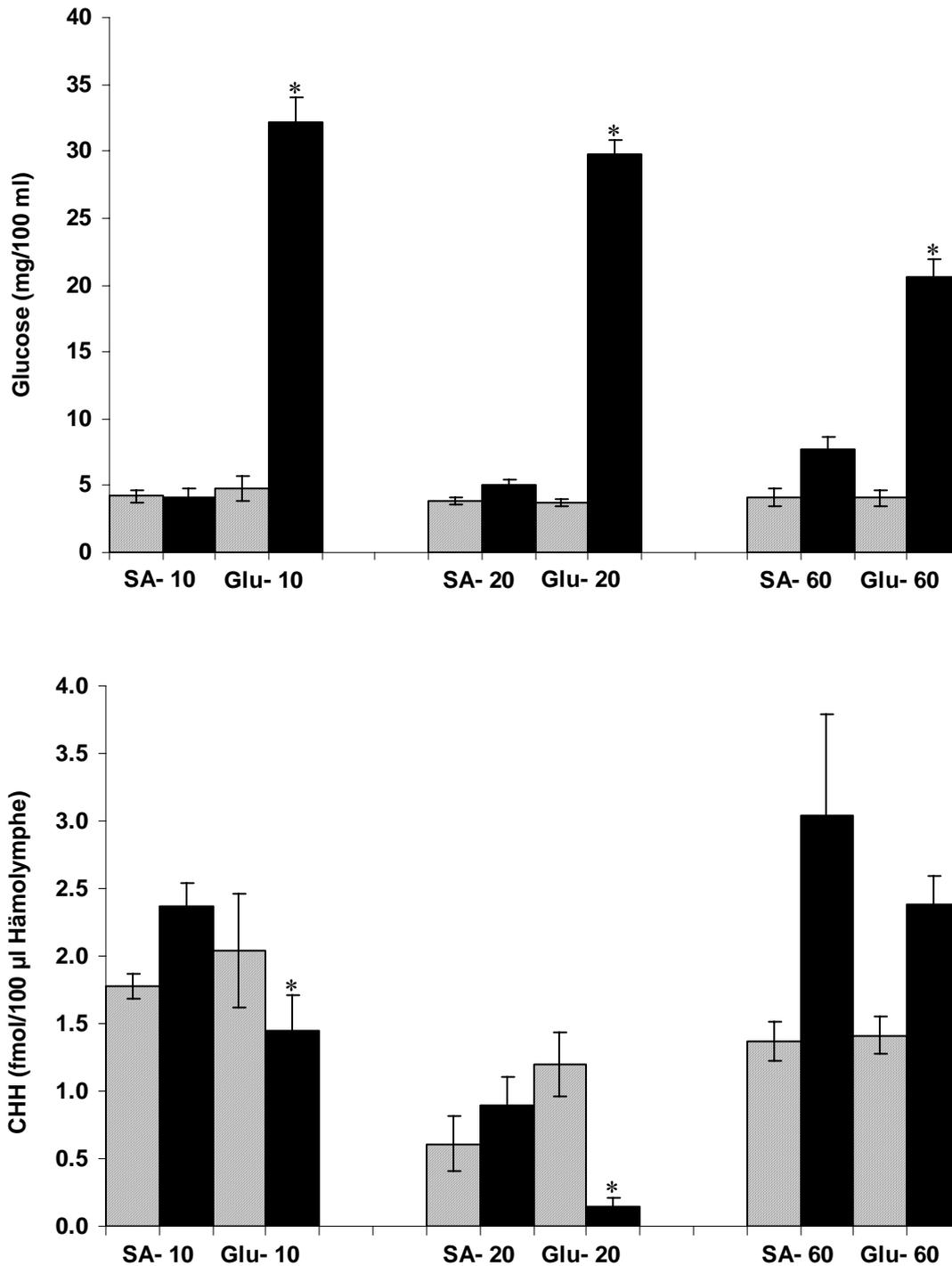
als aufgrund der injizierten Menge zu erwarten gewesen wäre, wurde die errechnete Hämolympfkonzentration unmittelbar vor der CHH-Injektion als Nullprobe festgelegt.

### **3.2.4 Feedback-Effekt von injizierter Glucose**

Das Ziel dieser Versuchsreihe bestand darin, mögliche Zusammenhänge zwischen den Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe und der CHH-Ausschüttung über die Sinusdrüse genauer zu ergründen. Nachdem eine Beeinflussung der elektrischen Aktivität CHH-immunreaktiver Neurone des X-Organs durch D-Glucose eindeutig gezeigt werden konnte (Glowik, 1997), stellte sich die Frage, ob ein Feedback-Effekt von D-Glucose auf die CHH-Freisetzung aus der Sinusdrüse direkt nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden die CHH-Titer in der Hämolymphe nach Injektion von D-Glucose bestimmt. Neben dem europäischen Flusskrebs *Astacus astacus* wurde in einem Parallelexperiment auch der amerikanische Flusskrebs *Orconectes limosus* untersucht.

#### **3.2.4.1 Studien am europäischen Flusskrebs *Astacus astacus***

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen zu einem Feedback-Effekt von 8 mg injizierter D-Glucose dargestellt. Abbildung 3.11 zeigt die entsprechenden Entwicklungen der CHH- bzw. Glucose-Titer in der Hämolymphe.

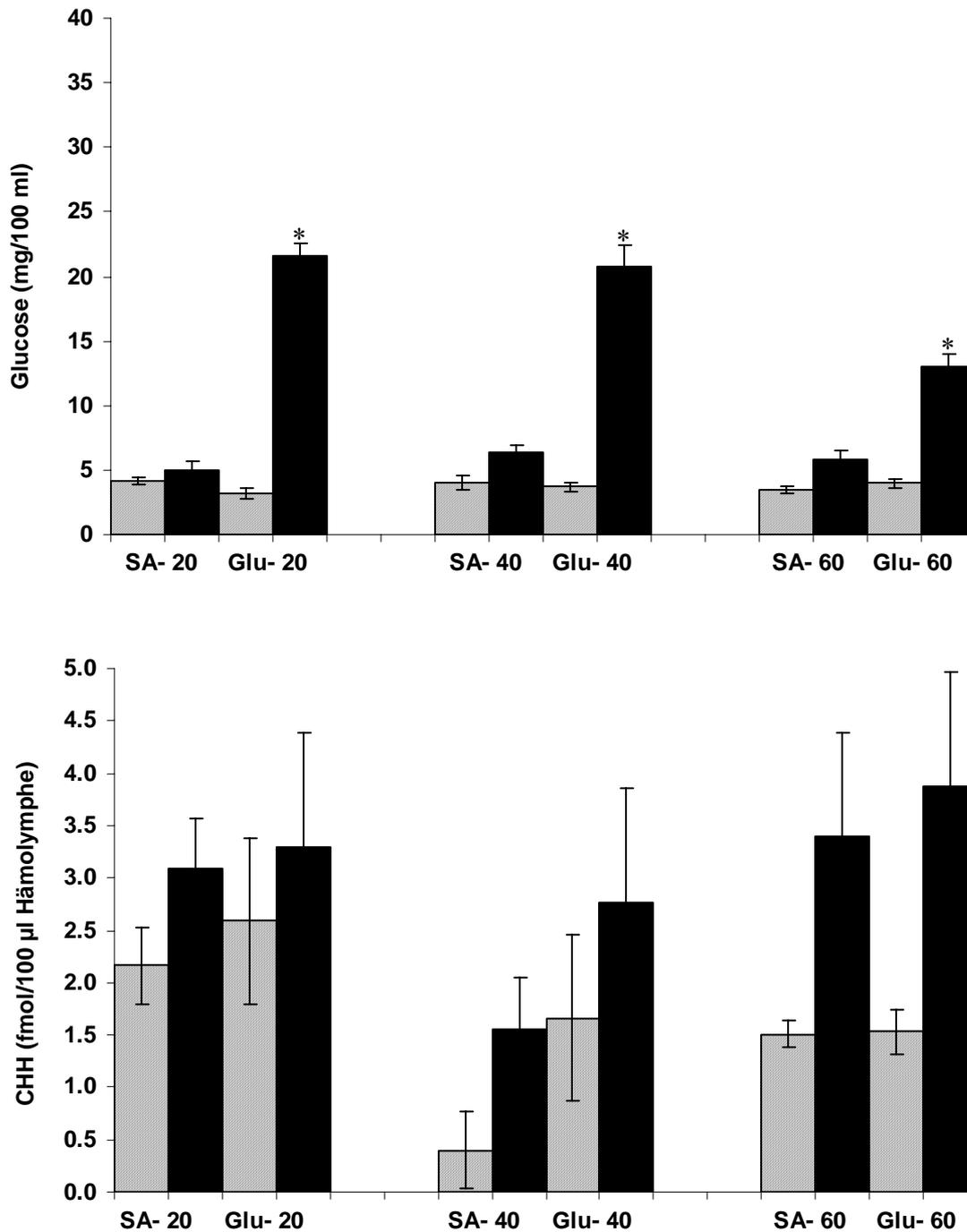


**Abb. 3.11** Veränderung der Glucose- (oben) bzw. CHH-Titer (unten) in der Hämolymph von *Astacus astacus* nach Injektion von 8 mg D-Glucose bzw. Saline. Paarweise angegeben sind jeweils die Mittelwerte vor und nach der Injektion von Saline bzw. D-Glucose  $\pm$  Standardfehler (SEM),  $n=10$ . An der x-Achse ist für jedes Paar die injizierte Substanz sowie der Zeitpunkt der 2. Probenentnahme (min) angezeigt. SA-10/20/60: Saline-Injektion und 2. Probenentnahme nach 10, 20 bzw. 60 min; Glu-10/20/60: Glucose-Injektion und 2. Probenentnahme nach 10, 20 bzw. 60 min; schraffierte Säulen: Nullwerte; schwarze Säulen: 10 min-, 20 min- bzw. 60 min-Werte; mit \* markierte Säulen sind signifikant verschieden vom Saline-Kontrollwert (Students  $t$ -Test,  $p<0,05$ ).

Wie die Darstellung der Daten von *Astacus astacus* in Abbildung 3.11 klar zeigt, gab es im Zeitraum bis zu 20 min nach der Injektion von D-Glucose einen signifikanten Abfall der CHH-Titer im Vergleich zur Nullprobe, wohingegen die CHH-Titer bei Saline-injizierten Tieren anstiegen. Zudem waren die CHH-Konzentrationen nach 10 und 20 min bei D-Glucose-injizierten Tieren signifikant niedriger als die der entsprechenden Kontrolltiere mit Saline-Injektion. Nähere statistische Untersuchungen im Hinblick auf den Abfall der CHH-Titer bei den mit D-Glucose injizierten Tieren über den Versuchszeitraum ergaben nur bei der 20 min-Gruppe einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Nullwert (Friedman-Test,  $p < 0,05$ ). Somit macht sich die Wirkung der injizierten D-Glucose in Form eines deutlichen Feedback-Effektes auf die CHH-Ausschüttung an der Sinusdrüse vermutlich nach einem Zeitraum von 10 bis 20 min bemerkbar. Dies entspricht auch der Zeitspanne, in der die höchsten Glucose-Titer in der Hämolymphe beobachtet wurden. Nach 60 min waren die Glucose-Titer in der Hämolymphe bereits stärker abgefallen und die CHH-Konzentration zeigte wieder einen Anstieg im Vergleich zum Nullwert. Offensichtlich ist zu diesem Zeitpunkt die D-Glucose-Konzentration der Hämolymphe unter einen gewissen Schwellenwert gesunken und infolgedessen erfolgt keine Hemmung der CHH-Ausschüttung mehr. Demnach wird anscheinend im Zeitraum zwischen 20 und 60 min der Einfluss der injizierten D-Glucose kompensiert und die CHH-Konzentration in der Hämolymphe wieder auf das Grundniveau reguliert. Möglicherweise erfolgt dabei eine Art Überkompensation, so dass die CHH-Titer höher liegen als die zu Beginn des Experimentes. Dieser Anstieg, ebenso wie der Anstieg der CHH-Titer nach Injektion von Saline, ist aber eher eine unvermeidbare Folge von Stresseffekten, die bei den D-Glucose-injizierten Tieren vermutlich zunächst durch den Feedback-Effekt der D-Glucose ausgeglichen werden. Offensichtlich in Reaktion auf die erhöhten CHH-Titer zeigte sich auch bei Saline-injizierten Tieren ein leichter Anstieg der Glucose-Konzentrationen, der jedoch bei den längeren Versuchsintervallen deutlicher hervortrat.

#### **3.2.4.2 Studien am amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus***

Nachdem bei *Astacus astacus* eine Absenkung des CHH-Titers in der Hämolymphe durch Erhöhung der Glucose-Konzentration gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob dieser Effekt auch bei *Orconectes limosus* nachweisbar war.



**Abb. 3.12** Glucose- (oben) bzw. CHH-Titer (unten) in der Hämolymph von *Orconectes limosus* nach Injektion von 2 mg D-Glucose bzw. Saline. Die Mittelwerte vor und nach der Injektion von Saline bzw. D-Glucose  $\pm$  Standardfehler (SEM) sind jeweils paarweise dargestellt,  $n = 10$ . Die injizierte Substanz sowie der Zeitpunkt der 2. Probenentnahme (min) sind an der x-Achse angegeben. SA-20/40/60: Saline-Injektion und 2. Probenentnahme nach 20, 40 bzw. 60 min; Glu-20/40/60: Glucose-Injektion und 2. Probenentnahme nach 20, 40 bzw. 60 min; schraffierte Säulen: Nullwerte; schwarze Säulen: 10 min-, 20 min- bzw. 60 min-Werte; mit \* markierte Säulen sind signifikant verschieden vom Saline-Kontrollwert (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$ ).

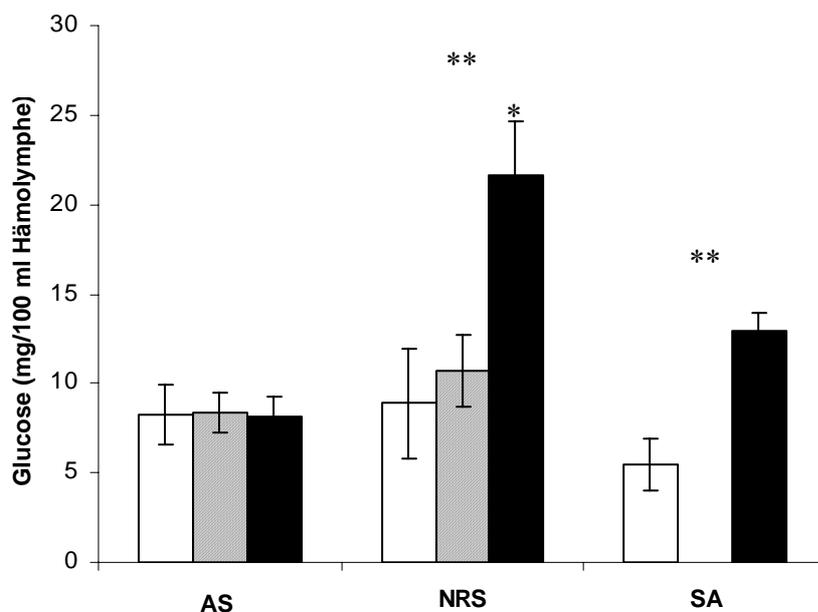
Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 dargestellt. Bei dieser Art konnte zu keinem Zeitpunkt eine Absenkung der CHH-Titer infolge der Injektion beobachtet werden. Auffallend war, dass eine deutlichere Steigerung der CHH-Konzentrationen in Relation zum Nullwert bei den längeren Zeitintervallen zu beobachten war. In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen bei dem Flusskrebs *Astacus astacus* war dieser Anstieg des CHH-Titers dann auch nach 60 min am deutlichsten. Zudem gab es bei *Orconectes limosus* ähnlich erkennbare Zusammenhänge zwischen der Entwicklung der CHH-Titer D-Glucose-injizierter Tiere und den zugehörigen Glucose-Konzentrationen, die zunächst langsam, zwischen 20 und 60 min aber entscheidend stärker abfielen. Da bei den Saline-injizierten Tieren ein Anstieg der CHH-Titer und vermutlich in Reaktion darauf auch ein Anstieg der Glucose-Titer festzustellen war, müssen auch hier versuchsbedingte Stresseffekte als Ursache in Betracht gezogen werden. Es ist anzunehmen, dass hier ein stärkerer Stresseffekt, d. h. eine Erhöhung der CHH-Titer allein durch die Saline-Injektion, einen eventuell vorhandenen negativen Feedback-Effekt maskiert.

### 3.2.5 Antiserum-Neutralisation

Der hyperglykämische Effekt von injiziertem CHH wurde klar gezeigt. Eine weitere Frage ist, ob die Aufrechterhaltung der endogenen physiologischen Glucose-Konzentration in der Hämolymphe auf die kontinuierliche Freisetzung von CHH, die in dem stets messbaren endogenen CHH-Titer resultiert, zurückzuführen ist. Durch Reduktion des frei zirkulierenden, aktiven Hormons durch CHH-Antiserum sollte diese regulatorische Funktion des CHH bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Glucose-Konzentration in der Hämolymphe nachweisbar sein. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Hämolympfvolumina wurden *Astacus astacus* und *Orconectes limosus* unterschiedliche Mengen an Antiserum injiziert und die Entwicklung der Glucose-Titer beobachtet. In Kontrollexperimenten an *Orconectes limosus* wurde die Wirksamkeit des Antiserums in Hinblick auf die Bindung und die daraus resultierende Blockierung von freiem CHH in der Hämolymphe überprüft. Dies erfolgte in Form kombinierter Injektionen von Antiserum und SD-Extrakt bzw. Normalserum und SD-Extrakt.

#### 3.2.5.1 Studien an *Astacus astacus*

Den Flusskrebsen wurde eine Injektion von 30 µl Antiserum, normalem Kaninchenserum oder Van Harrveld Saline verabreicht. Die daraus resultierende Entwicklung des Glucose-Spiegels in der Hämolymphe ist in Abb. 3.13 dokumentiert.



**Abb. 3.13** Effekt der Injektion von 30  $\mu$ l anti-*Orconectes limosus* Serum, normalem Kaninchenserum bzw. Van Harreveld Saline auf die Glucose-Konzentration in der Hämolymphe von *Astacus astacus*. Dargestellt in Dreiergruppen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die injizierte Substanz ist unterhalb der Dreiergruppe angezeigt. AS: Antiserum; NRS: normales Kaninchenserum; SA: Van Harreveld Saline; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 10 für Antiserum- und Normalserum-Injektion, n = 4 für Saline-Injektion. Bei der Saline-Injektion wurde kein 1 h-Wert genommen.

\* signifikant verschieden zum entsprechenden AS-Wert (Students *t*-Test,  $p < 0,05$ )

\*\* signifikant verschiedene Werte innerhalb der Gruppe (Friedman-Test,  $p < 0,05$ )

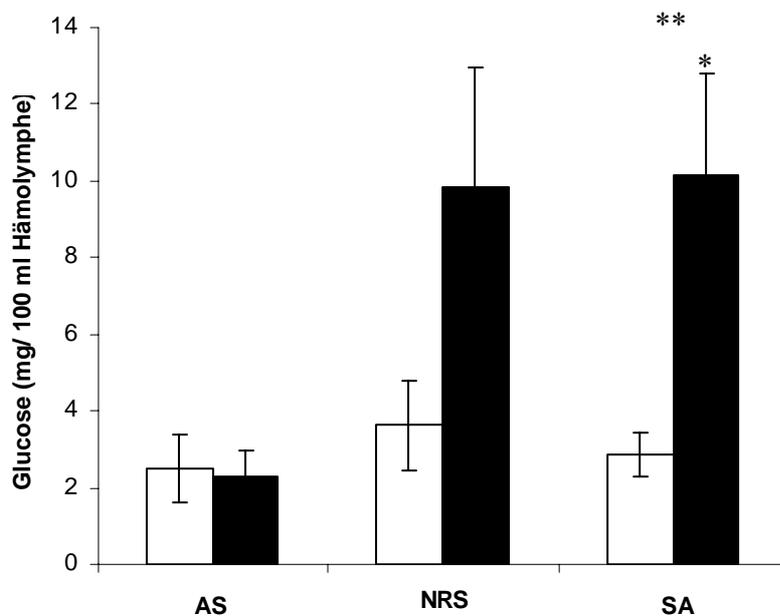
Nach der Injektion von 30  $\mu$ l Antiserum war bei den Tieren über den Versuchszeitraum von 2 h keine wesentliche Veränderung der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe zu beobachten. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine regulatorische Funktion des CHH bei der Kontrolle der physiologischen Glucose-Konzentration. Dies wird insofern unterstützt, als die 2 h-Werte dieser Versuchsgruppe signifikant verschieden zu den 2 h-Werten der mit Normalserum injizierten Tiergruppe waren und die Nullwerte beider Gruppen sich nur unwesentlich unterschieden. Die mit Normalserum behandelten Tiere zeigten eine deutliche, innerhalb der Versuchsgruppe signifikante Steigerung des Glucose-Titers, insbesondere im Zeitraum zwischen 1 h und 2h. Ob dieser Effekt auf das Normalserum zurückzuführen war, wurde durch die Injektion von Van Harreveld Saline überprüft, allerdings nur mit einer Nullprobe und einem 2 h-Wert. Auch bei diesen Tieren war ein ähnlicher Anstieg der Glucose-Konzentrationen nachweisbar. Die durch Normalserum und Saline erzeugte Hyperglykämie ist offensichtlich wieder auf den praktisch immer beobachteten Injektionsstress zurückzuführen (vgl. Abb. 3.11 und 3.12). Die Tatsache, dass bei Injektion

von Antiserum dieser hyperglykämische Effekt ausbleibt, weist darauf hin, dass eine Absenkung der Blutglucose stattfindet, die den hyperglykämischen Effekt aufhebt. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass eine Neutralisation von endogen zirkulierendem CHH durch die Antikörper zu einer Absenkung des Glucose-Titers führt und somit, dass die kontinuierliche Anwesenheit von CHH für die Aufrechterhaltung des physiologischen Glucose-Titers essentiell ist.

Die Injektion der Protein A Sepharose-gereinigten Antikörper (50 µl IgG-Lösung) erbrachte keine wesentliche Veränderung der Ergebnisse. In diesem Experiment ließ sich bei einer Gruppe von 8 Tieren kein eindeutiger Einfluss der injizierten Antikörper auf die Glucose-Konzentration in der Hämolymphe nachweisen. Diese stieg zum Teil minimal an, so dass man lediglich von einer Kompensation des Stresseffektes durch die Antikörper-Injektion sprechen kann. Das Auftreten eines unvermeidbaren Stresseffektes erschwert somit den eindeutigen Nachweis einer regulatorischen Funktion von CHH. Von einer Darstellung der Ergebnisse wurde daher abgesehen.

### 3.2.5.2 Studien an *Orconectes limosus*

Den Tieren dieser Flusskrebsspezies wurden 2 µl jeder Substanz injiziert und die Entwicklung des Glucose-Titers analysiert. In diesem Fall wurden die Hämolympfproben 5 h nach den Injektionen genommen.

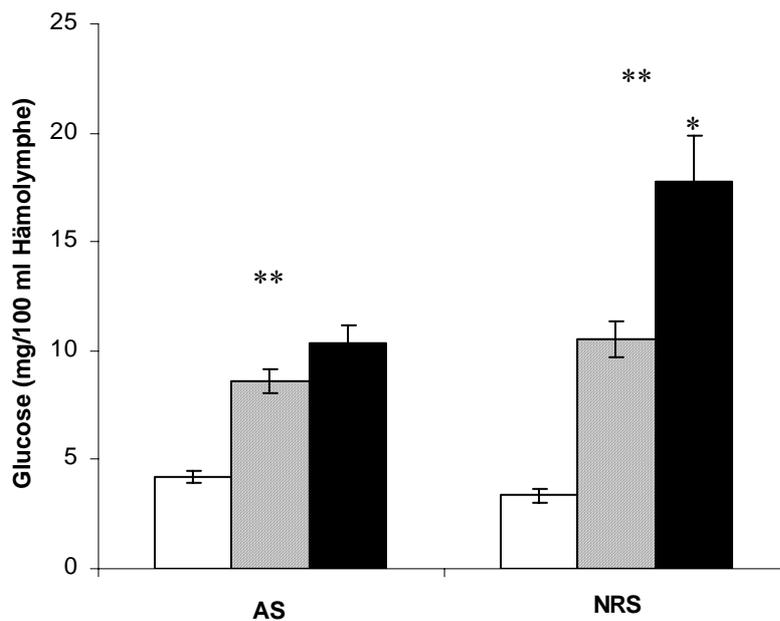


**Abb. 3.14** Einfluss der injizierten Substanzen (2 µl Volumen) auf den Glucose-Titer. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) nach 0 h und 5 h sind paarweise dargestellt. Die injizierte Substanz ist an der x-Achse angegeben, n = 5 pro Versuchsgruppe. AS: Antiserum; NRS: normales Kaninchenserum; SA: Van Harreveld Saline; weiße Säulen: 0 h-Werte; schwarze Säulen: 5 h-Werte; \* signifikant

verschieden zum AS-Wert nach 5 h (Students *t*-Test,  $p < 0,05$ );\*\* signifikant verschiedene Werte innerhalb der Gruppe (Friedman-Test,  $p < 0,05$ ).

Injektion von Antiserum führte zu einer leichten, gegenüber dem Nullwert statistisch nicht signifikant verschiedenen Erniedrigung des Glucosespiegels, der jedoch im Vergleich zum Glucose-Titer der Saline-injizierten Tiere nach 5 h signifikant verschieden war. Auch ein Vergleich mit dem 5 h-Wert der Normalserum-injizierten Tiergruppe zeigte einen sehr deutlichen Unterschied, der allerdings wegen höherer Streuung der Werte nur nahezu signifikant war (Students *t*-Test,  $p = 0,065$ ). Wie schon bei *Astacus astacus* beobachtet, führten die Injektionen grundsätzlich zu Stresseffekten, die sich in dem sehr deutlichen Anstieg der Glucose-Titer nach Injektion von Normalserum bzw. Van Harreveld Saline zeigten. Das Ausbleiben dieses Anstiegs bei Antiserum-injizierten Tieren weist wieder darauf hin, dass die Hyperglykämie-verursachende, stressbedingte Freisetzung von CHH durch Antikörper-Neutralisation kompensiert wurde. Auch für *Orconectes limosus* lieferte das Experiment somit Hinweise auf eine regulatorische Funktion des CHH im Hinblick auf die Aufrechterhaltung der physiologischen Glucose-Konzentrationen, jedoch ist auch hier ein einfacher, eindeutiger Beweis in Form einer statistisch signifikanten Absenkung des normalen Glucose-Titers durch den gegenläufigen Prozess der stressbedingten CHH-Erhöhung erschwert.

In weiteren Experimenten wurde die Menge des injizierten Antiserums auf 10  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$  erhöht, ein Versuch, durch Erhöhung der CHH-Neutralisation den Einfluss des Injektionsstresses zu reduzieren. Repräsentativ dafür wird im Folgenden das Experiment mit einer zehnfach erhöhten Antiserum-Menge dargestellt, da sich bei beiden Versuchsansätzen vergleichbare Ergebnisse zeigten. Die Tiere wurden in diesem Experiment mit 20  $\mu\text{l}$  reinem Antiserum, die Kontrolltiere entsprechend mit normalem Kaninchenserum injiziert. Von einer Saline-Injektion wurde abgesehen, da sich dabei keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu der Injektion von Normalserum ergeben hatten. Die physiologischen Veränderungen auf Glucose-Ebene sind in der folgenden Grafik dargestellt.



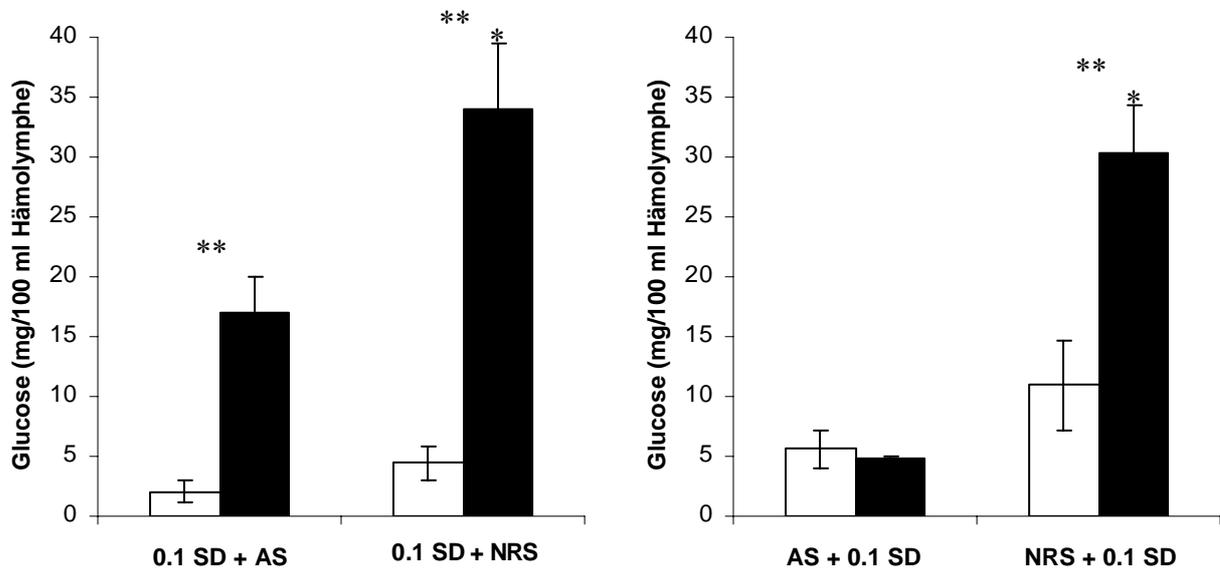
**Abb. 3.15** Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Orconectes limosus* nach Injektion von 20 µl Antiserum bzw. normalem Kaninchenserum. Angegeben in Dreiergruppen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Messzeitpunkten,  $n = 12$ . Die Beschriftung der x-Achse indiziert die verwendete Injektionssubstanz. AS: Antiserum; NRS: normales Kaninchenserum; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; \* signifikant verschieden vom entsprechenden AS-Wert (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$ ); \*\* signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe (Friedman-Test,  $p < 0,05$ ).

Der Ansatz, die versuchsbedingten Stresseffekte durch eine größere Antiserum-Menge zu kompensieren, zeigte keinen Erfolg. Offensichtlich führte das höhere Injektionsvolumen zu einem höheren Injektionsstress, da die Glucose-Titer der Hämolymphe im gesamten Versuchszeitraum sogar signifikant anstiegen. Eine deutliche Kompensation des Stresseffektes durch die Antiserum-Injektion war innerhalb des kürzeren Versuchszeitraumes von 2 h nicht mehr zu beobachten. Lediglich im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Normalserum-Injektion machte sich der Einfluss des Antiserums in Form signifikant niedrigerer Glucose-Titer bemerkbar.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch die Injektion von 16,5 µl IgG-Lösung erzielt, so dass die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt wurden. Anscheinend hat die Zusammensetzung des Rohserums keinen Einfluss auf den Versuchsverlauf.

Eine Grundvoraussetzung für den Erfolg der beschriebenen Experimente war eine Blockierung des in der Hämolymphe zirkulierenden CHH durch die injizierten Antikörper.

Um diese Bindung an Antikörper *in vivo* nachzuweisen, wurde eine Doppelinjektion mit Antiserum und SD-Extrakt vorgenommen. Dabei wurden die beiden Injektionen in einem Abstand von 2 min vorgenommen. Zudem wurde die Injektionsreihenfolge zur Überprüfung entsprechender Einflüsse variiert.



**Abb. 3.16** Veränderung der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Orconectes limosus* nach Doppelinjektion von 0,1 SD-Äquivalenten und 10  $\mu$ l Antiserum bzw. Normalserum (links) sowie in umgekehrter Reihenfolge (rechts). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu den verschiedenen Zeitpunkten sind paarweise dargestellt,  $n = 4$ . Das Injektionsmuster ist an der x-Achse angezeigt. 0,1 SD + AS: 0,1 Sinusdrüsenäquivalente und 2 min später 10  $\mu$ l Antiserum; 0,1 SD + NRS: 0,1 Sinusdrüsenäquivalente und 2 min später 10  $\mu$ l normales Kaninchenserum; AS + 0,1 SD und NRS + 0,1 SD: entsprechend der Beschreibung zuvor nur in umgekehrter Reihenfolge; weiße Säulen: Nullwerte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; \* signifikant verschieden vom entsprechenden AS-Wert (Students *t*-Test,  $p < 0,05$ ); \*\* signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe (Friedman-Test,  $p < 0,05$ ).

Abb. 3.16 demonstriert den eindeutigen Nachweis der Blockierung des in der Hämolymphe zirkulierenden CHH durch die injizierten Antikörper. Dabei war allerdings die Reihenfolge der Injektionen von entscheidender Bedeutung. Wurde zuerst der SD-Extrakt verabreicht, so stiegen die Glucose-Titer in der Hämolymphe sowohl bei Antiserum- als auch bei Normalserum-Zugabe signifikant an. Offensichtlich wurde aber ein Teil des CHH durch Antikörper blockiert, da der Glucose-Anstieg signifikant niedriger als der von Normalserum-injizierten Tieren war. Verabreichte man allerdings das Antiserum zuerst, so wurde der hyperglykämische Effekt des extern zugeführten CHH blockiert. Die Glucose-Konzentrationen der Hämolymphe sanken sogar leicht ab. Im Gegensatz dazu stiegen die

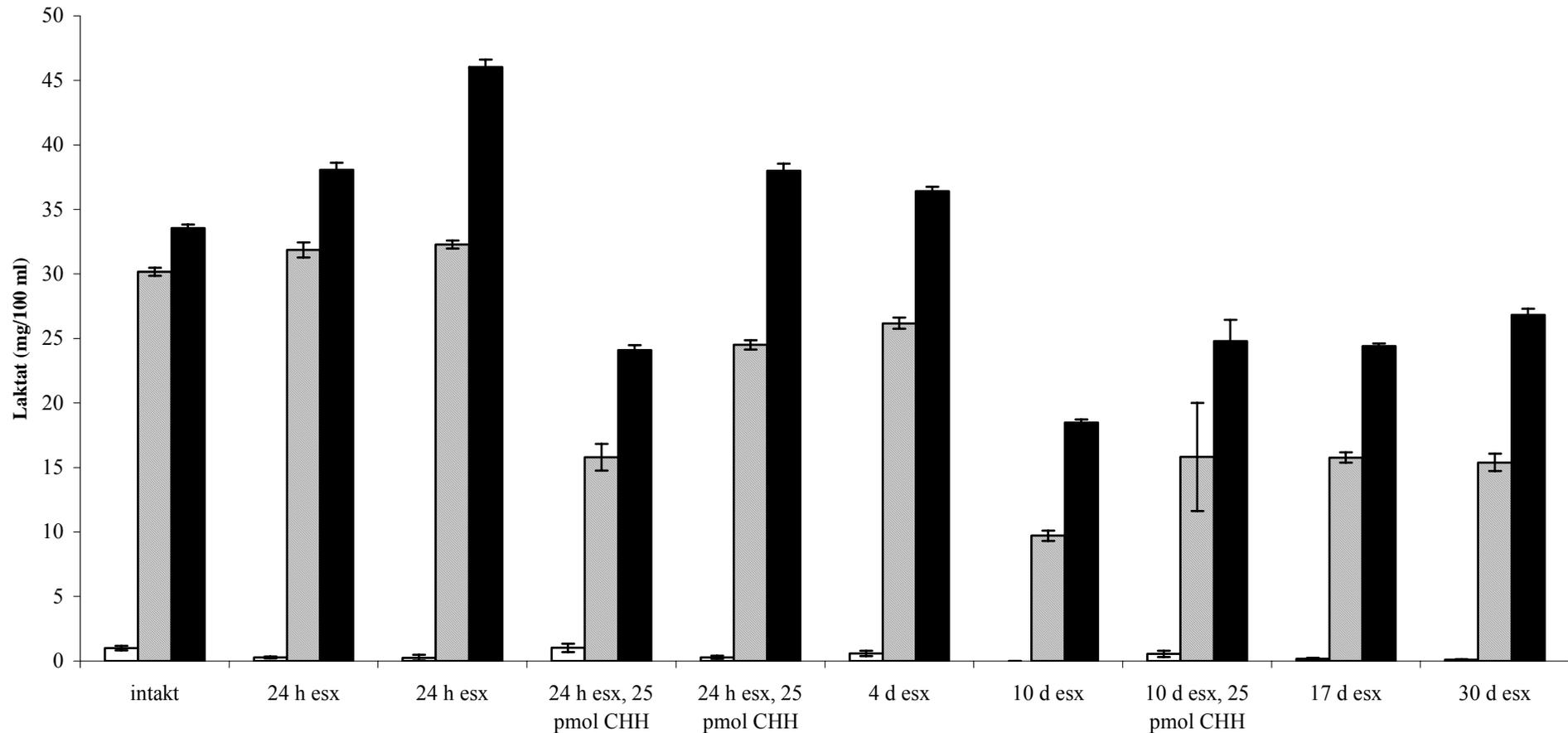
Glucose-Titer innerhalb der Versuchsgruppe mit Normalserum signifikant an. Dieses Ergebnis ist eine zusätzliche Bestätigung für die regulatorische Funktion des CHH *in vivo*. Zwar ist der Abfall innerhalb der Tiergruppe noch nicht signifikant, jedoch spricht der im Vergleich dazu signifikant höhere Glucose-Titer bei der Normalserum-injizierten Gruppe für diese Vermutung.

### **3.2.6 Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie**

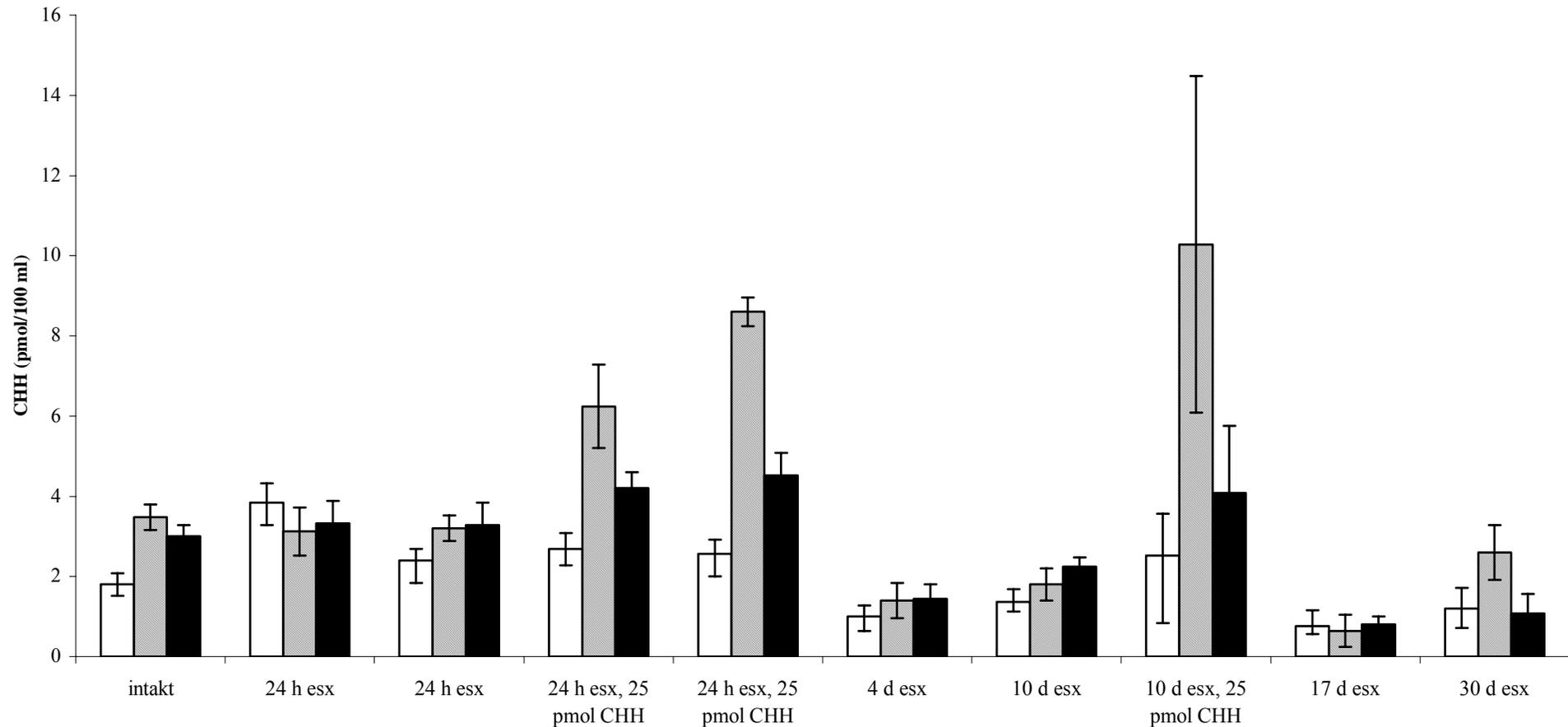
Inwiefern CHH eine bedeutende Rolle bei der Anpassung des Stoffwechsels an hypoxische Umweltbedingungen spielt, war Gegenstand der nachfolgend dokumentierten Untersuchung. Dabei wurden die Parameter Laktat, CHH und Glucose untersucht. Durch Vergleich verschiedener Versuchsanordnungen mit intakten Tieren, augenstiellosen Tieren und augenstiellosen Tieren mit CHH- bzw. Saline-Injektion sollte die Funktion des CHH genauer eingegrenzt werden. Zur Kontrolle wurden auch intakte Tiere bei Normalsauerstoffgehalt untersucht.

#### **3.2.6.1 Experimente bei extremer Hypoxie**

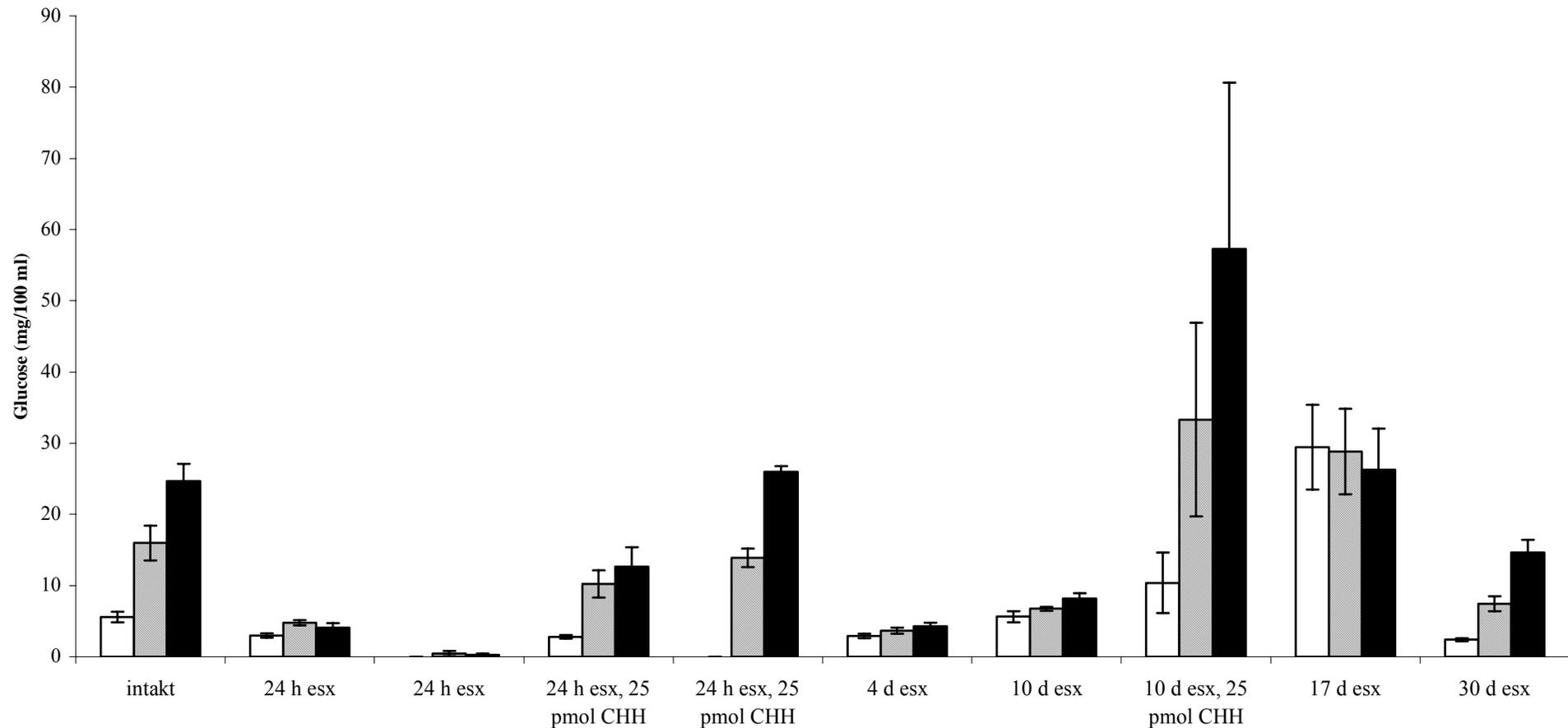
Diese Form von Hypoxiestress wurde durch Haltung der Tiere an der Luft erzeugt. Es wurden die Entwicklungen der Laktat-, CHH- und Glucose-Titer über einen Zeitraum von 2 h dokumentiert. Entsprechende Grafiken sind nachfolgend dargestellt.



**Abb. 3.17** Laktat-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* nach Haltung in Luft (extreme Hypoxie). In Dreiergruppen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. An der x-Achse ist die Versuchsanordnung erklärt. esx: entstielte Tiere; d: Tage; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 24 für die intakten Tiere; n = 5-11 für die übrigen Versuchsgruppen.



**Abb. 3.18** Veränderungen der CHH-Titer in der Hämolymphe von *Astacus astacus* nach Haltung in Luft (extreme Hypoxie). Die Dreiergruppen geben die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten an. Die Versuchsanordnung ist an der x-Achse erklärt. esx: entstielte Tiere; d: Tage; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 24 für die intakten Tiere ; n = 5-11 für die übrigen Tiergruppen.

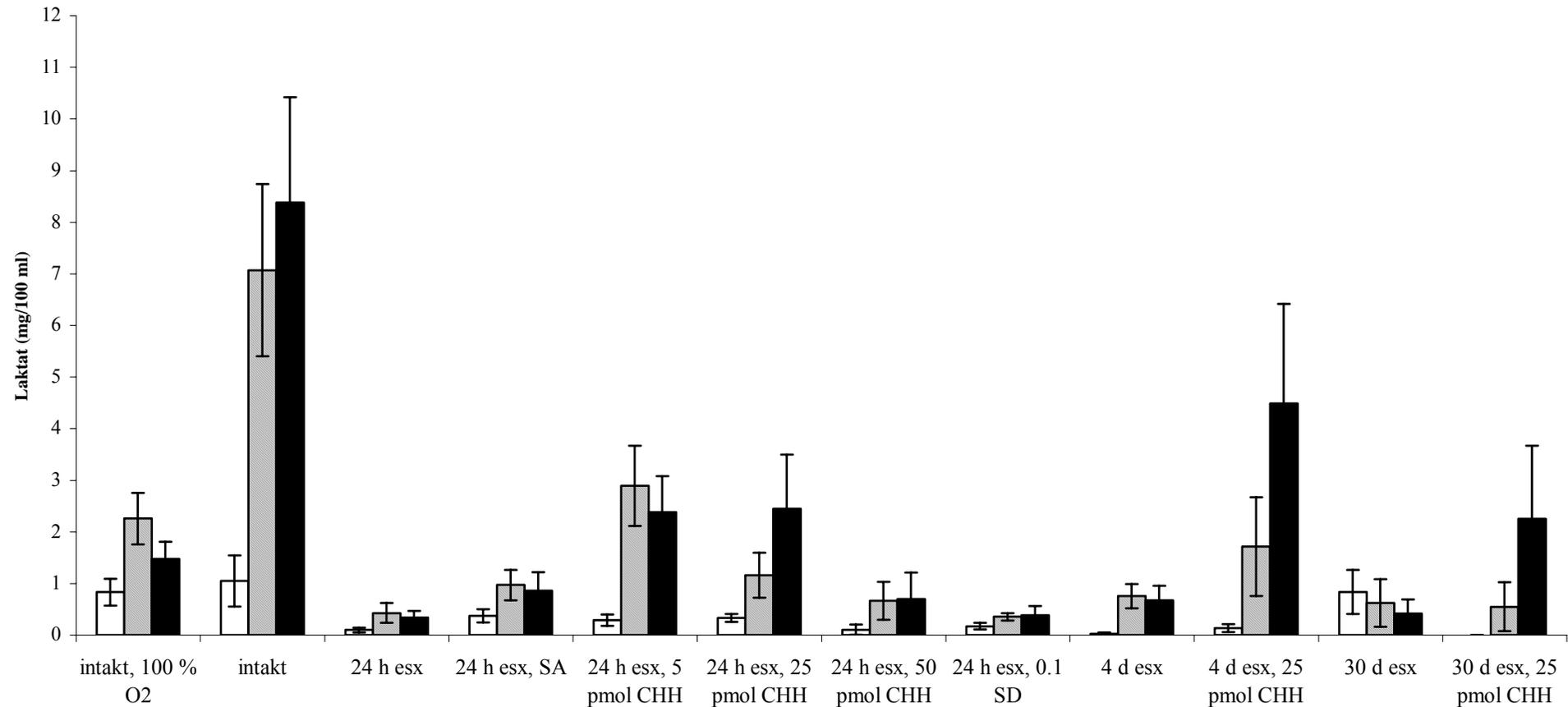


**Abb. 3.19** Entwicklung der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* nach Haltung in Luft (extreme Hypoxie). In Dreiergruppen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Versuchsanordnung ist an der x-Achse angezeigt. esx: entstielte Tiere; d: Tage; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 24 für die intakten Tiere; n = 5-11 für die übrigen Tiergruppen.

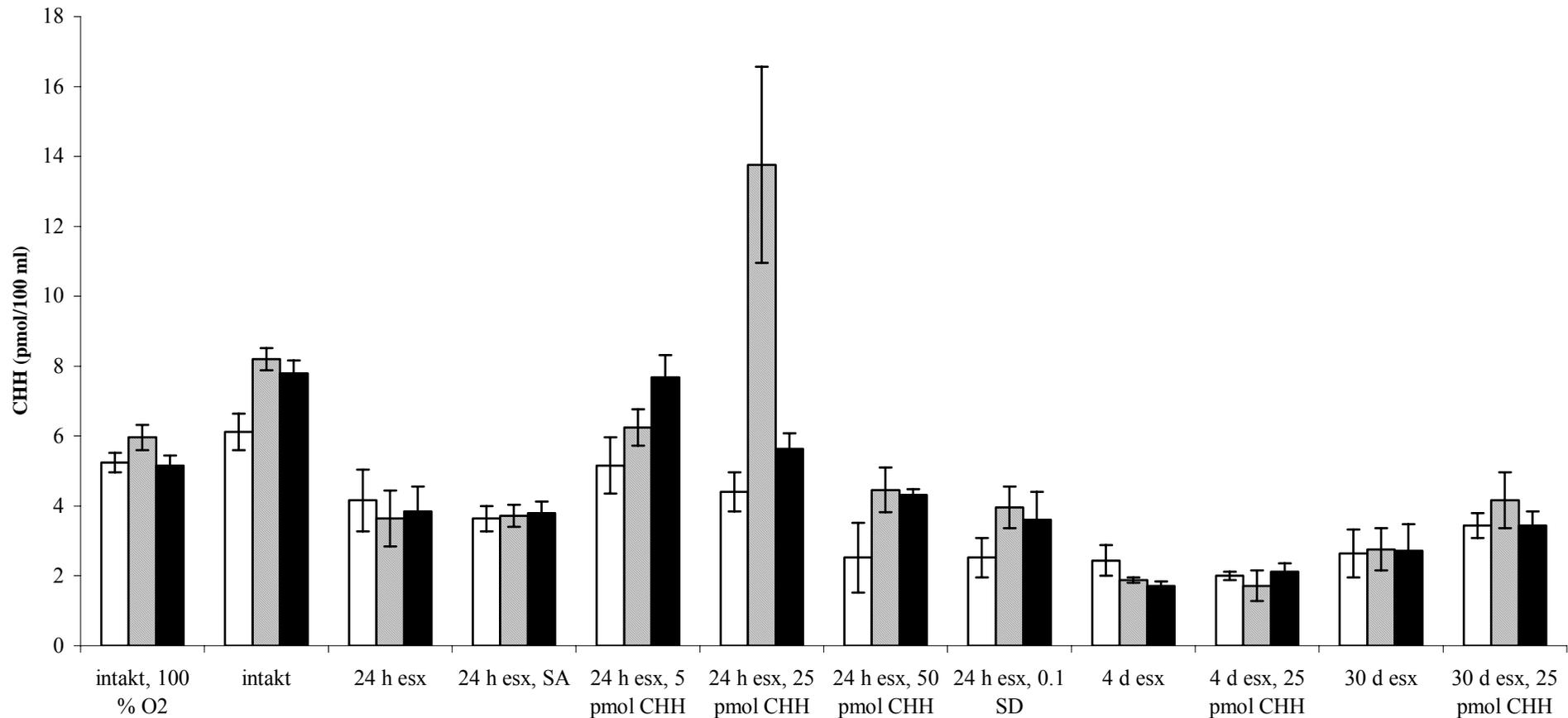
Die Haltung der Versuchstiere in atmosphärischer Luft führte bei allen Tieren zu enormen Anstiegen der Laktat-Konzentrationen in der Hämolymphe. Die Nullwerte zu Beginn des Experimentes wurden über 2 h hinweg zum Teil zwischen dreißig- und fünfundsiebzehnfach erhöht. Die Entfernung der Sinusdrüse als CHH-Quelle spielte dabei ganz offensichtlich keine Rolle mehr. Als Tendenz ließ sich jedoch erkennen, dass die Produktion von Laktat über den Zeitraum der extremen Hypoxie bei den 10 Tage und länger entstielten Tieren schwächer ausfiel und die Injektion von CHH bei entstielten Tieren zum Teil sogar zu gegenteiligen, abschwächenden Effekten zu führen schien (24 h entstielt, 25 pmol CHH; vgl. Abb. 3.17). Da bei den augenstiellosen Tieren die Laktatbildung genauso hoch war wie bei den intakten, ist eine Beteiligung des CHH unwahrscheinlich, obwohl bei intakten Tieren eine Erhöhung des CHH-Titers messbar war. In Anbetracht der Entwicklung der Glucose-Konzentrationen bei intakten Tieren, welche unter extremer Hypoxie um das vier- bis fünffache anstiegen, ist eine Beteiligung des CHH an der Stoffwechsellage in Form einer verstärkten Mobilisierung von Glucose-Reserven denkbar.

### **3.2.6.2 Experimente bei partieller Hypoxie**

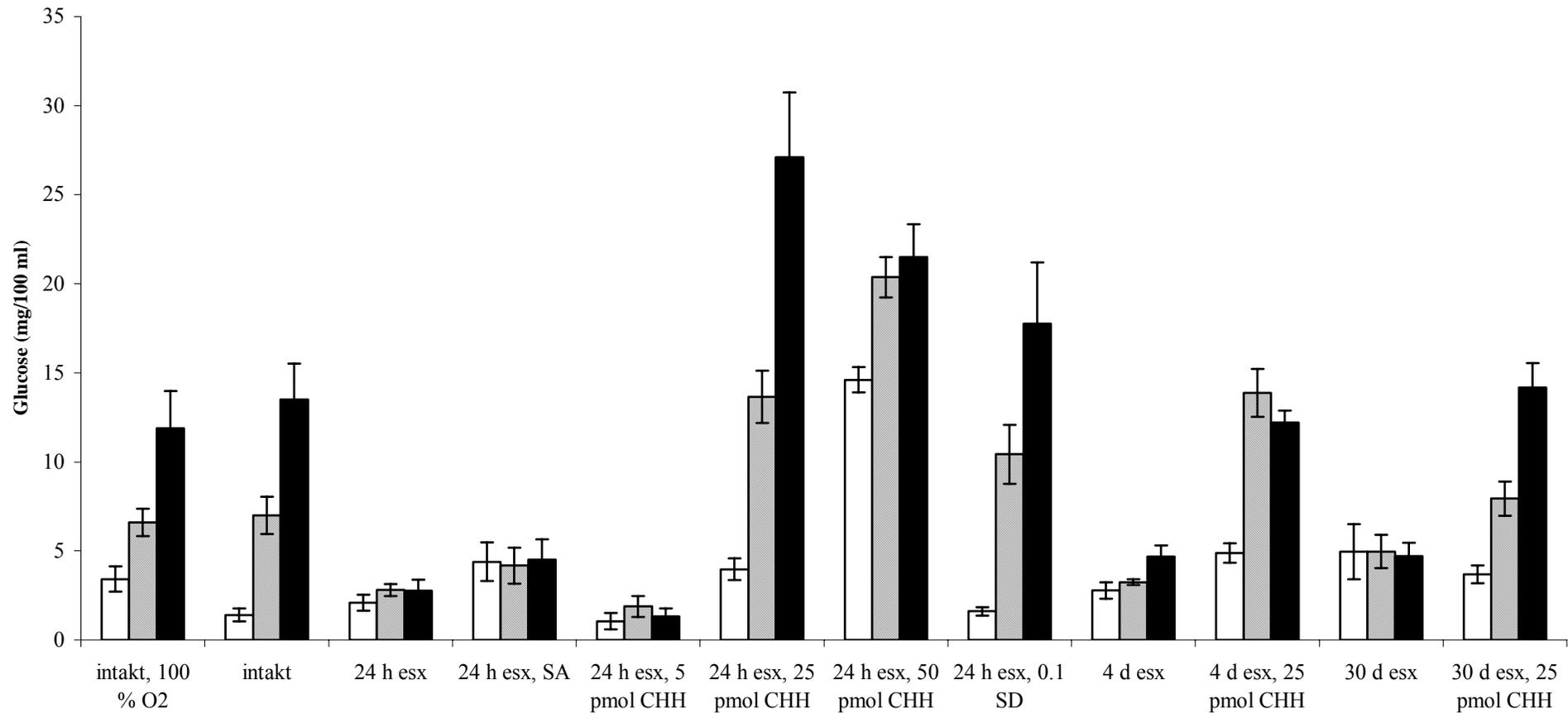
Nachdem die Reaktion der Tiere auf extreme Hypoxie keine sehr klaren Ergebnisse hinsichtlich der Rolle des CHH bei der Adaption gebracht hat, wurden Versuche bei einer moderaten Form der Hypoxie durchgeführt. Bei extremer Hypoxie kann der Abbau von Kohlenhydraten praktisch nur anaerob erfolgen, eine hormonale Regulation spielt sehr wahrscheinlich dabei kaum eine Rolle, wie die zuvor dargestellten Ergebnisse (s. 3.2.6.1) belegen. Anders als bei extremer Hypoxie ist bei einer moderaten Hypoxie noch partiell aerober Stoffwechsel möglich, und es ist vorstellbar, dass CHH eine Rolle bei der Reservemobilisierung spielt. Die moderate Form von Hypoxiestress wurde durch Reduktion der Sauerstoffkonzentration des umgebenden Wassers auf 50 % erzeugt. Es wurden intakte Tiere, augenstiellose Tiere und augenstiellose Tiere mit CHH-Injektion untersucht. In den Abbildungen 3.20-3.22 sind die Entwicklungen der Laktat-, CHH- und Glucose-Titer der einzelnen Versuchstiergruppen im Zeitraum bis zu 2 h dargestellt.



**Abb. 3.20** Veränderung der Laktat-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* unter partieller Hypoxie (auf 50 % reduzierter Sauerstoffgehalt des Wassers). In Dreiergruppen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Versuchsanordnung ist an der x-Achse angezeigt. Sofern nicht explizit erwähnt, erfolgte die Haltung der Tiere bei 50 % O<sub>2</sub>-Sättigung. esx: entstielte Tiere; d: Tage; SA: Injektion von 10  $\mu$ l Saline; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 10-19 für die ersten vier Versuchsgruppen; n = 3-6 für die übrigen Tiergruppen.



**Abb. 3.21** Entwicklung der CHH-Titer in der Hämolymphe von *Astacus astacus* unter partieller Hypoxie (auf 50 % reduzierter Sauerstoffgehalt des Wassers). In Dreiergruppen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Versuchsanordnung ist an der x-Achse angezeigt. Sofern nicht explizit erwähnt, erfolgte die Haltung der Tiere bei 50 % O<sub>2</sub>-Sättigung. esx: entstielte Tiere; d: Tage; SA: Injektion von 10  $\mu$ l Saline; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 10-19 für die ersten vier Versuchsgruppen; n = 3-6 für die übrigen Tiergruppen.



**Abb. 3.22** Veränderung der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* unter partieller Hypoxie (auf 50 % reduzierter Sauerstoffgehalt des Wassers). In Dreiergruppen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Versuchsanordnung ist an der x-Achse angezeigt. Sofern nicht explizit erwähnt, erfolgte die Haltung der Tiere bei 50 % O<sub>2</sub>-Sättigung. esx: entstielte Tiere; d: Tage; SA: Injektion von 10  $\mu$ l Saline; weiße Säulen: Nullwerte; schraffierte Säulen: 1 h-Werte; schwarze Säulen: 2 h-Werte; n = 10-19 für die ersten vier Versuchsgruppen; n = 3-6 für die übrigen Tiergruppen.

Die Untersuchungen zur Anpassung des Stoffwechsels an moderaten Hypoxiestress (50 % O<sub>2</sub>) weisen auf eine Beteiligung des CHH hin. Die Laktat-Titer intakter Tiere stiegen unter Hypoxie-Bedingungen sehr viel deutlicher als bei Normalsauerstoffbedingungen an. Ebenso erhöhten sich die CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe der Tiere bei Hypoxie im Vergleich zu Normalsauerstoffbedingungen stärker. Dieser Hinweis auf eine Beteiligung des CHH an einer Umweltstress-Anpassung auf physiologischer Ebene wird durch die Beobachtungen bei entstielten Tieren unterstützt. Diese zeigten bei hypoxischen Bedingungen eine vergleichsweise minimale Erhöhung der Laktat-Konzentrationen, und auch die CHH-Titer blieben relativ konstant. Eine Umkehr dieses durch Entfernen der CHH-Quelle erzeugten Effektes war durch die Injektion von CHH zu erzielen. Ein entsprechender Anstieg der CHH-Konzentrationen war in der Hämolymphe zu messen. Die Kontroll-Injektion von Van Harreveld Saline bei entstielten Tieren führte zu wesentlich geringeren Anstiegen der Laktat- und CHH-Titer, d. h. der Effekt der Injektion von CHH bei entstielten Tieren beruht offenbar tatsächlich auf der Wirkung des Hormons und nicht ausschließlich auf Stresseffekten. Vergleicht man die Messwerte der unterschiedlich lange entstielten Tiere, so zeichnete sich in dieser Hinsicht kein direkter Einfluss auf die Effekte ab. Offensichtlich gab es aber entscheidende Unterschiede in der Reaktion der entstielten Tiere auf die Injektion von CHH. So wurden bei einigen Tieren nur verhältnismäßig geringe Anstiege der CHH-Konzentrationen beobachtet, obwohl größere CHH-Mengen injiziert wurden. Auffallenderweise zeigten sich bei einigen dieser Tiere auf Glucose-Ebene dennoch erhebliche Steigerungen, bei anderen Tieren fiel der erwartete Anstieg wesentlich kleiner aus (24 h entstielte Tiere, 50 pmol CHH; vgl. Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Diese Versuchsgruppe wies aber schon zu Beginn des Experimentes stark erhöhte Glucose-Konzentrationen auf. Generell war eine deutliche Parallelentwicklung der CHH- und Glucose-Titer erkennbar, was als Hinweis auf die Funktion des CHH bei der Stoffwechsel-Adaption gewertet werden kann. Interessanterweise waren auch bei bis zu 30 Tagen entstielten Tieren noch gut messbare CHH-Titer vorhanden, was auf eine alternative CHH-Quelle im Organismus hindeutet.

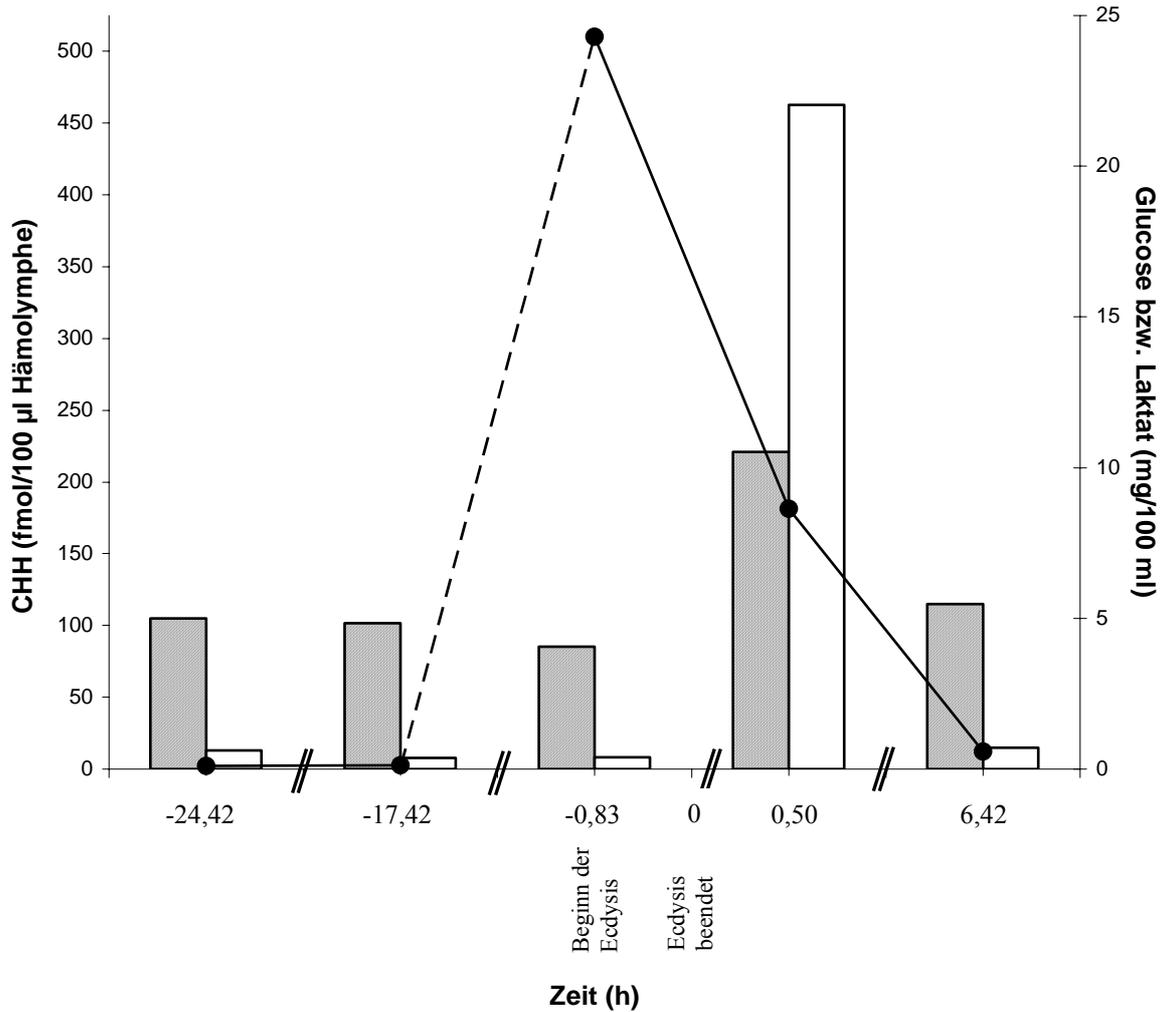
Ergänzend zu den bislang dargestellten Ergebnissen wurden auch noch Kurzzeitexperimente durchgeführt, bei denen die Probenentnahme alle 15 Minuten erfolgte. Mit diesem Versuchsansatz wurde überprüft, ob eine Beteiligung des CHH innerhalb kurzer Zeiträume nach Einsetzen der hypoxischen Bedingungen nachzuweisen ist. Diese wäre in dem vorhergehenden Experiment aufgrund der längeren Zeitintervalle zwischen den Probenentnahmen nicht nachweisbar gewesen. Die Auswertung der Messung führte jedoch zu

ähnlichen Befunden wie den bereits beobachteten. Auffallend war lediglich, dass die Laktat- und CHH-Titer bereits innerhalb der ersten 15 min stark anstiegen und anschließend ganz kontinuierlich zunahmen, während der Glucose-Titer nach 15 min zunächst abgefallen war und anschließend wieder anstieg.

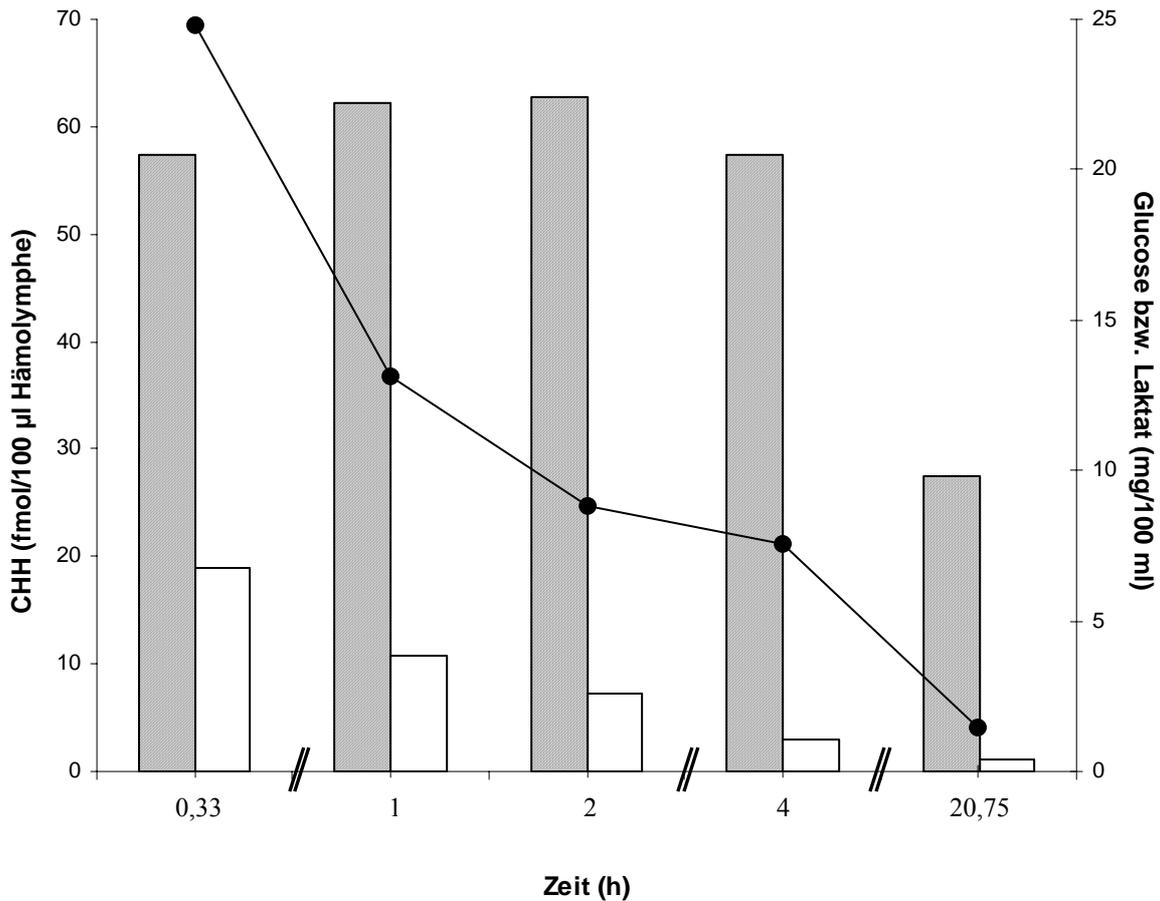
### **3.2.7 Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden, natürlichen Hypoxie während der Ecdysis**

Versuche zu der Rolle von CHH bei der physiologischen Adaption an Hypoxie-Stress sind insofern relevant, als Flusskrebse im natürlichen Habitat hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sein können. Die Tiere können jedoch auch im normoxischen Milieu temporär hypoxisch werden, und zwar während der Häutung. Durch die Häutung sind die Kiemen zeitweise von zwei Kutikulae bedeckt, der neuen und der alten, bis die alte Kutikula abgestreift ist. Da die Sauerstoffaufnahme während der Ecdysis stark reduziert ist, sollte es, ähnlich wie bei Umwelthyypoxie, zu einem Anstieg des Laktats in der Hämolymphe kommen. Durch Messungen von Laktat, CHH und Glucose wurde bei *Astacus astacus* untersucht, ob auch bei dieser Form der Hypoxie das CHH eine Rolle bei der Stoffwechseladaption spielt.

Repräsentativ für die Beobachtungen bei den 10 untersuchten Tieren sind die Entwicklungen der Laktat-, CHH- und Glucose-Konzentrationen zweier Tiere graphisch dargestellt, die beispielhaft die beobachtete Entwicklung der drei physiologischen Parameter von der Vorhäutungsphase bis in die Nachhäutungsphase (Tier 13, Abb. 3.23) bzw. unmittelbar nach Vollendung der Ecdysisphase (T 9, Abb. 3.24) wiedergeben. Die Resultate der übrigen Tiere sahen im Prinzip genauso aus, waren aber aufgrund der erschwerten Planbarkeit der Experimente weniger vollständig. Zur Darstellung der Hämolymphtiter im Laufe des Häutungsprozesses wurden die Zeitpunkte der Probenentnahme relativ zum Ende der Ecdysis (Tier vollständig aus alter Kutikula geschlüpft) berechnet. Diesem wurde dabei der Zeitpunkt 0 zugeordnet.



**Abb. 3.23** Änderung der Laktat-, CHH-, Glucose-Titer in der Hämolymphe von *Astacus astacus* (Tier 13) während der Vorhäutungsphase, der Ecdysis und der Nachhäutungsphase. -●-: CHH-Konzentration; schraffierte Säulen: Glucose; weiße Säulen: Laktat; Beginn und Ende der Ecdysisphase sind gekennzeichnet. Im Zeitraum zwischen 17,42 h und 0,83 h vor der Häutung konnte bei diesem Tier keine Probe entnommen werden. Der genaue Zeitpunkt des CHH-Anstiegs ist hier nicht bekannt, was durch die gestrichelte Linie ausgedrückt wird.



**Abb. 3.24** Entwicklung der Hämolymphtiter von Laktat, CHH und Glucose in der Nachhäutungsphase von *Astacus astacus* (Tier 9). -●-: CHH-Konzentration; schraffierte Säulen: Glucose; weiße Säulen: Laktat.

Die Laktat-Titer der Häutungstiere zeigten nur im Zeitraum von der späten Ecdysisphase bis maximal eine halbe Stunde nach Vollendung der Ecdysis eine Erhöhung um den Faktor 45-50 auf Werte zwischen 15,8 und 22 mg/100 ml. Diese Erhöhung wurde aber sehr schnell, meist innerhalb von 2 h, wieder abgebaut und näherte sich kontinuierlich den Grundwerten zwischen 0,3 und 0,5 mg/100 ml. Verglichen mit den Entwicklungen der Laktat-Titer nach Haltung der Tiere bei extremer bzw. partieller Hypoxie (Abb. 3.17 bzw. Abb. 3.20) tritt im Laufe der Ecdysis offensichtlich eine kurzfristige, starke physiologische Hypoxie ein. Die CHH-Messungen zeigten eine eindeutige Korrelation des CHH-Titer-Anstiegs in der Hämolymphe mit der Ecdysisphase. Jeweils kurz vor bzw. mit Beginn der Ecdysis war bei allen Tieren ein dramatischer Anstieg der CHH-Titer, im Maximum um den Faktor 184 (Tier, 13, Abb. 3.23) im Vergleich zur vorherigen Probe noch während des D<sub>4</sub>-Stadiums, messbar. Wurden während des D<sub>4</sub>-Stadiums Konzentrationen zwischen 1,7 und 4,5 fmol/100 µl gemessen, so erfolgte ein dramatischer Anstieg auf Werte zwischen 460 und 510 fmol/100 µl.

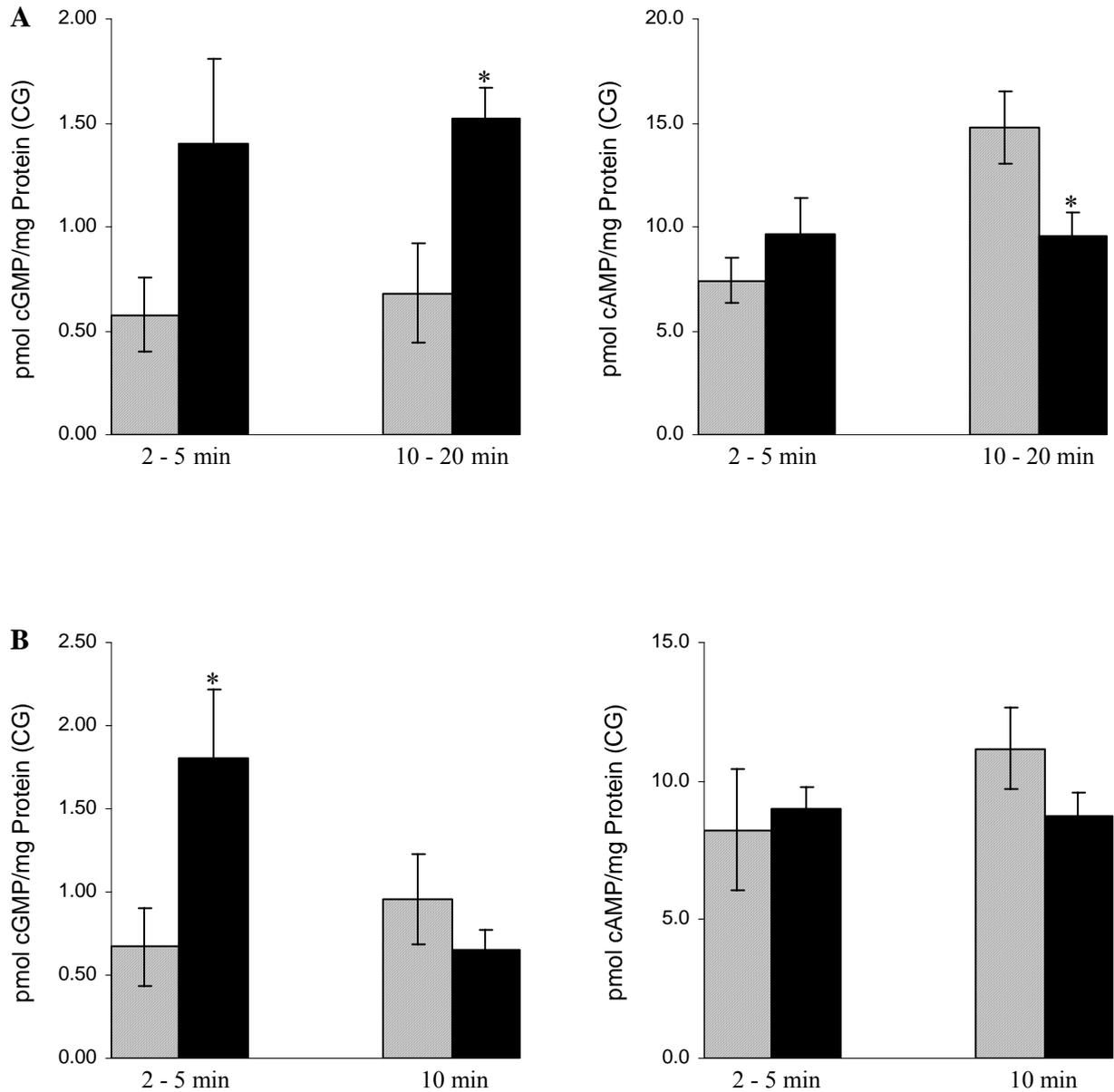
Die Dauer des Schlüpfens aus der alten Kutikula zog sich dann im Allgemeinen über einen Zeitraum von ca. 0,5-1 h hin. Über den genauen Beginn des CHH-Signals können leider keine detaillierten Aussagen gemacht werden, da für den unmittelbaren Zeitpunkt vor Beginn der Ecdysis, bedingt durch die individuellen Schwankungen des zeitlichen Häutungsablaufs und die Unmöglichkeit, definierte Stadien genau vorauszusagen, keine Hämolympfproben vorlagen. Die Ergebnisse der CHH-Messungen belegen jedoch eindeutig, dass die CHH-Titer zu Beginn der Ecdysisphase bereits stark erhöht waren. Vermutlich stellt der gemessene Anstieg der CHH-Konzentrationen zu Beginn der Ecdysisphase das Maximum der Entwicklung dar, denn bereits eine halbe Stunde bis Stunde nach Vollendung der Ecdysis waren die Titer wieder deutlich gesunken und bewegten sich im Laufe der nächsten Stunden langsam auf ein Grundniveau hin. Dieses war in der Regel nach spätestens 20 h erreicht. Bei Betrachtung der Glucose-Konzentrationen fielen keine erheblichen Steigerungen auf. Im Allgemeinen zeigte sich eine Erhöhung der Glucose-Titer etwa 30 min nach Vollendung der Ecdysis, die sich jedoch im Laufe der folgenden Stunden, ähnlich wie die CHH-Titer, wieder abbaute. Allerdings war die Steigerung der Hämolympf-Glucose-Titer wesentlich geringer als aufgrund der sehr hohen CHH-Titer (und unter Berücksichtigung der Dosis-Wirkungsbeziehung, Abb. 3.8, S. 52) zu erwarten war. Dies weist deutlich auf eine andere Funktion des CHH bei der Häutung hin.

### **3.3 Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskreb *Orconectes limosus*: Beteiligung zyklischer Nukleotide**

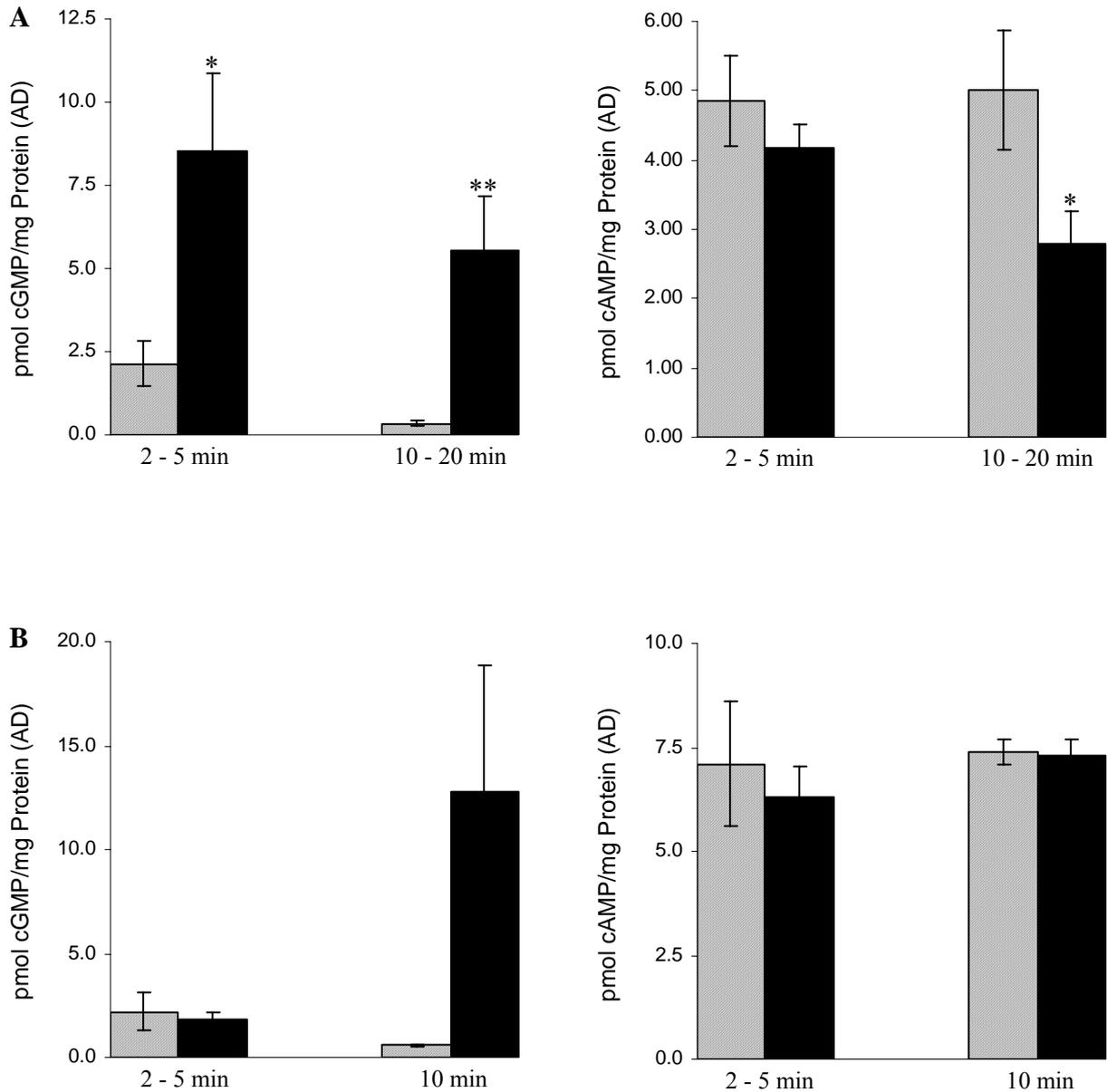
Durch die folgenden Experimente sollten möglichst viele Organe untersucht werden, um Zielgewebe des CHH zu identifizieren. Dabei sollten genau quantifizierte Hormonmengen *in vivo* in nicht allzu unphysiologischen Dosen eingesetzt werden. Es wurden Gehirn, Antennendrüse, Kiemen, Hepatopankreas (Mitteldarmdrüse), Herz, Schwanzmuskel und Abdominalganglien untersucht. Im Vergleich zu bisherigen Versuchen wurden die Effekte der Isoformen des CHH vergleichend untersucht. Die Untersuchungen an den Y-Organen wurden in separaten *in vitro* Inkubationen durchgeführt, da ihre Präparation, im Vergleich zu den übrigen Organen, einen zu großen Zeitaufwand erfordert hätte und die Messzeitpunkte nach der Injektion unverhältnismäßig lang geworden wären. Die schnelle, nahezu zeitgleiche Präparation aller Organe war aber von besonderer Bedeutung.

#### **3.3.1 Injektion über die Gelenkmembranen der Scheren**

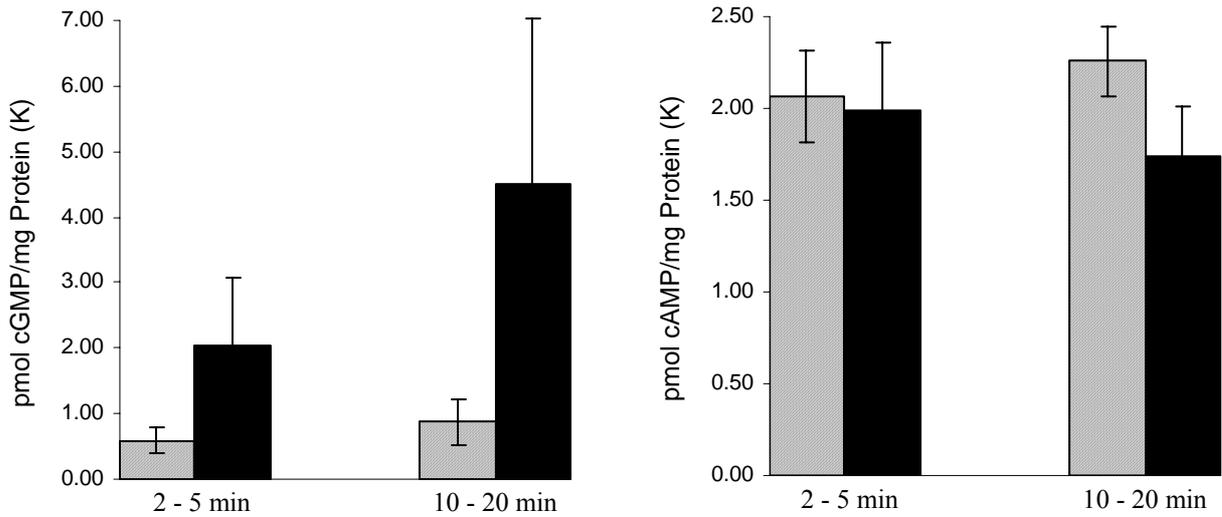
In den folgenden Abbildungen sind die Messungen der cGMP- bzw. cAMP-Gehalte nach Injektion der CHH-Hauptform (5-50 pmol L-Phe<sup>3</sup>-Isoform) und der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform (10 pmol) dargestellt. Kontrolltiere erhielten Saline-Injektionen. Die Darstellung erfolgt im direkten Vergleich für jedes untersuchte Gewebe. Aufgrund der erheblichen Streuung der Messwerte war es sehr schwer, statistisch klar signifikante Effekte nachzuweisen. Diese enorme Variabilität war auch der Grund dafür, dass nur 2 Zeiträume (2-5 min und 10-20 min) gewählt wurden. Die Ermittlung exakter Zeitverläufe wäre nur mit unvertretbarem Aufwand möglich gewesen. Da auch im Dosisbereich von 5-50 pmol keine signifikante Dosisabhängigkeit zu beobachten war, wurden die Werte zusammengefasst.



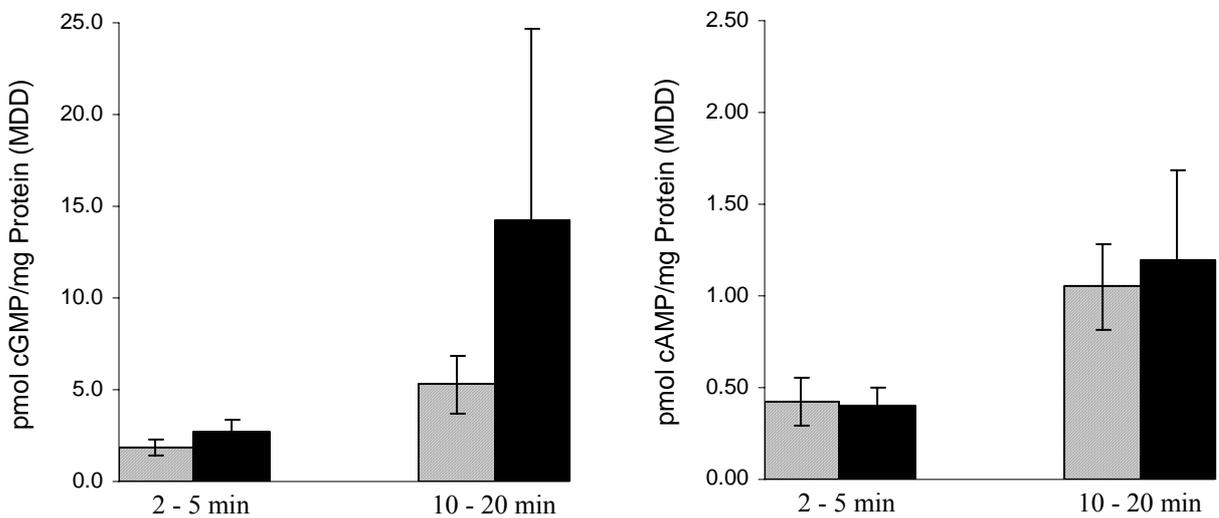
**Abb. 3.25** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) im Gehirn (CG) nach Injektion von CHH. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 4-12$ . A: L-Isoform (5-50 pmol); B: D-Isoform (10 pmol); schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; \* signifikant verschieden vom Kontrollwert (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$ ); Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind angezeigt.



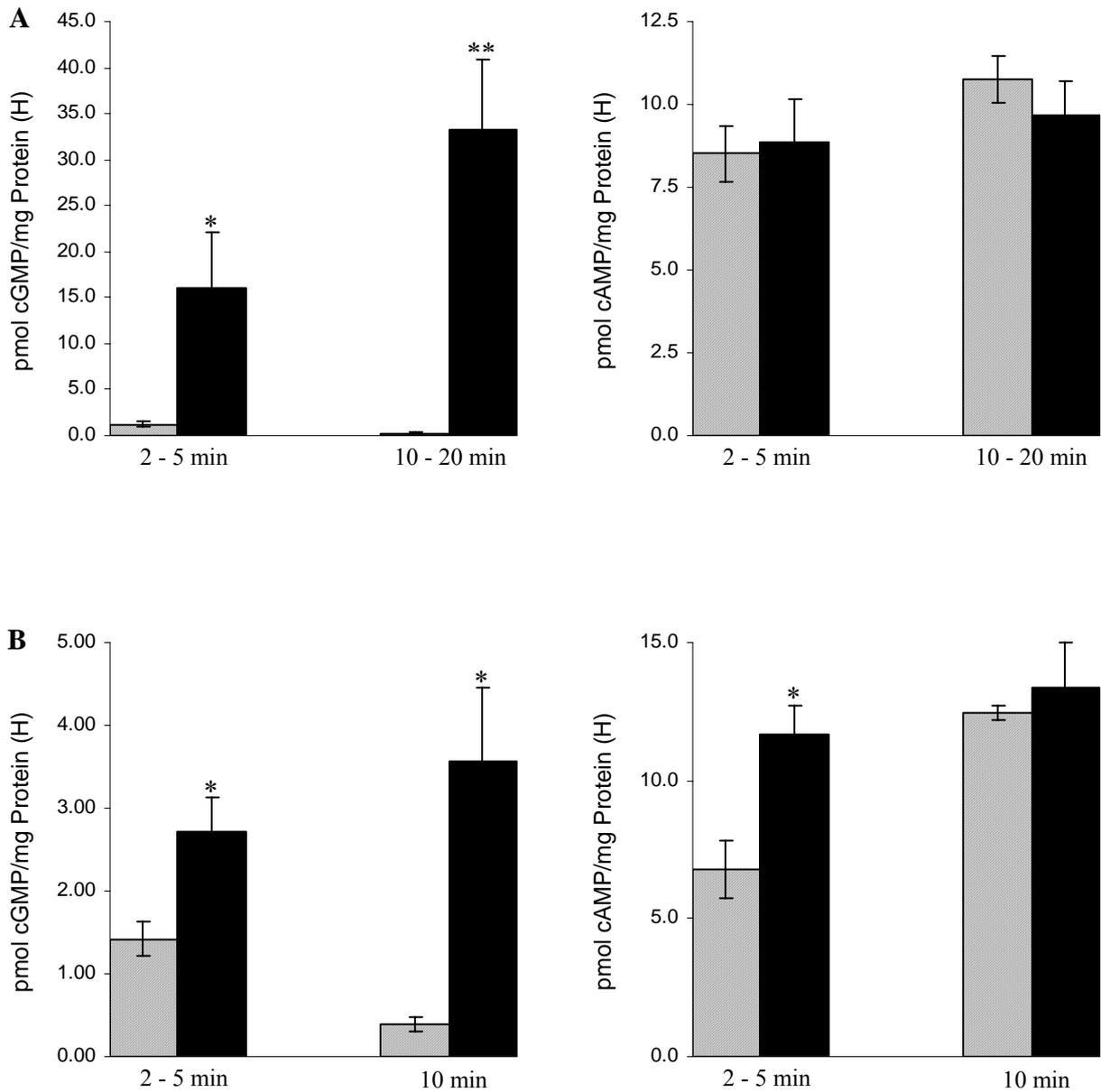
**Abb. 3.26** cGMP- (rechts) bzw. cAMP-Gehalte (links) in der Antennendrüse (AD) nach Injektion von CHH. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 4-14$ . Die Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind an der x-Achse angegeben. A: L-Isoform (5-50 pmol); B: D-Isoform (10 pmol); schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; \*/\*\* signifikant im Vergleich zum Kontrollwert (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ).



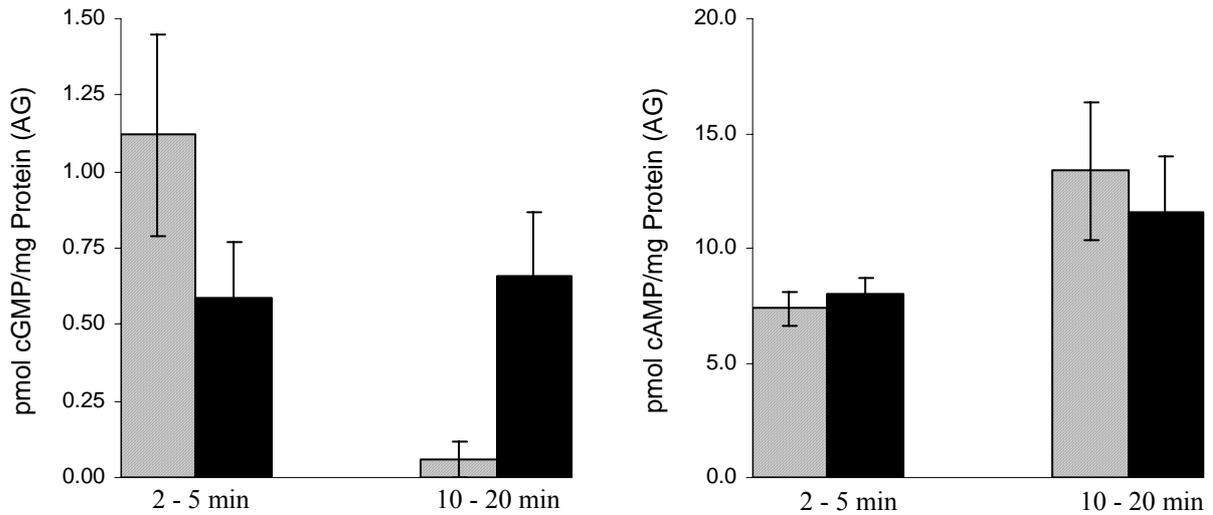
**Abb. 3.27** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) in den Kiemen (K) nach Injektion von 5-50 pmol der L-Phe<sup>3</sup>-Isoform von CHH. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM und die Zeitpunkte der Messung nach Injektion; n = 5-7.



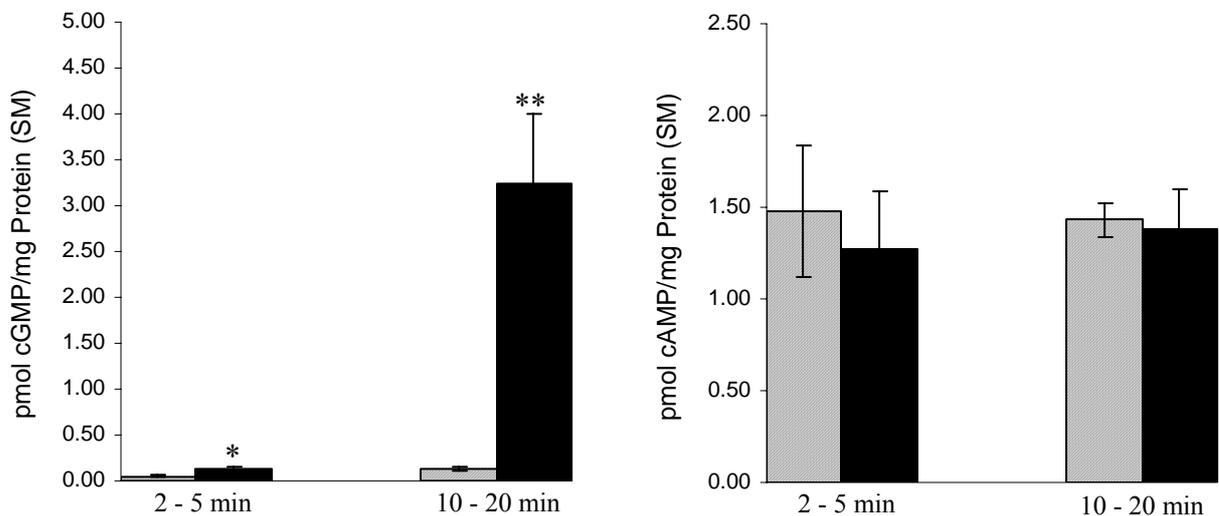
**Abb. 3.28** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) in der Mitteldarmdrüse (MDD) nach Injektion von 5-50 pmol CHH (L-Phe<sup>3</sup>-Isoform). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind an der x-Achse angezeigt. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; n = 5-7.



**Abb. 3.29** cGMP- (links) und cAMP-Gehalte (rechts) in Herzgewebe (H) nach Injektion von CHH. Mittelwerte  $\pm$  SEM und Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind angegeben,  $n = 5-19$ . A: L-Isoform (5-50 pmol); B: D-Isoform (10 pmol); schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; \*/\*\* signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ).



**Abb. 3.30** cGMP- (links) und cAMP-Gehalte (rechts) in den Abdominalganglien (AG) nach Injektion von 5-50 pmol der L-Phe<sup>3</sup>-Isoform von CHH. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind unter den Säulen angezeigt. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; n = 5-13.



**Abb. 3.31** cGMP- (links) und cAMP-Gehalte (rechts) im Schwanzmuskel (SM) nach CHH-Injektion (5-50 pmol der L-Isoform). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind angegeben. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; \*/\*\* signifikant im Vergleich zum Kontrollwert (Students *t*-Test,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ); n = 5-12.

Die Analyse der Nukleotid-Gehalte zeigte bei allen untersuchten Geweben deutliche Anstiege des cGMP, wohingegen hinsichtlich der cAMP-Gehalte ein signifikanter Einfluss des Hormons kaum nachzuweisen war; in manchen Fällen war eher ein Abfall zu messen. Lediglich bei Gehirn und Abdominalganglien sowie im Herzen zeigten sich Steigerungen der cAMP-Gehalte nach CHH-Injektion, die jedoch nur beim Herzen signifikant im Vergleich zu den Kontrollwerten waren und in der Regel auch nur 2-5 min nach Injektion messbar waren. Offensichtlich spielte es dabei auch keine Rolle, welche der CHH-Isoformen injiziert wurde. Durch signifikante Steigerungen der cGMP-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen fielen Gehirn, Antennendrüse, Herz und Schwanzmuskel auf. Bei den Kiemen, der Mitteldarmdrüse und den Abdominalganglien zeigten sich zwar klare Anstiege, die jedoch aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte nicht signifikant waren, womit diese Gewebe aber als Zielorgane nicht auszuschließen sind.

Bei den Gehirnen (vgl. Abb. 3.25) deuteten sich Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs des Effektes an. So stieg der cGMP-Gehalt nach Injektion der L-Isoform schon nach 2-5 min deutlich an, war aber erst nach 10-20 min signifikant, wohingegen bei der D-Isoform signifikante Erhöhungen bereits nach 2-5 min zu beobachten waren, während danach die Werte wieder abfielen.

Bei der Antennendrüse (vgl. Abb. 3.26) erzeugte die Injektion der L-Isoform bereits nach 2-5 min signifikante Anstiege der cGMP-Gehalte, die auch nach 10-20 min noch deutlich nachweisbar waren. Die Injektion der D-Isoform machte sich überhaupt erst zum späteren Zeitpunkt zwischen 10 und 20 min bemerkbar.

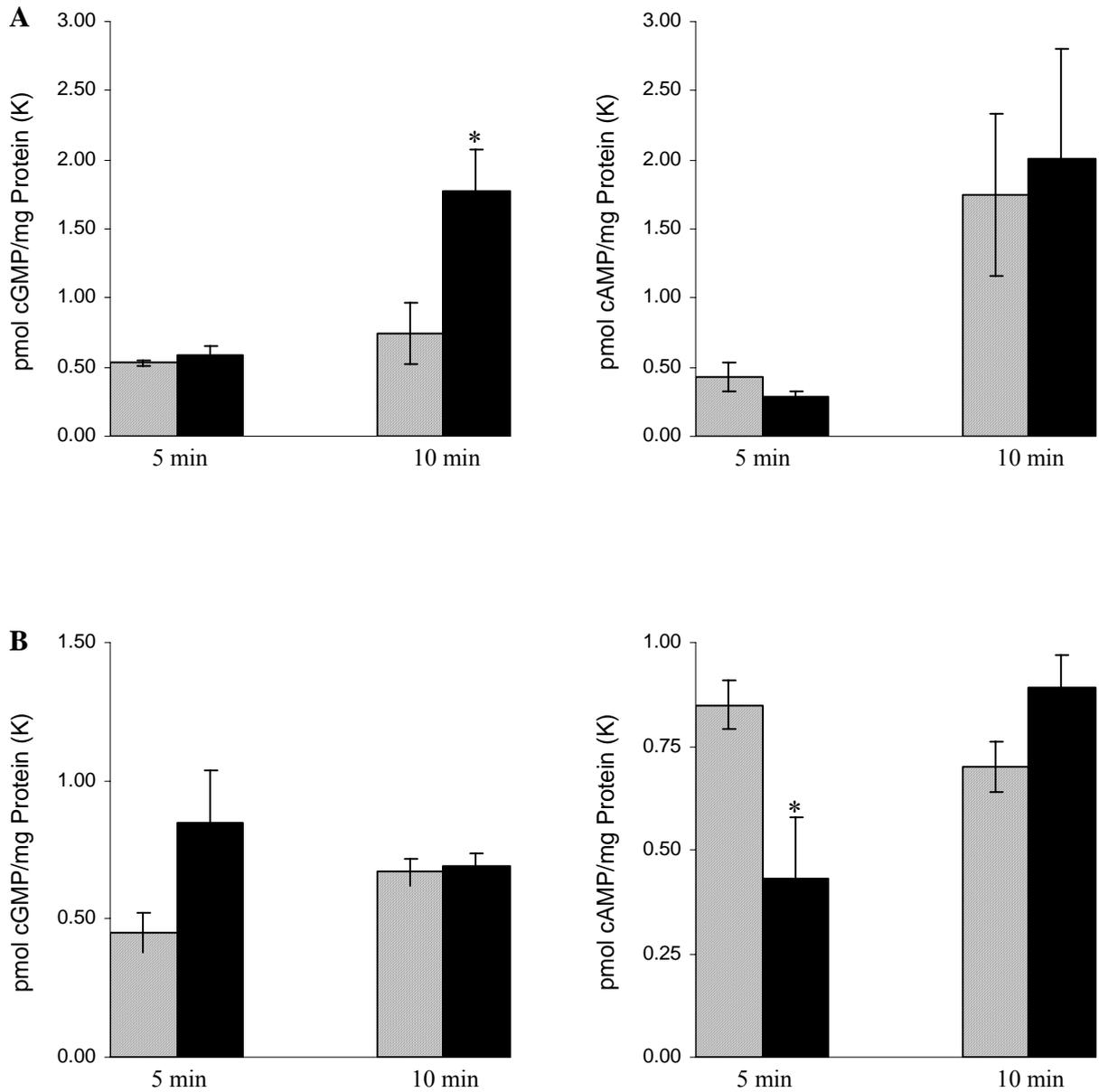
Die Effekte auf cGMP-Ebene für das Schwanzmuskelgewebe (vgl. Abb. 3.31) näherten sich offensichtlich erst nach einem Zeitraum von 10-20 min dem Maximum, obwohl auch nach 2-5 min schon signifikante Unterschiede bestanden.

Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit der CHH-Isoformen waren beim Herzen zu beobachten (vgl. Abb. 3.29). Diese lagen weniger im Zeitverlauf als in der Höhe des cGMP-Anstiegs. Hierbei war die L-Isoform weitaus wirksamer. Zeigten sich bei Injektion der D-Isoform im Maximum Anstiege um den Faktor 8, so lagen sie bei der L-Isoform um den Faktor 30.

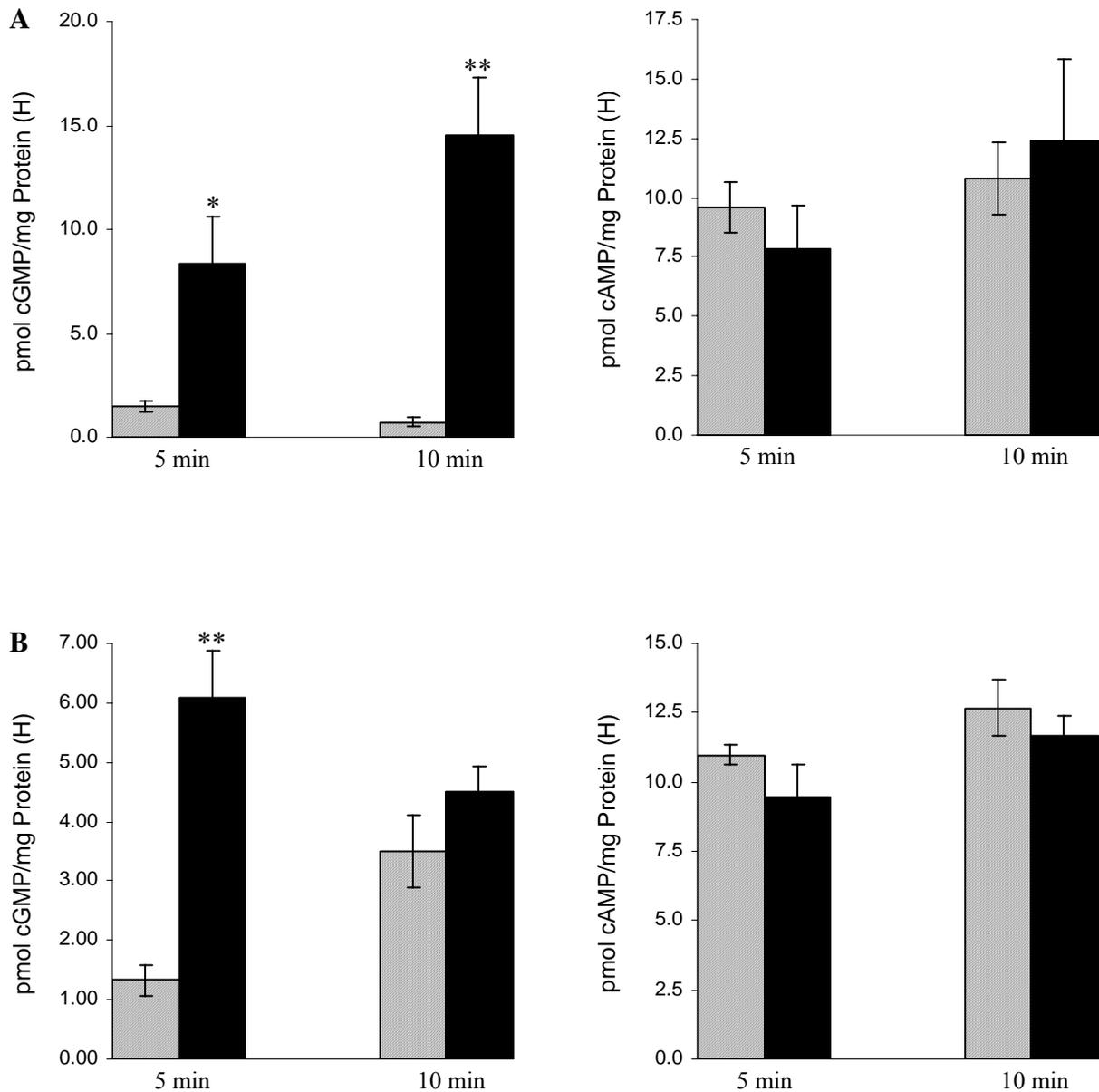
### 3.3.2 Injektion ins Perikard

Es sollte überprüft werden, ob der Injektionsort und damit die Verteilung des injizierten Hormons im Organismus einen Einfluss auf die Entwicklung der Effekte auf Ebene der zyklischen Nukleotide hat. Es erschien denkbar, dass bei der peripheren Injektion durch die Gelenkmembranen der Scheren und unter der Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit des CHH in der Zirkulation nicht alle Gewebe gleichmäßig von dem Hormon erreicht werden. Hierzu konnte das Herzgewebe, das immer zuverlässig einen cGMP-Anstieg zeigte, als Kontrollorgan eingesetzt werden. Nachfolgend sind die Messungen der cGMP- bzw. cAMP-Gehalte nach Injektion von 50 pmol der CHH-Hauptform (L-Phe<sup>3</sup>-Isoform) und der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform ins Perikard dargestellt. Diese Untersuchung war im Hinblick auf die Gewebe von besonderem Interesse, bei denen sich zuvor bereits Anstiege auf cGMP-Ebene nachweisen ließen, die jedoch noch nicht signifikant waren (Kiemen, Abdominalganglien). Am Kiemengewebe und am Schwanzmuskulgewebe wurden die Effekte der CHH-Isoformen vergleichend analysiert. Eine weitere Untersuchung der Mitteldarmdrüse wurde ausgelassen, da sich aufgrund des hohen Fettgehaltes Schwierigkeiten bei der Extraktion und der zuverlässigen Messung insbesondere im cGMP-Assay ergaben. Die Kontrolltiere erhielten Van Harreveld Saline. Es wurden die Zeitpunkte 5 und 10 min untersucht.

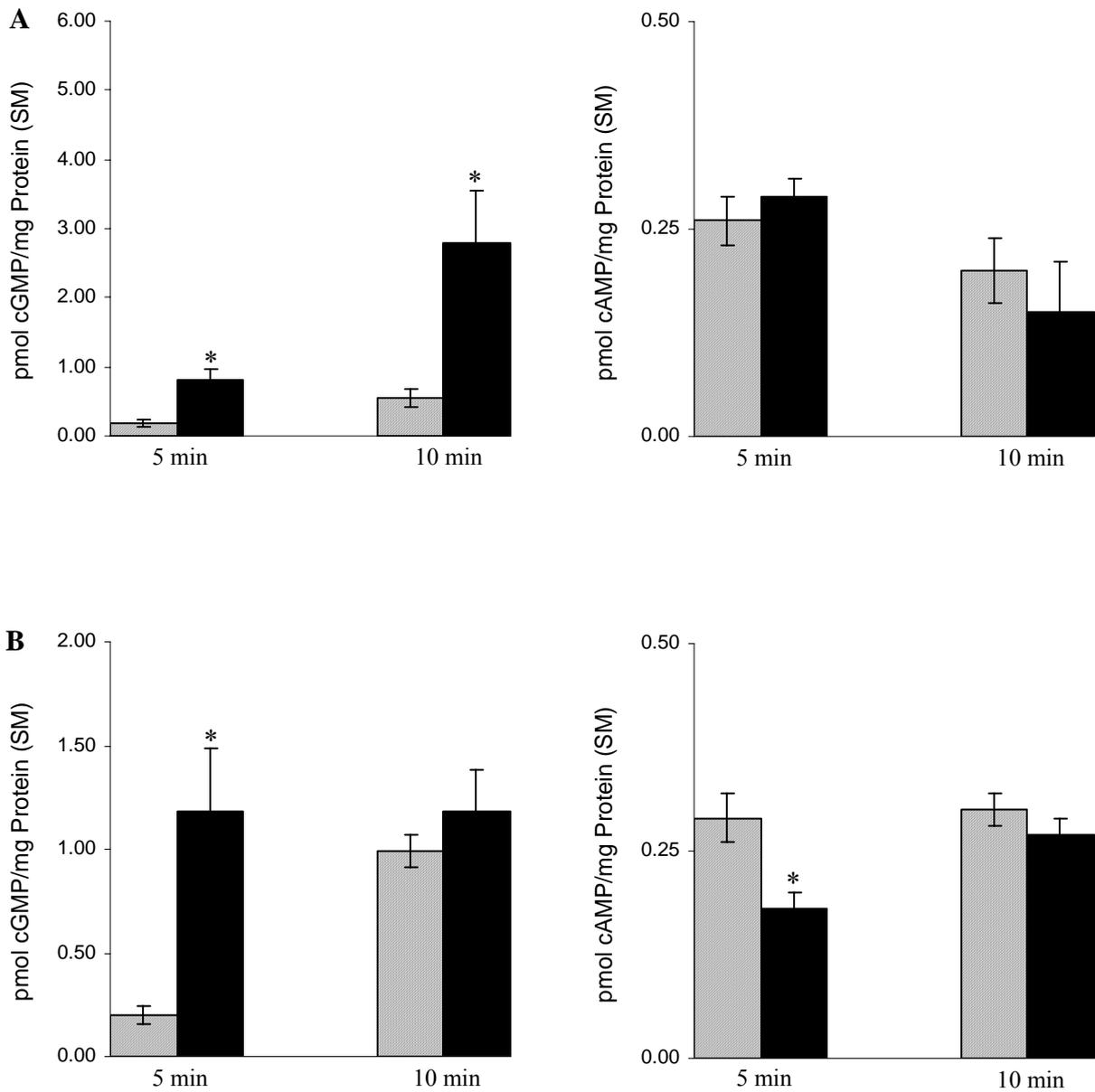
Für die Abdominalganglien ergab sich ein ähnliches Bild wie bereits im Experiment zuvor. Es war zwar ein Anstieg auf cGMP-Ebene zu verzeichnen, der jedoch abermals statistisch nicht signifikant war. Offensichtlich waren die individuellen Schwankungen zu groß. Von einer Darstellung der Ergebnisse wurde daher abgesehen.



**Abb. 3.32** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) in den Kiemen 5 bzw. 10 min nach Injektion von 50 pmol CHH. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5-13. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; A: L-Isoform; B: D-Isoform; \* signifikant verschieden zu Kontrolle (Students *t*-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.33** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) im Herz nach Injektion von 50 pmol CHH. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ . Die Zeitpunkte der Messung nach Injektion sind angezeigt. Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; A: L-Isoform; B: D-Isoform; \*/\*\* signifikant verschieden zu Kontrolle (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ).



**Abb. 3.34** cGMP- (links) bzw. cAMP-Gehalte (rechts) im Schwanzmuskel 5 bzw. 10 min nach Injektion von 50 pmol CHH. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ . Schraffierte Säulen: Saline-Injektion; schwarze Säulen: CHH-Injektion; A: L-Isoform; B: D-Isoform; \* signifikant verschieden von Kontrolle (Students  $t$ -Test,  $p < 0,05$ ).

Auf cAMP-Ebene war auch bei den Perikard-Injektionen kein signifikanter Effekt der CHH-Isoformen beim Herzgewebe (Abb. 3.33) zu erkennen. Injektion der L-Phe<sup>3</sup>-Isoform des CHH ergab am Herzen ähnliche Ergebnisse wie bei der Injektion über die Gelenkmembranen der Scheren. Sowohl nach 2-5 min als auch nach 10-20 min trat ein signifikanter Anstieg der cGMP-Gehalte auf. Die Injektion der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform zeigte eine leichte Verschiebung des

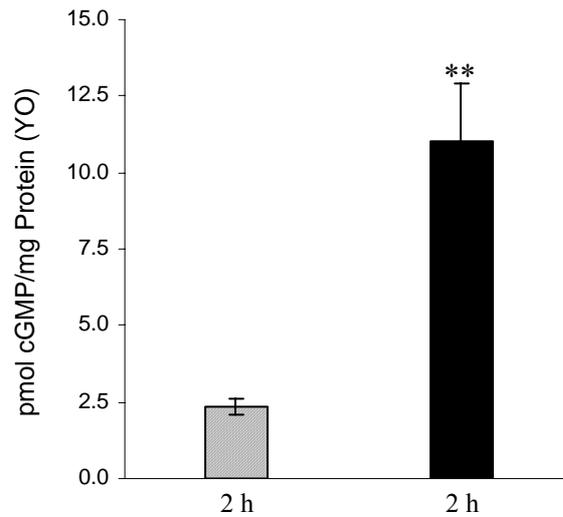
deutlichsten Effektes zum kürzeren Versuchszeitraum von 2-5 min. Bei der Injektionsmethode ins Perikard war festzustellen, dass die L-Isoform auch hier eine höhere Wirksamkeit zeigte, denn der Anstieg der cGMP-Gehalte war bei identischer Injektionsmenge deutlich stärker. Als Ergebnis dieses Experimentes bleibt festzuhalten, dass keine wesentliche Abhängigkeit vom Injektionsort festzustellen war.

Die Analysen der Kiemengewebe (Abb. 3.32) bestätigten dessen Funktion als Zielorgan von CHH. Für die L-Phe<sup>3</sup>-Isoform zeigte sich der stärkste, nun auch signifikante Effekt eindeutig nach 10 min, ähnlich wie bereits zuvor beim Schwanzmuskel und den Abdominalganglien beobachtet wurde. Die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform zeigte eine Tendenz des maximalen Effektes zum kurzen Versuchszeitraum von 5 min. Die Entwicklung der cAMP-Gehalte war auch bei dem Kiemengewebe sehr unklar. In einigen Fällen wurde sogar eine Erniedrigung des cAMP gemessen, in anderen Fällen waren andererseits signifikante Anstiege zu verzeichnen, die sogar leicht überwogen.

Für den Schwanzmuskel waren die cAMP-Effekte ebenfalls unklar. In der Mehrheit der untersuchten Gewebe sanken die cAMP-Gehalte ab, so dass auch hier eher das cGMP als second messenger bei der Vermittlung der Hormonwirkung eine Rolle zu spielen scheint. Die Beobachtungen nach Injektion von L-Phe<sup>3</sup>-CHH wurden mit der Perikard-Injektion eindeutig bestätigt. Für die isomere CHH-Form ergab sich ein Effekt schon nach 5 min, der auch nach 10 min noch nachweisbar, aber im Vergleich zu den Kontrollwerten schon wesentlich abgeschwächt war.

### 3.3.3 *in vitro* Inkubation von Y-Organen

In der folgenden Abbildung sind die cGMP-Gehalte der Y-Organen nach zweistündiger *in vitro* Inkubation mit 50 nM L-Phe<sup>3</sup>-CHH dargestellt. Bei den Kontrollorganen wurde dem Kulturmedium Van Harreveld Saline zugefügt. Aufgrund der geringen Gewebemenge pro Y-Organ und der Hinweise auf eine Vermittlung der CHH-Wirkung durch cGMP bei den übrigen Organen wurden nur die cGMP-Gehalte der ganzen Y-Organen gemessen.



**Abb. 3.35** cGMP-Gehalte im Y-Organ von *Orconectes limosus* nach zweistündiger *in vitro* Inkubation mit 50 nM CHH (L-Phe<sup>3</sup>-Isoform). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5. Schraffierte Säule: Kontrollen; schwarze Säule: 50 nM CHH; \*\* signifikant verschieden von Kontrolle (Students *t*-Test,  $p < 0,005$ ).

Wie Abb. 3.35 zeigt, führte die Inkubation der Y-Organe mit CHH zu einer deutlichen Steigerung der cGMP-Gehalte. Im Vergleich zu den Kontrollorganen wurde cGMP um den Faktor 4-5 hochsignifikant erhöht. Damit wurde das Y-Organ als weiteres Zielorgan des CHH identifiziert, bei dem die CHH-Wirkung wahrscheinlich über cGMP als second messenger vermittelt wird.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung des hyperglykämischen Hormons (CHH) von *Astacus astacus*

Das CHH aus den Sinusdrüsen des europäischen Flusskrebse *Astacus astacus* wurde als ein Peptid mit 72 Aminosäuren, einer C-terminalen Amidierung und einem durch eine Pyroglutamylgruppe geschützten N-Terminus identifiziert. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften und der Aminosäuresequenz kann das Peptidhormon eindeutig der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie zugeordnet werden (Lacombe et al., 1999; Böcking et al., 2002), die damit um die Sequenz einer europäischen Art der Familie der Astacidae erweitert wurde. Des Weiteren konnte eine posttranslationale Isomerisierung des Phenylalaninrestes an Position 3 des Peptides nachgewiesen werden. Neben dem L-Phe<sup>3</sup>-CHH wurde somit eine zusätzliche CHH-Isoform (D-Phe<sup>3</sup>-CHH) identifiziert. Damit gliedert sich der Edelkrebs *Astacus astacus* in die Reihe der bereits untersuchten Arten der Infraordnung Astacidea ein, bei denen ebenfalls zwei CHH-Isoformen identifiziert wurden [*Orconectes limosus* (Kegel et al., 1991; Soyez et al., 1998), *Procambarus bowieri* (Huberman et al., 1993; Aguilar et al., 1995) und *Procambarus clarkii* (Yasuda et al., 1994)]. Die Aminosäuresequenz des CHHs der nah verwandten Art *Astacus leptodactylus* wurde bislang noch nicht aufgeklärt, jedoch gibt es aufgrund von ELISA-Daten von Fraktionen aus Sinusdrüsenextrakten auch hier Hinweise auf die Existenz von D- und L-Isoformen (Serrano et al., 2003). Bei dem australischen Flusskrebs *Cherax destructor*, einem Vertreter der Familie der Parastacidae, wurden im Gegensatz dazu zwei genetische CHH-Varianten nachgewiesen, die zudem jeweils in der chiralen Isoform existieren (Bulau et al., 2003). Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Hummer *Homarus americanus* (Soyez et al., 1994).

Die folgende Abbildung gibt die Sequenzen der bislang charakterisierten CHHs der CHH/MIH/GIH(VIH)-Peptidfamilie innerhalb der Infraordnung Astacidea wieder. Diese umfasst die Hummer (Nephropidae), die europäischen Flusskrebse (Astacidae), die amerikanischen Flusskrebse (Cambaridae), die australischen Flusskrebse (Parastacidae) und die Thaumastochelidae. Zudem sind in der folgenden Tabelle die prozentualen Übereinstimmungen der Aminosäurereste der einzelnen Peptide angegeben.

Prb-CHH : Pyr-**EVFDQACKGIYDRAIFKKLDRVCE**DCYNLYRKP**YVATTCRQ**NCYANS**VFRQCLDDLLLIDVVDEYISGVQTV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Prc-CHH : Pyr-**EVFDQACKGIYDRAIFKKLDRVCE**DCYNLYRKP**YVATTCRQ**NCYANS**VFRQCLDDLLLIDVVDEYISGVQTV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Orl-CHH : Pyr-**EVFDQACKGIYDRAIFKKLDRVCE**DCYNLYRKP**YVATTCRQ**NCYANS**VFRQCLDDLLLIDVLD**DEYISGVQTV-NH<sub>2</sub> : 72  
 Asa-CHH : Pyr-**EVFDQACKGIYDRAIFKKLDRVCD**DCYNLYRKP**YVATTCRQ**NCYANS**VFRQCLDDLLLIDVVDEYISGVQIV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Chd-CHH A: Pyr-**EVFDQACKGVYDRAIFKKLDRVCD**DCYNLYRKP**YVAVSCR**GN**CYN**NLVFRQ**CLEELFLG**NGFN**EYISGVQTV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Chd-CHH B: Pyr-**EVFDQACKGVYDRALFKKIDRVCD**DCYNLYRKP**YVATSCR**QNCY**SNL**VFRQ**CLDDLLLVDV**VDEY**VSGVQIV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Hoa-CHH A: Pyr-**EVFDQACKGVYDRNLFKKLDRVCE**DCYNLYRKP**FVATTCRE**NCY**SNW**VFRQ**CLDDLLS**DV**IDEYVSNVQMV**-NH<sub>2</sub> : 72  
 Hoa-CHH B: Pyr-**EVFDQACKGVYDRNLFKKLN**RVCE**DCYNLYRKPFI**V**TTCRE**NCY**SNR**VFRQ**CLDDLLS**DV**IDEYVSNVQMV**-NH<sub>2</sub> : 72

**Abb. 4.1** Sequenzvergleich der bekannten hyperglykämischen Hormone der CHH-Subfamilie innerhalb der Astacidea. Sequenzhomologien sind durch unterschiedliche Farbgebung gekennzeichnet. Rot: zu 100 % konservierte Aminosäurereste (AS); grün: Konserviertheitsgrad > 75 %; blau 50-75 % Sequenzhomologie; schwarz: ≤ 50 % Sequenzhomologie; Prb: *Procambarus bouvieri*; Prc: *Procambarus clarkii*; Orl: *Orconectes limosus*; Asa: *Astacus astacus*; Chd: *Cherax destructor*; Hoa: *Homarus americanus*.

	Prb CHH	Prc CHH	Orl CHH	Asa CHH	Chd CHHA	Chd CHHB	Hoa CHHA	Hoa CHHB
Prb CHH	100	100	99	97	79	86	83	79
Prc CHH		100	99	97	79	86	83	79
Orl CHH			100	96	79	85	83	79
Asa CHH				100	79	89	82	78
Chd CHHA					100	79	72	68
Chd CHHB						100	85	80
Hoa CHHA							100	94
Hoa CHHB								100

**Tab. 4.1** Homologievergleich der CHH-Sequenzen der Astacidea. Angegeben ist die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäurereste. Prb: *Procambarus bouvieri*; Prc: *Procambarus clarkii*; Orl: *Orconectes limosus*; Asa: *Astacus astacus*; Chd: *Cherax destructor*; Hoa: *Homarus americanus*

Der Sequenzvergleich in Abb. 4.1 lässt drei vollkommen konservierte Abschnitte (AS 1-9, AS 25-33, AS 48-53) erkennen. Dabei stellt die Konservierung des N-terminalen Sequenzbereiches AS 1-9 ein besonderes Merkmal innerhalb der Infraordnung der Astacidea dar. Bei den übrigen Mitgliedern der CHH-Subfamilie treten in diesem Bereich deutlich größere Strukturänderungen auf (Lacombe et al., 1999). Auffallend ist die sehr hohe Sequenzidentität der CHHs innerhalb der Familien der Astacidae und der Cambaridae, die für das CHH von *Astacus astacus* bei 97 % mit den beiden *Procambarus*-CHHs und bei 96 % mit *Orconectes limosus*-CHH liegt. Offensichtlich sind die Sequenzen der Flusskrebse der nördlichen Hemisphäre sehr stark konserviert. Im Vergleich dazu zeigt der Vergleich mit den beiden *Cherax destructor* CHHs ein deutlich höheres Ausmaß an Aminosäureaustauschen. Hier liegt die Sequenzhomologie nur noch bei 79 % (CHH A) bzw. 89 % (CHH B). Im Vergleich zu den *Homarus americanus*-Peptiden liegt die Sequenzidentität bei 82 % (CHH A) bzw. 78 % (CHH B). Auffallend ist die vergleichsweise hohe Übereinstimmung (89 %) des CHH B von *Cherax destructor* mit dem *Astacus astacus*-CHH, die sich im Bereich AS 60-64 besonders bemerkbar macht.

Der Mechanismus der posttranslationalen Isomerisierung des L-Phe<sup>3</sup>-Restes zu D-Phe<sup>3</sup> wurde von Soyez et al. (1998; 2000) und Ollivaux und Soyez (2000) studiert. Der Prozess ist offenbar präzise gesteuert, da nur eine Minderheit der spezialisierten CHH-synthetisierenden Zellen des X-Organs die D-Phe<sup>3</sup>-Form produziert und beide Isoformen somit in einem konstanten Verhältnis zueinander gebildet werden. Dieses Phänomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit für das CHH von *Astacus astacus* gezeigt werden. Die beiden CHH-Isoformen wurden jeweils in einem definierten Verhältnis zueinander aus den Sinusdrüsen

isoliert. Die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform machte dabei nur einen Anteil von etwa 30-35 % der Gesamtmenge an L-Phe<sup>3</sup>-CHH aus (vgl. Abb. 3.2). Hinsichtlich der biologischen Bedeutung der Isomerisierung des Phenylalaninrestes ergaben sich bereits einige Hinweise, die auf eine unterschiedliche Aktivität der CHH-Isoformen hindeuten. Für das D-Phe<sup>3</sup>-CHH ergab sich eine deutlich erhöhte hyperglykämische Wirksamkeit bei *Homarus americanus* und *Orconectes limosus* (Soyez et al., 1994; Keller et al., 1999). Bei *Astacus leptodactylus* wurde neben einer stärkeren hyperglykämischen Aktivität der mittels ELISA identifizierten D-Phe<sup>3</sup>-Isoform auch ein stärkerer Effekt auf osmoregulatorische Prozesse beobachtet (Serrano et al., 2003). Auch beim Hummer *Homarus americanus* wies diese Isoform eine höhere osmoregulatorische Wirksamkeit auf (Charmantier-Daures et al., 1994). Die Tatsache, dass das Vorliegen einer D-Aminosäure im N-terminalen Peptidabschnitt die Resistenz des Peptides gegenüber proteolytischen Enzymen *in vivo* erhöhen könnte (Kreil, 1997), wurde als mögliche Ursache für die erhöhte Wirksamkeit der D-Isoform in Betracht gezogen. In weiteren Studien zeigte die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform jedoch auch eine höhere Aktivität bei der Hemmung der Ecdysteroisynthese und -sekretion durch die Y-Organen *in vitro* (Yasuda et al., 1994; Keller et al., 1999), so dass diese Hypothese in Frage gestellt werden muss.

Hinsichtlich der zweiten posttranslationalen Modifikation des CHH, der N-terminalen Blockierung durch eine Pyroglutamyl-Gruppe gab es bei *Carcinus maenas* und *Cancer pagurus* interessante Beobachtungen. So konnte neben der N-terminal blockierten CHH-Form eine zweite, unblockierte CHH-Form nachgewiesen werden, die in stöchiometrischem Verhältnis zur blockierten CHH-Form in der Hämolymphe auftaucht. Auch bei *Orconectes limosus* konnte eine unvollständige Zyklisierung des N-terminalen Glutamins für beide Isoformen gezeigt werden (Ollivaux und Soyez, 2000). Eine biologische Bedeutung konnte diesem Phänomen bislang nicht zugeordnet werden, da bei *Carcinus maenas* und *Cancer pagurus* keine Unterschiede hinsichtlich der hormonellen Wirksamkeit beobachtet wurden (Chung und Webster, 1996; Chung et al., 1998). Auch die vermuteten unblockierten Isoformen der beiden CHHs von *Cherax destructor* zeigten annähernd gleiche hyperglykämische Aktivität (Bulau, 2003). Aufgrund der nahezu identischen RP-HPLC-Chromatogramme (Phenyl-Hexyl-Säule) von *Astacus astacus* (vgl. Abb. 3.2) im Vergleich mit *Orconectes limosus* (eigene Beobachtungen) und *Cherax destructor* (Bulau et al., 2003), abgesehen von der dort auftretenden zweiten genetischen CHH-Variante, ist eine unvollständige Zyklisierung des CHH durchaus denkbar. So könnte es sich bei den vor den CHH-Isoformen eluierenden Peaks um die N-terminal unblockierten CHH-Isoformen handeln. Die

Gln<sup>1</sup>-Isoformen eluierten bei RP-HPLC-Trennungen immer früher als die entsprechenden pyroGlu<sup>1</sup>-Isoformen (Chung und Webster, 1996). Eine strukturelle Analyse der entsprechenden HPLC-Peaks wäre daher besonders interessant.

## **4.2 Biologische Aktivität des CHH von *Astacus astacus* und vergleichende Untersuchungen bei *Orconectes limosus***

### **4.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung**

Die Injektion von CHH führte bei allen Tieren zu signifikanten Anstiegen der Hämolymphe-Glucose im Vergleich zu Saline-injizierten Tieren. Dabei war eine klare Dosis-Abhängigkeit erkennbar. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf des hyperglykämischen Effektes zeigte sich bereits nach 1 h ein klarer Anstieg, der aber nach einer weiteren Stunde noch deutlicher wurde. Möglicherweise näherte sich die Hyperglykämie zwischen 1 h und 2 h ihrem Maximum, da sich zu diesem Zeitpunkt auch die unterschiedlichen CHH-Dosen sehr klar bemerkbar machten. Diese Entwicklung steht mit den Beobachtungen von Keller und Andrew (1973) in Einklang, die auch nach 2 h ein Maximum des hyperglykämischen Effektes nach Injektion von Sinusdrüsenextrakt beobachteten. Selbst bei einer Dosis von 6,25 pmol des *Astacus astacus*-CHH wurde ein Anstieg der Glucose-Titer um das Dreifache beobachtet, die Injektion von 62,5 bzw. 93,75 pmol löste Anstiege der Titer um den Faktor 10 aus. Bei einem durchschnittlichen Hämolymphevolumen der Tiere von etwa 25 ml ergäbe die Injektion von 6,25 pmol eine CHH-Konzentration in der Hämolymphe von 0,25 nM. Ein Vergleich mit den durchschnittlich gemessenen CHH-Titern von 0,01-0,02 nM spricht für eine hohe Wirksamkeit des CHH, insbesondere wenn man die sehr kurze Halbwertszeit in der Hämolymphe berücksichtigt (s. Kapitel 3.2.3). Gemessen an den CHH-Gehalten von rund 127 pmol/Sinusdrüse entsprechen die injizierten 6,25 pmol etwa 0,05 Sinusdrüsenäquivalenten, womit man vermutlich noch im Bereich denkbarer physiologischer CHH-Konzentrationen liegt. Die Glucose-Titer der Saline-injizierten Tiere zeigten auch einen leichten Anstieg im Versuchszeitraum von 2 h. Allerdings lagen die Konzentrationen signifikant unter denen der CHH-injizierten Tiere. Vermutlich sind versuchsbedingte Stresseffekte die Ursache für dieses Phänomen.

#### **4.2.2 Bestimmung der Kreuzreaktivität von *Astacus astacus*-CHH mit anti-*Orconectes limosus* CHH-Serum**

Im Hinblick auf eine zuverlässige Messung der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe wurde die Kreuzreaktivität des CHH von *Astacus astacus* mit dem Antiserum gegen das *Orconectes limosus*-CHH bestimmt. Dies war insofern besonders wichtig, als kein spezifischer Antikörper gegen das Edelkrebs-CHH vorlag und die Messungen im für *Orconectes limosus* entwickelten CHH-ELISA erfolgen mussten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 96 % wurden ausreichend gute Bindungseigenschaften des Antiserums für CHH erwartet. Erstaunlicherweise ergab der Vergleich der CHH-Standardkurven beider Spezies nur eine Kreuzreaktivität von 50 %. Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass die Antikörper spezifisch gegen den C-Terminus des Peptides gerichtet sein könnten, in dem 2 Aminosäureaustausche nachgewiesen wurden. Die Sequenz des *Astacus astacus*-CHH zeigt an Position 62 einen Valin- anstelle eines Leucin-Restes und an Position 71 wurde Threonin gegen Isoleucin ausgetauscht. Da diese beiden Austausche sehr nahe beieinander liegen, ist der C-terminale Peptidabschnitt vermutlich entscheidend für die geringe Kreuzreaktivität, der Aminosäure-Austausch an Position 24 (Glutamat gegen Aspartat) dahingehend jedoch weniger wichtig.

Ein entscheidender Befund dieses Versuches war die Reproduzierbarkeit der Standardkurve mit *Astacus astacus*-CHH als Standard, die zudem einen akzeptablen Verlauf und ausreichend hohe Extinktionswerte zeigte, um auch im Bereich niedriger CHH-Konzentrationen noch zuverlässig messen zu können. Allerdings liegt die Empfindlichkeit des ELISAs mit dem *Orconectes limosus*-Standard deutlich höher. Gerade im Bereich kleiner CHH-Konzentrationen ist eine stärkere Extinktionsänderung pro Konzentrationsänderung zu verzeichnen. Der Assay war jedoch für eine reproduzierbare Messung der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* genügend empfindlich.

#### **4.2.3 Bestimmung der *in vivo* Halbwertszeit von CHH**

Die Halbwertszeit eines Peptidhormons in der Hämolymphe ist ein wichtiges Charakteristikum zur Beurteilung der biologischen Aktivität. Sie gibt den Zeitraum an, innerhalb dessen die Menge an zirkulierendem Peptidhormon in der Hämolymphe halbiert wird. Die Injektion von 25 pmol CHH bei 4 Tieren ergab eine durchschnittliche Halbwertszeit von 1,5 bis 2 min. Dies machte sich in einem drastischen Abfall der CHH-Titer unmittelbar

nach der Injektion bemerkbar. Im folgenden Zeitraum zwischen 2 min bis hin zu 60 min zeigte sich nur noch ein langsamer, kontinuierlicher Abfall der CHH-Konzentrationen. Erstaunlich ist der schnelle Abfall der CHH-Titer insofern, als für die vollständige Verteilung einer injizierten Substanz über die Zirkulation ein Zeitraum von etwa 2 min bestimmt wurde (Webster, 1996). Offensichtlich wurde bei *Astacus astacus* das injizierte Hormon sehr schnell an Gewebe gebunden oder in der Hämolymphe abgebaut, so dass nach 2 min bereits deutlich weniger CHH in der Hämolymphe nachzuweisen war, als aufgrund der injizierten Menge zu erwarten gewesen wäre. Aufgrund dessen wurde die Hämolympheprobe unmittelbar vor der CHH-Injektion als Nullprobe festgesetzt. Da eine Differenzierung zwischen endogenem und exogen zugeführtem CHH zudem nicht möglich war, muss der Beitrag des endogenen CHH auf die Bestimmung der Halbwertszeit einschränkend beachtet werden. Außerdem ist eine Beschleunigung der CHH-Eliminierung aus dem Hämolymphekreislauf *in vivo* als Folge der Injektion einer größeren CHH-Menge vorstellbar. Eine derartig kurze Halbwertszeit erscheint jedoch realistisch, da auch bei *Cancer pagurus* mit vergleichbarer Methodik, d. h. Injektion einer größeren Menge von CHH und anschließende RIA-Messung, eine Halbwertszeit von 5-10 min bestimmt wurde (Webster, 1996). Versuche zur Bestimmung der Halbwertszeit durch Markierung des endogenen pools mittels Injektion quantitativ unerheblicher Mengen von <sup>125</sup>I-CHH ergaben bei *Carcinus maenas* identische, ebenfalls kurze Halbwertszeiten von 5-8 min (Webster, pers. Mitteilung). Der Versuchsansatz erlaubt keine Unterscheidung zwischen einer Eliminierung des CHH aus dem Hämolymphekreislauf durch enzymatische Degradation oder spezifische Bindung an Gewebe. Ein rapider Abfall der CHH-Konzentrationen unmittelbar nach der Injektion wurde auch bei *Carcinus maenas* beobachtet. Die Mehrheit des injizierten Hormons (> 90 %) konnte dabei am Kiemengewebe nachgewiesen werden, so dass man vermutete, dass die Kiemen eine entscheidende Funktion im Hinblick auf die Inaktivierung von Neuropeptiden haben. So konnten im Zusammenhang mit der Inaktivierung von endogenen Neuropeptiden an Membranen von Kiemengewebe ACE-ähnliche Aktivität (ACE: angiotensin-converting enzyme), Neprilysin und Aminopeptidasen nachgewiesen werden. CHH wurde durch die Enzyme an der Oberfläche der Kiemenmembranen direkt hydrolysiert. Eine Aminopeptidase-Aktivität fand sich auch in der Hämolymphe, nicht jedoch ACE und Neprilysin (Chung und Webster, 1999).

#### 4.2.4 Feedback-Effekt von injizierter Glucose auf die CHH-Ausschüttung

Die zirkadiane Rhythmik der CHH-Sekretion und der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe wird von Licht/Dunkel-Phasen gesteuert (Hamann, 1974; Keller und Orth, 1990; Kallen et al., 1990). Die Sekretion von CHH mit nachfolgender Hyperglykämie erfolgt unter Normalbedingungen in den Abendstunden und während der Nacht, also während der natürlichen Aktivitätsphase der Tiere. Des Weiteren wird die Freisetzung von CHH von Umweltfaktoren wie Anoxie, Temperaturschwankungen und Hungerzuständen beeinflusst. Allerdings gibt es bislang wenig Informationen über endogene Faktoren, die an einer Regulation der CHH-Sekretion beteiligt sind. Einige Informationen dazu lieferten die Studien von Santos und Keller (1993b) an *Carcinus maenas*. Ihre Befunde deuten auf einen dualen Feedback-Mechanismus hin, über den die CHH-Sekretion und demzufolge auch die zirkulierenden Mengen an Hormon in der Hämolymphe reguliert werden. Demnach könnte Laktat eine stimulatorische und Glucose eine inhibitorische Wirkung auf die Sekretion von CHH haben. Ergänzend zu diesen Befunden zeigten Glowik et al. (1997) eine direkte, inhibitorische Wirkung von D-Glucose auf CHH-immunreaktive Neurone des X-Organ-Sinusdrüsen-Systems in Organkultur *in vitro*. Diese machte sich in Form einer Hyperpolarisierung und Aktionspotentialhemmung bemerkbar.

Die vorliegenden Untersuchungen an *Astacus astacus* ergaben eine signifikante Abnahme der CHH-Konzentrationen nach Glucose-Injektion im Vergleich zu den Saline-injizierten Tieren, bei denen die CHH-Titer bei längeren Versuchszeiträumen sogar anstiegen. Auffallend war bei den mit Glucose injizierten Tieren eine Parallelentwicklung der CHH- und Glucose-Titer. Die Konzentrationen der Glucose zeigten nach 10 bis 20 min die im Hinblick auf injizierte Glucose-Menge und Hämolympfvolumen erwarteten Werte. Nach 60 min war bereits ein deutlicherer Abfall der Glucose-Konzentration zu beobachten. Zum Zeitpunkt der höchsten Glucose-Titer in der Hämolymphe zwischen 10 und 20 min zeigten die CHH-Titer dort einen klaren Abfall im Vergleich zu den Werten der Kontrolltiere. Dieser Abfall der CHH-Titer war nach 20 min sogar innerhalb der Gruppe, d. h. bei denselben Tieren, im Vergleich zu den Nullwerten signifikant. Nach 60 min zeigte sich eine Umkehrung dieses Effektes, denn die CHH-Titer stiegen wieder an. Die Ergebnisse dieser Experimente am Flusskrebs bestätigen die Befunde von Santos und Keller (1993a) an der Strandkrabbe und untermauern damit die Schlussfolgerung, dass die negative Feedback-Hemmung der CHH-Sekretion durch Glucose ein allgemeiner regulatorischer Mechanismus bei Dekapoden ist. Der Feedback-Mechanismus zeigte im Zeitraum bis zu 20 min ein Maximum. Der Abfall des Glucose-Titers im weiteren

Zeitraum bis zu 60 min unterschritt offenbar einen kritischen Schwellenwert, so dass die negative Rückkopplung auf die CHH-Sekretion ausblieb und die CHH-Titer sogar deutlich über das Ausgangsniveau des Nullwertes anstiegen. Die Hemmung der elektrischen Aktivität der CHH-Neurone durch D-Glucose *in vitro* (Glowik et al., 1997) legt nahe, dass die CHH-Zellen direkt als Sensoren für die Glucose-Titer in der Hämolymphe fungieren und Glucose über einen noch unbekanntem Mechanismus die CHH-Sekretion reguliert. Dies könnte auch den deutlichen Anstieg der CHH-Titer nach 60 min erklären. Der Wegfall des zuvor beobachteten Feedback-Effektes könnte möglicherweise in einer zunächst verstärkten CHH-Freisetzung resultieren (overshoot). Wahrscheinlicher ist aber der Einfluss versuchsbedingter Stresseffekte, da auch bei den Saline-injizierten Tieren über alle Versuchszeiträume ein Anstieg der CHH-Titer erkennbar war, der nach 60 min am stärksten war und wahrscheinlich auch die erhöhten Glucose-Konzentrationen der Saline-injizierten Tiere erklärt. Derartige Stresseffekte waren vermutlich bei allen Tiergruppen beteiligt, jedoch konnte deren Ausprägung für einen gewissen Zeitraum durch den Feedback-Effekt der injizierten Glucose kompensiert werden.

Über die Entstehung der Hyperglykämie infolge von Stresseffekten und beteiligte Faktoren gibt es bislang keine genauen Informationen. Dabei stellt sich die Frage, ob entsprechende Faktoren die Hyperglykämie über eine direkte Wirkung auf die CHH-Sekretion ausprägen, oder ob dies unabhängig von CHH erfolgt. Es gibt eine Reihe von Faktoren, denen eine mögliche Beteiligung an der Kontrolle der CHH-Sekretion zugeschrieben wird. Dazu gehören unter anderem Serotonin, GABA ( $\gamma$ -Amino-Buttersäure), Dopamin und Enkephaline. Serotonin, Dopamin und Met-Enkephalin konnten sogar im X-Organ-Sinusdrüsen-Komplex nachgewiesen werden (Van Herp und Kallen, 1991). Während Serotonin und GABA eine inhibitorische Wirkung auf die elektrische Aktivität CHH-immunreaktiver Neurone *in vitro* zeigten (Glowik et al., 1997), konnte für Dopamin und Leu-Enkephalin keine direkte Wirkung auf zellulärer Ebene gezeigt werden. Dennoch wurde eine Wirkung beider Faktoren auf die CHH-Sekretion nicht ausgeschlossen. Da Leu- und Met-Enkephalin die Freisetzung von CHH aus Sinusdrüsen *in vivo* und *in vitro* inhibierten (Jaros, 1990; Rothe et al., 1991), käme Dopamin als Faktor bei der Vermittlung der Stresseffekte in Frage. Über einen möglichen Wirkungsmechanismus liegen bislang keinerlei Informationen vor. Unterstützt wird diese These jedoch durch die Befunde von Zou et al. (2003), die bei *Procambarus clarkii* signifikante Anstiege der CHH- und Glucose-Titer in der Hämolymphe nach Injektion von Dopamin beobachteten. Diese Anstiege waren bereits eine halbe Stunde nach Dopamin-Gabe messbar, erreichten nach 1 h Maximalwerte und fielen dann innerhalb von 3 h wieder auf das

Grundniveau ab. Bei entstielten Tieren zeigten sich im Gegensatz dazu keine Erhöhungen der CHH- und Glucose-Titer nach Dopamin-Injektion. Zudem konnte Dopamin die CHH-Sekretion aus *in vitro* inkubierten Augentielganglien stimulieren. Nach diesen Befunden ist eine Beteiligung von Dopamin an der CHH-Sekretion und nachfolgender Hyperglykämie infolge von Stresseffekten bei *Astacus astacus* vorstellbar, da nach Saline-Injektion ein ähnlicher Verlauf der CHH- und Glucose-Konzentrationen innerhalb von 1 h beobachtet werden konnte.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei *Astacus astacus* konnte bei dem amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus* kein Feedback-Effekt von D-Glucose auf die CHH-Sekretion gezeigt werden. Obwohl die injizierte Glucose zu einem Anstieg der Glucose-Titer führte, der dem bei *Astacus astacus* vergleichbar war, erhöhten sich die CHH-Konzentrationen in allen Versuchszeiträumen. Ähnlich wie bei *Astacus astacus* war zu beobachten, dass die CHH-Titer mit Abnahme der Glucose-Titer bei längeren Versuchszeiträumen stärker anstiegen. So wurde bei 60 min der höchste Anstieg der CHH-Konzentrationen beobachtet, die Glucose-Konzentration war zu diesem Zeitpunkt wieder entsprechend abgesunken. Da bei *Orconectes limosus* kein 10 min-Zeitraum untersucht wurde wäre es vorstellbar, dass der Zeitraum, in dem sich ein Feedback-Effekt von Glucose bemerkbar macht, deutlich kürzer als bei *Astacus astacus* ist. Demzufolge wäre eine Absenkung der CHH-Titer nicht erfasst worden. Die Beobachtung, dass die CHH-Titer mit einer Verlängerung der Versuchszeiträume im Vergleich zur Kontrolle deutlich stärker anstiegen, könnte diese Vermutung bestätigen. Andererseits könnte der Schwellenwert der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe höher als bei *Astacus astacus* liegen, so dass die injizierte Glucose-Menge nicht ausreichte um einen Feedback-Effekt auszulösen. Hinsichtlich der versuchsbedingten Stresseffekte zeigte sich bei allen Saline-injizierten Tieren auch ein Anstieg der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe, der vermutlich für die erhöhten Glucose-Titer verantwortlich war. Der Anstieg der CHH-Titer verlief bei allen Versuchszeiträumen vergleichbar mit den beobachteten Titer-Erhöhungen bei Glucose-injizierten Tieren. Bei beiden Versuchsgruppen wurde die Konzentrationsänderung im direkten Vergleich zum Nullwert jedoch mit längerer Versuchsdauer immer stärker ausgeprägt. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich ein Feedback-Effekt von Glucose auf die CHH-Sekretion bei *Orconectes limosus* möglicherweise in kürzeren Zeitspannen abspielt.

#### 4.2.5 Antiserum-Neutralisation

In den zuvor besprochenen Experimenten wurde für *Astacus astacus* eine direkte regulatorische Funktion von Glucose bei der CHH-Sekretion gezeigt. Eine bisher unbeantwortete Frage ist, ob der stets messbare, basale CHH-Titer eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Glucose-Konzentrationen (die Glucose-Homöostase) hat. Ob dies der Fall ist, sollte durch experimentelle Erniedrigung des normalen CHH-Titers und eine daraus resultierende Hypoglykämie nachweisbar sein. Durch die Injektion von CHH-Antiserum, welches zirkulierendes CHH bindet und blockiert, sollte der Beweis dafür erbracht werden können. Erste Hinweise hierzu gab es bereits aus Experimenten, bei denen das Entstielen von Tieren zu Hypoglykämie führte (Keller, 1974). Auch die selektive Entfernung der Sinusdrüsen (Hamann, 1974) führte zu einem Abfall der Glucose-Konzentrationen in der Hämolymphe, und zudem wurde der diurnale Rhythmus der Glucose-Konzentrationen aufgehoben. Mit der Injektion von Antiserum sollte das Entfernen der Augens tiele bzw. ausschließlich der Sinusdrüse umgangen und der Stressfaktor für die Tiere minimiert werden. Zudem ermöglichte diese Vorgehensweise das Arbeiten mit intakten Tieren.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse für *Astacus astacus* ergab bei den mit Antiserum injizierten Tieren eine nahezu unveränderte Glucose-Konzentration in der Hämolymphe. Im Gegensatz dazu führten die Injektionen von normalem Kaninchenserum und Van Harreveld Saline zu signifikanten Erhöhungen der Glucose-Titer, die sowohl innerhalb der Gruppe, als auch im Vergleich zu den Antiserum-injizierten Tieren signifikant waren. Dies bewies einerseits, dass die Zusammensetzung des Normalserums keinen störenden Einfluss ausübte, wie aufgrund der beobachteten Effekte zu vermuten gewesen wäre. Andererseits zeigte dieser Befund aber auch, dass die Versuchsdurchführung unvermeidbar mit Stresseffekten und folgender Hyperglykämie verbunden ist. Die Stresseffekte könnten auch als Ursache für die nahezu unveränderten Glucose-Titer bei den mit Antiserum injizierten Tieren angesehen werden. Vermutlich wurde bei dieser Tiergruppe der Stresseffekt durch das injizierte Antiserum kompensiert, aber offensichtlich reichte die Antikörpermenge nicht aus, um das zirkulierende CHH in der Hämolymphe vollständig abzufangen. Dies steht vielleicht auch im Zusammenhang mit der Injektion von Antiserum gegen *Orconectes limosus*-CHH, dass mit dem CHH von *Astacus astacus* nur zu etwa 50 % kreuzreagiert. Eine vermutete Absenkung der Glucose-Konzentrationen durch Eliminierung von CHH aus der Hämolymphe konnte daher nicht gezeigt werden. Die Beobachtungen können aber als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass die Hyperglykämie infolge von Stresseffekten über eine CHH-

Sekretion realisiert wird und nicht unabhängig von CHH entsteht. Die mögliche Beteiligung verschiedener Faktoren im Falle einer stressbedingten CHH-Freisetzung wurde bereits zuvor besprochen. Eine ergänzende Kontrolluntersuchung mit IgG-Fractionen des Antiserums lieferte ähnliche Ergebnisse. Offensichtlich sind die Stresseffekte in der Durchführung des Experimentes (Injektion, Hämolymphentnahme) und nicht in der Zusammensetzung des Antiserums begründet.

Bei *Orconectes limosus* ergab sich dasselbe Problem mit versuchsbedingtem Stress. Die Injektion von normalem Kaninchenserum und Van Harreveld Saline führte zu deutlichen Erhöhungen der Glucose-Titer im Versuchszeitraum von 5 h. Die CHH-Titer der Hämolymphe zeigten einen leichten Abfall, der nahezu signifikant innerhalb der Versuchstiergruppe war. Vermutlich wurde auch bei dieser Crustaceen-Spezies der Einfluss von stressbedingt freigesetztem CHH kompensiert, jedoch war die Menge an Antiserum zu gering, um eine vollständige, dauerhafte Eliminierung von CHH aus der Hämolymphe zu bewirken. In weiteren Experimenten wurde daher die Menge an injiziertem CHH drastisch um das Zehnfache erhöht. Dabei zeigte sich, dass die Glucose-Titer nicht nur bei Injektion von Normalserum signifikant anstiegen, sondern nun auch nach Injektion von Antiserum. Die Entwicklung über einen Zeitraum von 2 h war sogar in beiden Fällen signifikant. Von einer geringfügigen Kompensation des Stresseffektes konnte man nur insofern sprechen, als dass die Anstiege der Glucose-Titer über 1 h und 2 h bei den Antiserum-injizierten Tieren im Verhältnis niedriger waren. Möglicherweise wurde durch das größere Injektionsvolumen der Stressfaktor für die Tiere nochmals erhöht.

Die Kontrollexperimente mit kombinierter Injektion von Antiserum und Sinusdrüsenextrakt erbrachten den Beweis, dass CHH in der Hämolymphe tatsächlich durch die Antikörper gebunden wird. Allerdings ergab sich dabei eine Abhängigkeit von der Injektionsreihenfolge. Nur bei vorheriger Injektion des Antiserums konnte eine Hyperglykämie durch die nachfolgende Injektion des Sinusdrüsenextraktes unterbunden und sogar ein leichter Abfall der Glucose-Titer bewirkt werden. Die Injektion von Sinusdrüsenextrakt in Kombination mit Normalserum führte unabhängig von der Injektionsreihenfolge immer zu einer klaren Hyperglykämie. Dieses Experiment geht konform mit den Befunden aus den Halbwertszeit-Experimenten. Dort wurde unmittelbar nach Injektion von CHH ein drastischer Abfall der CHH-Titer beobachtet, wobei allerdings nicht zwischen Hormondegradation und Bindung an Gewebe unterschieden werden konnte. Die Tatsache, dass die Injektion von Sinus-

drüsenextrakt durch eine 2 min später erfolgende Antiserum-Injektion allenfalls nur leicht kompensiert werden kann, spricht für eine rasche Verteilung des Peptidhormons über die Zirkulation und schnelle Bindung an Gewebe.

Zusammenfassend kann man für beide untersuchte Flusskrebs-Arten feststellen, dass die Experimente Hinweise auf eine direkte, regulatorische Aktivität des CHH im Hinblick auf die Aufrechterhaltung physiologischer Glucose-Konzentrationen erbrachten. Jedoch wurde ein eindeutiger Nachweis der direkten Beteiligung von CHH durch das Auftreten unvermeidbarer, versuchsbedingter Stresseffekte besonders erschwert.

#### **4.2.6 Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von CHH unter Hypoxie**

Eine Beteiligung des CHH an stressbedingter Hyperglykämie, die bei entstielten Tieren nicht nachzuweisen war, konnte in einigen Studien gezeigt werden (Keller, 1974; Kleinholz und Keller, 1979; Dean und Vernberg, 1965; Salminen und Lindquist, 1975 ). Es stellte sich die Frage, inwiefern CHH an einer Anpassung an Umweltstress (Temperaturschwankungen, anoxische Bedingungen, Hunger) beteiligt ist. Untersuchungen in dieser Richtung wurden durch die Entwicklung von Methoden ermöglicht, die eine genaue Messung von CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe ermöglichten. Unter hypoxischen Bedingungen konnten Keller und Orth (1990) eine CHH-Ausschüttung zusammen mit einem drastischen Anstieg der Glucose-Konzentrationen beobachten, wobei die CHH-Titer bereits nach 15 min wieder abfielen. Bei entstielten Tieren blieb eine derartige Reaktion völlig aus. Auch eine Erhöhung der Temperatur löste einen parallelen Anstieg der CHH- und Glucose-Konzentrationen aus, der abermals bei entstielten Tieren ausblieb. Die Haltung von *Carcinus maenas* an atmosphärischer Luft führte zu erhöhten Konzentrationen an Glucose und Laktat in der Hämolymphe. Bei entstielten Tieren zeigten sich dahingehend keine Veränderungen, was jedoch durch die Injektion von CHH, nicht aber durch Van Harreveld Saline behoben werden konnte. Interessanterweise erzeugte die Injektion von CHH bei entstielten Tieren unter Normalbedingungen nur eine Hyperglykämie, die Laktat-Titer blieben unverändert (Santos und Keller, 1993a). Ein Anstieg der CHH-, Glucose- und Laktat-Konzentrationen unter Hypoxie zeigte sich auch bei *Cancer pagurus*, wobei der dramatische Anstieg der CHH-Titer bereits innerhalb der ersten 15 min nachzuweisen war (Webster, 1996). Weitere ähnliche Befunde wurden für *Homarus americanus* erhoben. Interessant war bei dieser Studie, dass auch bei entstielten Tieren noch signifikante CHH-Titer nachweisbar waren, die nach Haltung

der Tiere unter Anoxie für 4 h ebenfalls anstiegen. Signifikante Änderungen der Glucose-Titer wurden nicht beobachtet. Dies wurde als Hinweis auf eine alternative CHH-Quelle gewertet (Chang et al., 1998).

Die Untersuchungen zur biologischen Funktion des CHH von *Astacus astacus* bei der Anpassung an Umweltstress wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei zwei Formen der Hypoxie durchgeführt, einer extremen (Haltung der Tiere in wassergesättigter Luft) und einer partiellen Hypoxie (50 % Sauerstoff im Haltungswasser).

Die Experimente, bei denen die Tiere einer extremen Hypoxie ausgesetzt wurden, zeigten einen dramatischen Anstieg der Laktat-Konzentrationen in der Hämolymphe der Tiere, der im Gegensatz zu den Befunden bei partieller Hypoxie auch bei augenstiellosen Tieren auftrat. Erkennbar war in diesem Zusammenhang nur die Tendenz, dass die Laktat-Produktion bei den 10 Tage und länger entstielteten Tieren schwächer ausfiel und die Injektion von CHH zum Teil einen abschwächenden Effekt hatte (24 h esx, 25 pmol CHH, Abb. 3.17). Eine Beteiligung des CHH an der Anpassung der Tiere an extreme Hypoxie ist aufgrund der Daten bei den intakten Tieren denkbar, da auch hier ein Anstieg der CHH-Titer in ähnlichem Ausmaß wie bei gemäßigter Hypoxie erfolgte. Zieht man allerdings die Beobachtungen bei entstielteten Tieren in Betracht, so ist ein direkter Zusammenhang mit der Laktat-Bildung unwahrscheinlich, da keine wesentlichen Anstiege der CHH-Titer beobachtet werden konnten. Ein besonders auffallendes Ergebnis war der eindeutige Nachweis gut messbarer CHH-Mengen bei den entstielteten Tieren, die zum Teil sogar leicht anstiegen. Ein entsprechender Anstieg der Glucose-Konzentrationen war damit aber nur in den seltensten Fällen verbunden, wohingegen die Laktat-Konzentrationen deutlich anstiegen. Dieser Befund geht konform mit den Beobachtungen bei *Homarus americanus*, wo bei entstielteten Tieren auch noch signifikante CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe gemessen wurden und nach 4 h Hypoxie ein Anstieg der CHH-Titer nachweisbar war. Die Glucose-Konzentrationen blieben allerdings unverändert (Chang et al., 1998). Möglicherweise sind diese Befunde Hinweise auf eine alternative CHH-Quelle und eine neue CHH-Variante, die an der direkten Anpassung des Stoffwechsels an extreme Hypoxie-Bedingungen beteiligt ist, so dass eine Beteiligung bei gemäßigter Hypoxie vielleicht nicht nachgewiesen werden kann oder vielleicht sogar gar nicht erforderlich ist. Für den Hummer konnten bereits CHH-immunreaktive Zellen in den zweiten Wurzeln der Thorakalganglien nachgewiesen werden (Chang et al., 1999; Dirksen et al., 2000). Zudem wurde aus den Perikardialorganen von *Carcinus maenas* eine neue CHH-Variante isoliert und charakterisiert, die auffallenderweise

keine hyperglykämische Aktivität zeigte (Dircksen et al., 2001). Vielleicht sprechen die Ergebnisse aus den Untersuchungen an *Astacus astacus* für die Existenz einer weiteren CHH-Variante, möglicherweise mit Lokalisation in den Perikardialorganen. Es wäre daher erstrebenswert, nähere Untersuchungen in dieser Richtung zu unternehmen.

Bei den Experimenten zur partiellen Hypoxie ergaben sich für die Konzentrationen an Glucose, Laktat und CHH Entwicklungen, die eindeutig für eine Beteiligung des CHH an der Adaption an die hypoxischen Bedingungen sprechen. Alle Titer der untersuchten Parameter zeigten bei partieller Hypoxie im Versuchszeitraum von 2 h eindeutige Anstiege. Im Gegensatz dazu blieben diese Anstiege bei entstielten Tieren aus. Es traten zwar leichte Schwankungen, insbesondere der Laktat-Titer auf, die aber im Rahmen bzw. deutlich unter den bei intakten Tieren unter Normalbedingungen beobachteten Schwankungen lagen. Durch Injektion von CHH konnte der Effekt der Entstielung kompensiert werden. Auf Glucose-, Laktat- und CHH-Ebene wurde wieder ein Anstieg der Konzentrationen in der Hämolymphe beobachtet. Dass dieser Effekt spezifisch auf CHH zurückzuführen ist, bewies die Injektion von Van Harreveld Saline, die im Gegensatz zu CHH keine deutlichen Veränderungen der Konzentrationen aller Parameter hervorrief. Die Dauer des Entstielens spielte im Hinblick auf die Fragestellung des Experimentes offenbar keine Rolle. Eine Aufhebung des Effektes der Entstielung konnte sowohl nach 24 h als auch nach 4 Tagen und 30 Tagen durch CHH-Injektion bewirkt werden. Auffallend war allerdings, dass bei einigen entstielten Tieren die Injektion von CHH sich in den CHH-Titern verhältnismäßig schwach bemerkbar machte, obwohl die Glucose-Titer meist eine eindeutige Hyperglykämie anzeigten. Die Gruppe der 24 h entstielten Tiere mit Injektion von 50 pmol CHH fiel besonders auf, da weder auf CHH-Ebene noch auf Glucose-Ebene ein Anstieg in erwartetem Maße erfolgte. Auch die Entwicklung der Laktat-Titer war bei dieser Versuchstiergruppe verhältnismäßig schwach. Möglicherweise spielt die deutlich höhere Glucose-Konzentration der Nullwerte dieser Versuchsgruppe in diesem Zusammenhang eine Rolle. Insgesamt bestätigen die Befunde der Experimente unter gemäßigter Hypoxie die Beobachtungen der bereits beschriebenen Studien an anderen Crustaceen-Spezies, die jedoch bei extremer Hypoxie durchgeführt wurden. Abgesehen von der grundsätzlichen Entwicklung der drei untersuchten Parameter zeigten sich auch bei der zeitlichen Entwicklung der CHH-Titer auffallende Parallelen. Die Kurzzeitexperimente an *Astacus astacus* brachten einen sprunghaften Anstieg innerhalb der ersten 15 min hervor, der in dieser Form auch bei *Cancer pagurus* und *Orconectes limosus* beobachtet wurde (Webster, 1996; Keller und Orth, 1990). Der beobachtete Abfall der

Glucose-Konzentration nach 15 min könnte im Hinblick auf die direkte regulatorische Funktion von Glucose auf die CHH-Sekretion von Bedeutung sein. Ein Abfall der Glucose-Titer würde sich demzufolge in einer verstärkten CHH-Freisetzung bemerkbar machen. Der Abfall der Glucose-Konzentrationen selbst könnte hingegen eine Folge von höherer Glykolyserate sein, die sich möglicherweise in der deutlich erhöhten Laktat-Konzentration nach 15 min widerspiegelt. Eine auffallende Beobachtung im Hinblick auf die CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe wurde bei entstielten Tieren gemacht. Selbst 30 Tage entstielte Tiere zeigten noch messbare Titer an CHH. Da eine solche Beobachtung auch bei *Homarus americanus* gemacht wurde und dieses Phänomen als Hinweis auf eine alternative CHH-Quelle gewertet wurde (Chang et al., 1998), ist auch bei *Astacus astacus* über eine weitere CHH-Quelle nachzudenken. An der Adaption der Tiere an hypoxische Bedingungen ist CHH vermutlich in der Form beteiligt, dass es die schnelle Mobilisierung von Glucose-Reserven bewirkt und somit höhere Glykolyseraten ermöglicht. Eine direkte Beteiligung von CHH an der Laktat-Produktion über eine modulatorische Wirkung auf die Glykolyse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da bei einer Studie zu extremer Hypoxie von Santos und Keller (1993b) der Abfall der CHH-Titer infolge von Glucose-Injektion zu einer Abnahme der Laktat-Produktion führte.

#### **4.2.7 Untersuchungen zur Bedeutung von CHH bei einer vorübergehenden, natürlichen Hypoxie während der Ecdysis**

Flusskrebse können in ihrem natürlichen Lebensraum hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sein und werden auch in normoxischem Milieu temporär hypoxisch, und zwar im Laufe des natürlichen Häutungsprozesses. Daher ist es besonders interessant, die Rolle von CHH bei der Adaption an Hypoxie-Stress zu untersuchen. Im Rahmen der Untersuchungen zur Funktion des CHH bei der Adaption an die natürliche, physiologische Hypoxie während der Ecdysis wurden die Laktat-, CHH- und Glucose-Titer von Häutungstieren gemessen. Dabei zeigte sich ein 45-50facher Anstieg der Laktat-Titer in der späten Ecdysisphase bis etwa 0,5 h nach Vollendung der Ecdysis. Der Anstieg des Hämolymphe-Laktats wurde aber relativ schnell, meist innerhalb von 2 h, wieder abgebaut. Besonders auffallend war ein dramatischer Anstieg der CHH-Titer in der Hämolymphe, der mit der Ecdysisphase korrelierte. Kurz vor bzw. mit Beginn der Ecdysis stiegen die CHH-Titer bis zu 184fach (Tier 13, Abb. 3.23) an, waren aber bereits eine halbe Stunde bis Stunde nach Vollendung der Ecdysis wieder deutlich gesunken und bewegten sich kontinuierlich auf ein Grundniveau zu. Hinsichtlich der Glucose-Titer

zeigten sich nur verhältnismäßig schwache Erhöhungen im Zeitraum von etwa 30 min nach Ende der Ecdysis, die ebenfalls in den folgenden Stunden kontinuierlich abgebaut wurden. Die deutliche Erhöhung der Laktat-Titer ist ein eindeutiger Beweis für das Auftreten eines hypoxischen, physiologischen Zustandes, bedingt durch die eingeschränkte Sauerstoffaufnahme während der Häutung der Kiemen. Des Weiteren zeigt das Ausmaß des Laktat-Titer-Anstiegs, dass es sich um eine extreme Hypoxie handelt, da die Erhöhungen der Laktat-Konzentrationen (45-50fach) mit denen bei Haltung der Tiere an Luft vergleichbar waren bzw. noch stärker ausfielen. Bei Haltung der Tiere an Luft wurden Erhöhungen der Laktat-Titer in der Hämolymphe um den Faktor 30-45 gemessen (Abb. 3.17). Eine Beteiligung des CHH bei der Adaption an den hypoxischen Zustand während der Häutung erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Laktat-Bildung in Relation zu den immensen Anstiegen der CHH-Titer sehr schwach ausfiel und eine Funktion des CHH bei der Adaption an extreme Hypoxie nicht nachweisbar war. So führte die Haltung augenstielloser Tiere an Luft zu vergleichbaren Anstiegen der Laktat-Titer (Abb. 3.17). Auch die verhältnismäßig schwachen Steigerungen der Glucose-Titer deuten auf eine untergeordnete Rolle des CHH im Hinblick auf die Glucosemobilisierung hin, obwohl eine derartige Funktion des CHH bei dem sehr energieaufwendigen Häutungsprozess durchaus vorstellbar gewesen wäre. Bei CHH-Titern zwischen 460 und 510 fmol/100 µl hätte man enorme Anstiege der Glucose-Titer erwarten dürfen, zumal die Injektion von 6,25 pmol CHH, die in einer Hämolymphe-Glucose-Konzentration von etwa 25 fmol/100 µl resultierte, bereits zu einer Erhöhung der Glucose-Titer auf das Dreifache der Ausgangswerte führte. Demzufolge ist das CHH-Signal während der Ecdysis ein Hinweis auf weitere biologische Funktionen des CHH. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung CHH-synthetisierender Zellen im Darm der Strandkrabbe *Carcinus maenas*, die das Peptid nur in der Vorhäutungszeit exprimieren und nachfolgend auch nahezu vollständig ausschütten. Dies führte zu einem drastischen Anstieg des mit Sinusdrüsen-CHH identischen Peptides in der Hämolymphe während der späten Vorhäutungsphase und der Ecdysis. Innerhalb von etwa 1 h kehrten die CHH-Titer der Hämolymphe dann wieder auf ein Grundniveau zurück. Die Glucose- und Laktat-Konzentrationen stiegen im Laufe des Häutungsprozesses vergleichsweise schwach an (Chung et al., 1999). Über den Synthesort des in der Hämolymphe von *Astacus astacus* während der Ecdysis nachgewiesenen CHHs können keine Aussagen gemacht werden, aber aufgrund des nahezu identischen Verlaufs der CHH-Titer könnte nach den Daten von Chung et al. (1999) das CHH auch bei *Astacus astacus* aus Darmzellen stammen, die das Peptid nur während der Vorhäutungsphase exprimieren. Chung et al. (1999) wiesen dem in Paraneuronen

des Darmes synthetisierten CHH eine Funktion im Zusammenhang mit einer direkten Wasser- und Ionenaufnahme über das Darmepithel während der Häutung zu. Auch bei anderen Crustaceen-Spezies wie *Astacus leptodactylus* und *Homarus americanus* wurden osmoregulatorische Funktionen des CHH nachgewiesen, wenn auch nicht in direktem Zusammenhang mit der Häutung (Serrano et al., 2003; Charmantier-Daures et al., 1994). Somit ist eine derartige Funktion des erstmals bei einer Süßwasserart nachgewiesenen CHH-Anstiegs während der Ecdysis auch bei *Astacus astacus* vorstellbar. Daher wäre es von besonderem Interesse, den Syntheseort des CHH und dessen Wirkung bei verschiedenen Häutungsstadien zu untersuchen. Es bleibt unklar, warum die dramatische Erhöhung des CHH-Titers kurz vor der Ecdysis nicht zu einem massiven hyperglykämischen Effekt führt.

#### **4.3 Zielorgane und biologischer Wirkungsmechanismus der Isoformen des hyperglykämischen Hormons CHH beim amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus*: Beteiligung zyklischer Nukleotide**

Der biologische Wirkungsmechanismus von CHH ist bisher nur sehr unvollständig bekannt. Hinsichtlich der Rezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen existieren zwar einige Hinweise, jedoch konnte der gesamte Wirkungsmechanismus von Rezeptoren, über Signaltransduktionsmechanismen bis hin zur Aktivierung von Enzymsystemen nicht vollständig aufgeklärt werden. Außerdem ist noch unvollständig bekannt, welche Organe Zielorgane von CHH sind. Als Faktoren, die an der Vermittlung der Hormonwirkung beteiligt sind, konnten cGMP und cAMP nachgewiesen werden, wobei viele Hinweise auf das cGMP als vorrangig beteiligtem second messenger hindeuten (Sedlmeier und Keller, 1981; Goy et al., 1987). Da die Bildung von cGMP und cAMP ein sehr frühes Ereignis innerhalb der Signaltransduktionskaskade darstellt, ist die Messung der Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden nach CHH-Injektion eine sinnvolle Methode um Informationen über die Zielorgane des CHH zu sammeln. In bisherigen Untersuchungen wurden entweder nicht vollständig reine bzw. nicht genau quantifizierte Hormonpräparationen *in vivo* (Sedlmeier und Keller, 1981) oder *in vitro* (Goy et al., 1987; Dircksen et al., 2001) an einer begrenzten Zahl von Geweben getestet. In der vorliegenden Arbeit wurden daher genau quantifizierte Dosen reinen Hormons *in vivo* getestet, wobei die Menge so bemessen wurde, dass angenähert physiologische Titer in der Hämolymphe resultierten. Ausserdem sollten die L- und D-Isoformen von CHH vergleichend getestet werden, und es sollte eine größere Zahl von Geweben einbezogen werden. Es wurden Gehirn, Antennendrüse, Kiemen, Herz,

Mitteldarmdrüse, Schwanzmuskel und Abdominalganglien untersucht. In einem zusätzlichen *in vitro* Experiment wurde die Wirkung des CHH auf Y-Organ untersucht.

Bei Gehirn, Antennendrüse, Herz, Kiemen und Schwanzmuskel konnten sowohl nach Injektion der L- als auch der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform von CHH signifikante Anstiege der cGMP-Konzentrationen im Vergleich zur Injektion von Saline beobachtet werden. Bei Abdominalganglien und Mitteldarmdrüse wurden ähnliche Effekte von L-CHH beobachtet, die jedoch aufgrund der starken Schwankungen zwischen einzelnen Tieren statistisch nicht signifikant waren. Möglicherweise sprechen bei diesen Geweben nur einer oder wenige Zelltypen auf CHH an. Auch ein deutlicher cGMP-Anstieg in diesen Zellen könnte durch Bezug der cGMP-Gehalte auf die Gesamtproteinmenge schwer nachweisbar sein. Bei der Mitteldarmdrüse stellte der hohe Fettgehalt ein zusätzliches Problem dar, das zu Schwierigkeiten bei der Extraktion und der zuverlässigen Messung im cGMP-Assay führte. Deshalb dürfen beide Gewebe, insbesondere aber die Abdominalganglien, als Zielorgan nicht ausgeschlossen werden, zumal im Cerebralganglion ein eindeutiger Effekt des CHH nachweisbar war.

Hinsichtlich der zeitlichen Dynamik des cGMP-Effektes deuteten sich für die beiden CHH-Formen insofern Unterschiede an, als die L-Phe<sup>3</sup>-Isoform, abgesehen von Herz und Antennendrüse, bei allen Organen nach 10-20 min ein Maximum des Effektes zu haben schien. Die D-Isoform schien dagegen in einigen Fällen (Gehirn, Kiemen, Schwanzmuskel) schon nach 2-5 min zu einem maximalen Effekt zu führen. Beim Herzen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der zeitlichen Dynamik des cGMP-Signals und bei der Antennendrüse war der Zeitverlauf für die CHH-Isoformen eher umgekehrt. Diese Beobachtungen müssen jedoch sehr kritisch betrachtet werden, da starke individuelle Schwankungen erhebliche Probleme bei der Ermittlung exakter Zeitverläufe bereiten. Bereits innerhalb der Versuchstiergruppen zeigten sich deutliche Verschiebungen der cGMP-Effekte. Wurden bei einigen Tieren deutliche Effekte bereits nach 2 min nachweisbar, zeigten andere Tiere zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt. Die Ermittlung exakter Zeitverläufe hätte eine sehr große Anzahl an Einzeltiermessungen erfordert, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Der entsprechende Aufwand an Hormonmengen wäre jedoch unverhältnismäßig groß gewesen. Demzufolge wurden die Versuchsergebnisse zu zwei Zeiträumen zusammengefasst.

Die starke Variabilität zwischen einzelnen Tieren machte sich jedoch nicht nur im Zeitverlauf bemerkbar, sondern auch in dem Ausmaß des cGMP-Anstiegs. So lieferte die Injektion von

5 pmol CHH zum Teil vergleichbare Anstiege des cGMP-Gehaltes wie die Injektion von 30 oder 50 pmol CHH. Eine eindeutige Erklärung für diese Beobachtungen konnte bislang nicht gefunden werden. Möglicherweise gibt es jahreszeitlich bedingte Ursachen, obwohl immer auf den Einsatz von Zwischenhäutungstieren geachtet wurde. Schwer erklärbar bleibt auch die Beobachtung, dass, obwohl Tiere auf CHH-Injektion mit deutlicher Hyperglykämie reagierten, bei denselben Tieren ein Effekt auf cGMP-Ebene in einigen Geweben gelegentlich nicht nachweisbar war. Ausnahme war dabei stets das Herz, welches immer zuverlässig cGMP-Effekte nach Injektion von CHH zeigte. Ob der vermeintlich stärkere Effekt des L-Phe<sup>3</sup>-CHH beim Herzen allerdings real ist, bleibt unsicher, da die beiden Injektionsmethoden beim Herzen unterschiedlich starke Effekte dieser Isoform zeigten, die allerdings immer stärker als die der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform waren. Erstaunlich sind die generell beobachteten Schwankungen der cGMP-Effekte nach Injektion verschiedener CHH-Mengen insofern, als die Injektion definierter Mengen an ungereinigtem Sinusdrüsenextrakt beim Herzen klar abgestufte cGMP-Effekte in Abhängigkeit von der Extraktmenge zeigte. Demnach wäre es sinnvoll, weitere Studien durchzuführen, bei denen die Wirkung von Sinusdrüsenextrakt und quantifizierten CHH-Isoformen im direkten Vergleich untersucht wird, um der Ursache für die beobachteten Schwankungen der cGMP-Anstiege auf den Grund zu gehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beiden CHH-Isoformen auf dieselben Zielorgane cGMP-steigernd wirkten. Eine Aussage über exakte Zeitverläufe und die Wirksamkeit beider Isoformen war jedoch aufgrund starker Streuung der Messwerte nicht eindeutig möglich.

Für das cAMP konnte bei keinem Gewebe ein eindeutiger Hinweis auf eine Beteiligung an der Vermittlung der CHH-Wirkung gefunden werden. In einigen Fällen trat über beide Versuchszeiträume ein Abfall der cAMP-Konzentrationen ein (Antennendrüse, Schwanzmuskel). Oftmals erfolgte jedoch im Zeitraum von 2-5 min ein leichter, eher unspezifischer Anstieg, der meist von einem klaren Abfall der cAMP-Gehalte nach 10-20 min gefolgt wurde (Gehirn, Herz, Abdominalganglien). Bei den Kiemen ergab sich für beide CHH-Isoformen ein nicht signifikanter cAMP-Anstieg nach 10 min. Insgesamt betrachtet waren die Signale auf cAMP-Ebene eher unspezifisch und die Bedeutung der bei den Kiemen beobachteten Effekte bleibt noch unklar. Es ist denkbar, dass cAMP-Signale, wenn vorhanden, sehr kurz sind und sich bei den gewählten *in vivo* Versuchsbedingungen, die eine gewisse Zeit für die Präparation der Organe erforderten, einem Nachweis entziehen.

Dagegen kommt dem cGMP offensichtlich eine wichtige Bedeutung als second messenger bei der CHH-Wirkung in den untersuchten Organen zu. Dies wurde auch schon von Sedlmeier und Keller (1981) postuliert, die nach CHH-Injektion signifikante Anstiege der cGMP-Gehalte in verschiedenen Geweben und eine stärkere Erhöhung der *in vitro* Glucose-Freisetzung aus dem Hepatopankreas durch cGMP im Vergleich zu cAMP fanden. Allerdings fanden sie nach CHH-Injektion auch auf cAMP-Ebene signifikante, wenn auch weniger deutliche Erhöhungen bei Herz, Hepatopankreas und Schwanzmuskel. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde bei diesen Studien jedoch gelelektrophoretisch gereinigtes, nicht eindeutig isoliertes und quantifiziertes CHH eingesetzt. Vermutlich handelte es sich dabei sogar um ein Gemisch beider CHH-Isoformen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Bedeutung des cGMP bei der Vermittlung der CHH-Wirkung wird durch weitere Studien unterstützt. So fanden Spindler et al. (1976), dass cGMP *in vivo* mit höherer Effektivität eine Hyperglykämie hervorrief als cAMP. Zudem entdeckten Goy et al. (1987) bei *Homarus americanus* einen später der CHH-Subfamilie zugeordneten Faktor (Pavloff und Goy, 1990), der die cGMP-Gehalte in Schreitbeinmuskel, Hepatopankreas, Hoden, Darm, Herz und Nervengewebe erhöhte. Hinsichtlich Antennendrüse bzw. Kiemen bewirkten Sinusdrüsenextrakte bei *Procambarus clarkii* bzw. *Callinectes sapidus in vitro* einen Anstieg der cGMP-Gehalte (Kamemoto und Oyama, 1985).

Die *in vitro* Inkubation von Y-Organen mit 50 nM L-Phe<sup>3</sup>-CHH im Rahmen dieser Arbeit führte zu hochsignifikanten Erhöhungen der cGMP-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollorganen. Damit wurde auch für das Y-Organ mit gereinigtem und genau quantifiziertem Hormon der Nachweis erbracht, dass cGMP an der Vermittlung der Wirkung der L-Phe<sup>3</sup>-Isoform von CHH beteiligt ist. Des Weiteren wäre es interessant, den Einfluss der D-Phe<sup>3</sup>-Isoform auf die Y-Organen zu untersuchen, um denkbare Wirkungsunterschiede der CHH-Isoformen aufzuklären. Zur Ermittlung von Zeitverläufen des cGMP-Signals beider CHH-Isoformen wäre es wichtig, ein *in vivo*-Versuchsmodell zu entwickeln, da die *in vitro* Inkubationen dahingehend keine genauen Aussagen erlauben und zudem den Einsatz größerer Hormonmengen erfordern. Eine Vermittlung der CHH-Wirkung durch cGMP wurde *in vitro* auch bei Y-Organen von *Carcinus maenas* nachgewiesen (Dirksen et al., 2001). Die Inkubation der Y-Organen mit 50 nM CHH führte zu einer Steigerung der cGMP-Gehalte um das 3-6fache. Dieser Effekt war korreliert mit einer inhibitorischen Wirkung auf die Ecdysteroidsynthese in den Y-Organen. Ähnliche inhibitorische Effekte des CHH *in vitro* ergaben sich bei *Procambarus clarkii* (Yasuda et al., 1994) und *Carcinus maenas* (Webster

und Keller, 1986). Bei *Orconectes limosus* konnte ebenfalls eine Inhibierung der Ecdysteroidsynthese *in vitro* nach *in vivo*-Injektion von CHH nachgewiesen werden (Keller et al., 1999). Hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung auf die Ecdysteroidsynthese in den Y-Organen waren die D-Phe<sup>3</sup>-Isoformen von CHH bei beiden Flusskrebsarten deutlich wirksamer als die L-Phe<sup>3</sup>-Isoformen. Aufgrund der beschriebenen Befunde und der vorliegenden Daten auf cGMP-Ebene ist eine Vermittlung der MIH-ähnlichen Wirkung des CHH bei Y-Organen über cGMP als second messenger sehr wahrscheinlich. Da die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform des CHH bei manchen Flusskrebsen offensichtlich wirksamer ist als die L-Phe<sup>3</sup>-Isoform wäre eine vergleichende Untersuchung beider Isoformen besonders erstrebenswert. Dabei sollten auch Tiere in verschiedenen Häutungsstadien untersucht werden, da bei *Carcinus maenas* eine Reduktion der biologischen Aktivität des CHH in der Vorhäutungsphase nachgewiesen wurde, die sich auch auf cGMP-Ebene nachweisen ließ (Chung und Webster, 2003).

Über die Bedeutung des durch CHH induzierten cGMP-Signals und entsprechende biologische Wirkungen in den verschiedenen Organen der *in vivo* Injektionsversuche existieren bislang nur sehr begrenzte Informationen. Für die Zielorgane Schwanzmuskel und Mitteldarmdrüse konnte hinsichtlich der biologischen Wirkung des CHHs ein direkter Zusammenhang mit der Mobilisierung von Glucose durch Aktivierung des Glykogenabbaus hergestellt werden. So wurden beim Schwanzmuskel am Glykogenstoffwechsel beteiligte Enzyme nach CHH-Injektion untersucht. Es ergab sich eine inhibierende Wirkung des CHH auf die Glykogensynthese von *Orconectes limosus* (Sedlmeier, 1982). Zudem konnte der Nachweis von Glykogenabbau und Hyperglykämie infolge von Sinusdrüsenextrakt-Injektion erbracht werden (Keller und Andrew, 1973). Beim Hepatopankreas zeigten Sedlmeier und Keller (1981) *in vitro* einen Anstieg zyklischer Nukleotide nach Inkubation mit CHH, welcher mit der Freisetzung von Glucose ins Inkubationsmedium gepaart war.

Eine derartig klare Zuordnung der Hormonwirkung zu einer biologischen Funktion ließ sich für die übrigen untersuchten Organe bislang nicht nachweisen. Vermutlich werden durch den Anstieg von cGMP eine Vielzahl von Enzymsystemen aktiviert, die in Abhängigkeit vom Gewebe zu anderen Hormonwirkungen als Hyperglykämie führen oder unter Umständen verschiedene Mechanismen in einem Gewebe gleichzeitig aktivieren. Dies zeigte sich erstmals am Beispiel des Hepatopankreas, wo neben der Aktivierung des Glykogenabbaus mit nachfolgender Hyperglykämie eine Sekretion von Amylase unter CHH-Einfluss nachgewiesen werden konnte (Sedlmeier, 1988). Vielleicht steht dieses Phänomen in Zusammenhang mit der Existenz verschiedener CHH-Isoformen bei einer Spezies.

Hinsichtlich der CHH-Wirkung auf die Antennendrüse lässt sich über eine Beteiligung an der Regulation des Wasser- und Ionenhaushaltes durch bisher unbekannte Mechanismen spekulieren. Unter Einfluss von Sinusdrüsenextrakt wurden die Wasser- und Salzkonzentrationen in Blut und Urin und zudem die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase in der Antennendrüse beeinflusst (Kamemoto und Tullis, 1972; Kamemoto, 1976).

Für eine osmoregulatorische Funktion des CHH in den Kiemen gibt es Hinweise. So führte D-Phe<sup>3</sup>-CHH bei *Homarus americanus* unter Bedingungen reduzierter Salinität zu einer Hyperosmoregulation (Charmantier-Daures et al., 1994). Bei der Krabbe *Pachygrapsus marmoratus* resultierte die Injektion von CHH in einer direkten Beeinflussung des Ionentransportes in den Kiemen in Form eines erhöhten Natrium-Einstroms (Spanings-Pierrot et al., 2000). Untersuchungen an *Astacus leptodactylus* ergaben eine erhöhte Osmolalität der Hämolymphe und erhöhte Natrium-Konzentrationen nach Injektion von D-Phe<sup>3</sup>-CHH, wohingegen das L-Phe<sup>3</sup>-CHH keine Veränderung der Osmolalität bewirkte und die Natrium-Konzentrationen im Verhältnis schwächer erhöhte (Serrano et al., 2003). Der Wirkungsmechanismus des CHH bei der Osmoregulation ist bislang jedoch noch ungeklärt. Denkbar wäre eine Beeinflussung der Natrium-Kalium-ATPase, da bei *Pachygrapsus marmoratus* die Aktivität dieses Enzyms unter Einfluss von Sinusdrüsenextrakt um 54 % anstieg (Eckhardt et al., 1995). Alternativ hierzu könnte CHH durch Steigerung der Glykolyserate die Verfügbarkeit von Energiequellen für die Ionenpumpen erhöhen (Spanings-Pierrot et al., 2000). Vielleicht muss man beim Kiemengewebe ebenfalls über mehrere biologische Funktionen des CHH nachdenken, die über cGMP als second messenger vermittelt werden. Dies könnte an die Existenz der beiden CHH-Isoformen gekoppelt sein, da für die D-Phe<sup>3</sup>-Isoform oftmals osmoregulatorische Fähigkeiten nachgewiesen wurden. Für die L-Phe<sup>3</sup>-Isoform wurden eine derartige Funktion nur in abgeschwächter Form nachgewiesen. Möglicherweise kommt dem L-Phe<sup>3</sup>-CHH im Kiemengewebe die Aufgabe der Bereitstellung von Energiereserven zu.

Dem cGMP-Anstieg im Herz nach CHH-Injektion könnte eine Bedeutung hinsichtlich der Beeinflussung der Herzschlagfrequenz zugeordnet werden. So gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von cGMP bei der Steuerung der Muskelkontraktion (Beam et al., 1977). Untersuchungen an *Procambarus clarkii* ergaben eine erhöhte Herzschlagfrequenz unter Einfluss eines unvollständig charakterisierten Peptides, bei dem es sich wahrscheinlich um CHH handelte (Yazawa et al., 1999) und dass zudem eine membrangebundene Guanylat-Zyklase aktivierte. Hinweise auf einen Zusammenhang des Anstiegs an cGMP mit der Aktivierung der Glykogenolyse ergaben sich aus *in vitro* Inkubationen von intakten Herzen

mit L-Phe<sup>3</sup>-CHH im Rahmen dieser Arbeit. Dabei konnte im Vergleich zu Inkubationen in Saline oftmals eine erhöhte Freisetzung von Glucose ins Inkubationsmedium beobachtet werden. Dieser Effekt ließ sich auch durch Inkubation mit zyklischen Nukleotiden (Dibutyryl-cAMP und 8-Bromo-cGMP) simulieren. Aufgrund der individuellen Schwankungen waren die Versuchsergebnisse jedoch noch nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollinkubationen mit Saline. Möglicherweise stehen auch beim Herzen von *Orconectes limosus* verschiedene biologische Funktionen in Zusammenhang mit der Existenz zweier CHH-Formen.

Die physiologischen Effekte des CHH auf Gehirn und Abdominalganglien sind bislang noch weitgehend unklar. Interessant im Hinblick auf das Nervengewebe ist jedoch, dass im stomatogastrischen Nervensystem von *Cancer productus* die Bildung von cGMP über zwei verschiedene Signaltransduktionswege induziert wurde. Dabei schien die Aktivierung der cytoplasmatischen Guanylat-Zyklase über Stickstoffmonoxid ausschließlich auf das Nervengewebe beschränkt zu sein, wohingegen die Aktivierung der membrangebundenen Guanylat-Zyklase durch Sinusdrüsenextrakt auch in anderen Geweben verbreitet war (Scholz et al., 1996).

In Bezug auf die CHH-Rezeptoren fanden sich in den bislang durchgeführten Studien fast ausschließlich Hinweise auf eine Beteiligung membrangebundener Guanylat-Zyklasten an der Vermittlung der CHH-Wirkung. Studien von Sedlmeier (1985) ergaben, dass etwa 90 % der Guanylat-Zyklase im Schwanzmuskel von *Orconectes limosus* in membrangebundener Form vorliegen. Auch beim Schwanzmuskel von *Homarus americanus* stimulierte CHH die Zyklase-Aktivität in Membranfraktionen. Eine Aktivierung der cytoplasmatischen Guanylat-Zyklase wurde nicht nachgewiesen, konnte allerdings auch nicht ausgeschlossen werden (Goy, 1990). Durch die Klonierung einer cDNA, die eine membrangebundene Guanylat-Zyklase aus dem Schwanzmuskel von *Procambarus clarkii* codiert, ergaben sich erstmals indirekte Hinweise darauf, dass es sich bei dem CHH-Rezeptor um eine membrangebundene Guanylat-Zyklase handeln könnte. Das entsprechende Transkript (PcGC-M2) wurde in zahlreichen Geweben (Schwanzmuskel, Hepatopankreas, Herz, Ovarien, Hoden, Kiemen) exprimiert, die einen cGMP-Effekt durch CHH zeigen und/oder CHH spezifisch binden (Liu et al., 2004). Damit wird die These unterstützt, dass PcGC-M2 am CHH-Wirkungsmechanismus beteiligt ist. Inzwischen ist eine Vielzahl an membrangebundenen Guanylat-Zyklasten bei Invertebraten bekannt (verschiedene Insekten, *Caenorhabditis elegans*), die offensichtlich durch die Bindung eines extrazellulären Liganden aktiviert

werden (Lucas et al., 2000). Ob PcGC-M2 von *Procambarus clarkii* aber tatsächlich durch Bindung von CHH aktiviert wird, ist bislang noch nicht bekannt. Auch hinsichtlich anderer möglicher Liganden besteht bisher noch keine Vorstellung.

Die Aktivierung einer membrangebundenen Guanylat-Zyklase durch Bindung von Liganden ist in Zusammenhang mit dem multifunktionalen Charakter von CHH, der Existenz von CHH-Isoformen, sowie deren unterschiedlicher Wirksamkeit besonders interessant. Möglicherweise werden in Abhängigkeit von der am Rezeptor gebundenen CHH-Isoform, bzw. generell durch CHH-Bindung unterschiedliche Enzymsysteme aktiviert, was zu vielfältigen physiologischen Funktionen führt. Eine Aufklärung der CHH-Rezeptorstruktur wäre daher für auf das Verständnis der CHH-Wirkung von besonderer Bedeutung. Bei bekanntem Rezeptor könnte man mit Hilfe von Bindungsstudien entscheidende Informationen über die Rezeptorbindungseigenschaften der CHH-Isoformen, ihren Wirkungsmechanismus sowie ihre biologische Funktion gewinnen. In diesem Zusammenhang wäre es weiterhin hilfreich zu sehen, ob die zellulären Antworten auf cGMP-Ebene nach Injektion verschiedener CHH-Formen einer Spezies mit unterschiedlichen biologischen Funktionen einhergehen oder ob es lediglich Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit der CHH-Isoformen gibt. Mit der vorliegenden Arbeit konnte für *Astacus astacus* der Beweis erbracht werden, dass beide CHH-Isoformen auf dieselben Zielorgane wirken, wobei die CHH-Wirkung durch cGMP vermittelt wird. Nach den bislang vorliegenden Studien dürfte dabei die Aktivierung einer membrangebundenen Guanylat-Zyklase eine entscheidende Rolle spielen. Dem cAMP kommt vermutlich nur eine untergeordnete Rolle zu, da in den Geweben keine eindeutigen Effekte nach Injektion von CHH nachgewiesen werden konnten. Aufgrund von erheblichen individuellen Schwankungen war die Ermittlung genauer Zeitverläufe nicht möglich. Da beide Isoformen des CHH offensichtlich sowohl an die gleichen Zielorgane binden als auch über cGMP als second messenger wirken, stellt sich für die Zukunft die entscheidende Frage, ob oder inwiefern sich ihre biologischen Wirkungen unterscheiden. Durch Identifizierung der Rezeptorstruktur und der durch CHH-Bindung aktivierten Enzymsysteme könnte die biologische Bedeutung der Existenz von CHH-Isoformen aufgeklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

- 1) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das CHH (crustacean hyperglycemic hormone) einer europäischen Flusskrebbsart, *Astacus astacus* (Familie Astacidae), isoliert und mittels Massenspektrometrie, Edman-Abbau und Aminosäureanalyse vollständig sequenziert. Es handelt sich um ein 72 Aminosäuren langes Peptid der Masse 8384,18 Da, das in zwei posttranslationalen Isoformen existiert: L- und D-Phe<sup>3</sup>-CHH. Die Isomerisierung des Phe<sup>3</sup>-Restes scheint genau reguliert zu sein, da die Isoformen immer in einem konstanten Verhältnis von 25 % D-CHH zu 75 % L-CHH nachgewiesen werden konnten. Der C-Terminus beider Isoformen ist amidiert, der N-Terminus ist durch eine Pyroglutamy-Gruppe blockiert. Hinweise auf die Existenz geringer Mengen von Gln<sup>1</sup>-Isoformen beider Isomere in der Sinusdrüse lassen auf unvollständige N-terminale Zyklisierung schließen. Hinsichtlich der Aminosäuresequenz zeigt das CHH von *Astacus astacus* große Sequenzidentität (> 95 %) mit den bekannten CHHs der amerikanischen Flusskrebse (Cambaridae), die ebenfalls nur eine genetische Variante besitzen. Ein Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der CHHs von *Homarus americanus* und dem australischen Flusskrebs *Cherax destructor* zeigt größere Sequenzunterschiede. Offensichtlich sind die CHHs der Flusskrebse der nördlichen Hemisphäre stark konserviert.
- 2) Injektion von CHH resultierte bei *Astacus astacus* in einem ausgeprägten, dosisabhängigen hyperglykämischen Effekt. Die niedrigste Dosis von 6,25 pmol/Tier (~ 100 g Lebendgewicht) ergab eine signifikante Steigerung 1 h nach Injektion, mit weiterem signifikantem Anstieg nach 2 h. Dies dokumentiert die hohe Wirksamkeit des CHH, die im Hinblick auf seine kurze Halbwertszeit in der Hämolymphe besonders bemerkenswert ist.
- 3) Zur Bestimmung der CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus astacus* wurde ein ELISA mit Antiserum gegen *Orconectes limosus*-CHH verwendet. Die Kreuzreaktivität des *Astacus astacus*-CHH in diesem ELISA wurde mit ca. 50 % bestimmt. Damit war es möglich, mit *Astacus astacus*-CHH als Standardsubstanz einen gut reproduzierbaren ELISA mit ausreichend hoher Sensitivität zu etablieren, der eine

zuverlässige Messung physiologischer CHH-Konzentrationen in der Hämolymphe erlaubt.

- 4) Die Experimente zur Bestimmung der *in vivo* Halbwertszeit von CHH ergaben eine durchschnittliche Halbwertszeit von 1,5-2 min. Offensichtlich wird CHH besonders schnell aus dem Hämolymphekreislauf eliminiert, sei es durch spezifische Bindung an Gewebe oder enzymatische Degradation, worüber der verwendete Versuchsansatz allerdings keine Aussage erlaubt.
- 5) Bei *Astacus astacus* konnte ein negativer Feedback-Effekt von injizierter Glucose auf die CHH-Sekretion aus der Sinusdrüse nachgewiesen werden, der sich innerhalb von 10-20 min nach Glucose-Injektion bemerkbar machte. Dies unterstützt die Annahme, dass die CHH-Zellen des X-Organ direkt als Sensoren für die Hämolymphe-Glucose funktionieren und dass Glucose über einen noch unbekanntem Mechanismus die CHH-Sekretion dieser Zellen reguliert. Zusammen mit Befunden anderer Autoren, die mit anderer Methodik erhoben wurden, unterstützt dieser Befund die Bedeutung dieses einfachen negativen Feedback-Effektes als allgemein verbreitetem Mechanismus der Regulation der Glucose-Homöostase bei Dekapoden.
- 6) Es wurde untersucht, ob die stets messbaren, basalen CHH-Titer in der Hämolymphe von *Astacus astacus* für die Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase von Bedeutung sind. Zu diesem Zweck sollte durch Injektion von Antiserum das endogene CHH neutralisiert und der Effekt auf den Glucose-Titer untersucht werden. Bei *Astacus astacus* war die erwartete Absenkung des Glucose-Titers durch die entgegenwirkende Stress-Hyperglykämie nicht direkt nachweisbar. Jedoch war die Injektionsstress-bedingte Hyperglykämie bei Injektion von Antiserum (im Vergleich zu Normalserum und Saline) signifikant abgeschwächt. Dies beweist eine zumindest teilweise Neutralisation des endogenen zirkulierenden CHH und gibt damit einen indirekten Hinweis auf eine regulatorische Rolle des normalen CHH-Titers für die Glucose-Homöostase. Ergänzende Untersuchungen am amerikanischen Flusskrebs *Orconectes limosus* ergaben vergleichbare Ergebnisse.

- 7) Die funktionelle Bedeutung des CHH bei der Anpassung des Stoffwechsels von *Astacus astacus* an hypoxische Umweltbedingungen wurde in zwei Hypoxie-Situationen untersucht.

Die Haltung der Tiere in wassergesättigter Luft (extreme Hypoxie) lieferte keinen Hinweis auf eine Beteiligung von CHH bei der Stoffwechseladaption. Sowohl bei intakten als auch bei augenstiellosen Tieren stiegen die Laktat-Titer in der Hämolymphe drastisch, d. h. um den Faktor 30-45, an. Die Maximalwerte waren bei beiden Gruppen gleich. Die Injektion von CHH bei augenstiellosen Tieren zeigte keinen weiteren steigenden Effekt auf die Laktatbildung.

Die Experimente bei partieller Hypoxie (50 % O<sub>2</sub>-Sättigung des Haltungswassers) ergaben eindeutig eine Beteiligung von CHH bei der Stoffwechseladaption. Diese Hypoxie führte bei intakten Tieren zu einem Anstieg des CHH in der Hämolymphe. Ein deutlicher Anstieg der Laktat-Titer, der geringer (ca. 8fach) war als bei extremer Hypoxie, konnte ebenfalls nur bei intakten Tieren nachgewiesen werden. Bei augenstiellosen Tieren war keine Laktatakkumulation in der Hämolymphe nachweisbar, was jedoch durch die Injektion von CHH kompensiert werden konnte. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Hypoxie-induzierte Sekretion von CHH durch Mobilisation von Glucose für die Adaption der Tiere an einen teilweise anaeroben Stoffwechsel von Bedeutung ist.

- 8) Studien an Häutungstieren wiesen eine natürlich auftretende, physiologische Hypoxie während des Häutungsprozesses, messbar durch eine starke Laktatakkumulation in der Hämolymphe, nach. Der Anstieg der Laktat-Titer (ca. 45-50fach) war mit den Befunden bei extremer Hypoxie vergleichbar. Der Laktat-Titer war von der späten Ecdysisphase bis etwa 0,5 h nach Ende der Ecdysis erhöht und wurde schnell, meist innerhalb von 2 h, wieder nahezu auf Normalwerte abgebaut. Die Hämolymphe-CHH-Messungen ergaben einen dramatischen, kurzzeitigen Peak kurz vor bzw. mit Beginn der Ecdysis. Die Maximalwerte betragen 460-510 fmol/100 µl (basale Werte: 1,5-4,5 fmol/100µl). Zum Vergleich: Die höchsten Werte, die unter anderen Stressbedingungen gemessen wurden, gingen nie über 9-10 fmol/100 µl hinaus. Innerhalb von 30-60 min nach Ende der Ecdysis fielen die CHH-Titer in der Hämolymphe stark ab und näherten sich im Laufe der folgenden Stunden wieder langsam den Normalwerten, die spätestens nach 20 h erreicht wurden. Die Hämolymphe-Glucose-Titer zeigten etwa 30 min nach Vollendung der Ecdysis wesentlich geringere Anstiege als aufgrund der extrem hohen CHH-Titer zu

erwarten gewesen wäre. Aufgrund der physiologischen Befunde erscheint eine Beteiligung des CHH bei der Stoffwechseladaptation an die natürliche Hypoxie während der Häutung unwahrscheinlich, und das CHH-Signal während der Ecdysis ist als Hinweis auf eine weitere biologische Funktion des CHH zu werten.

- 9) Injektion von reinem CHH (5-50 pmol/Tier, 15-18 g Lebendgewicht) führte zu signifikanten Erhöhungen der cGMP-Gehalte in Gehirn, Antennendrüse, Kiemen, Herz und Schwanzmuskel, die damit eindeutig als Zielorgane von CHH identifiziert wurden. Dieser Effekt war in der Regel 2-5 min nach Injektion nachweisbar und dauerte bis zu 10-20 min an. Deutliche, wenngleich statistisch nicht signifikante Befunde wiesen auch auf Hepatopankreas und Abdominalganglien als Zielorgane hin. Es wurden beide CHH Isoformen (L-, D-Phe<sup>3</sup>CHH) vergleichend untersucht. Statistisch signifikante Hinweise auf unterschiedliche Wirkungen der CHH-Isoformen ergaben sich nicht. Eine Beteiligung von cAMP an der CHH-Wirkung konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Abramowitz, A. A., Hisaw, F. L., Papandrea, D. N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. *Biol. Bull.* 86, 1-5.

Aguilar, M. B., Soyez, D., Falchetto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Huberman, A. (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Presence of a D-amino acid. *Peptides* 16, 1375-1383.

Aguilar, M. B., Falchetto, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Huberman, A. (1996). Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides* 17, 367-374.

Audsley, N., McIntosh, C., Phillips, J. E., Schooley, D. A., Coast, G. M. (1994). Neuropeptide regulation of ion and fluid reabsorption in the insect excretory system. In: K. G. Davey, R. E. Peter, S. S. Tobe (eds.), *Perspectives in comparative endocrinology*, pp. 74-80, National Research Council of Kanada, Ottawa.

Beam, K. G., Nestler, E. J., Greengard, P. (1977). Increased cyclic GMP levels associated with contraction in muscle fibers of the giant barnacle. *Nature* 267, 534-536.

Böcking, D., Dirksen, H., Keller, R. (2002). The Crustacean Neuropeptides of the CHH/MIH/GIH Family: Structures and Biological Activities. In: K. Wiese (ed.), *The Crustacean Nervous System*, pp. 84-97, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Bulau, P., Reichwein, B., Keller, R. (2002). The Eyestalk-Androgenic Gland-Testis Axis in Decapods: Demonstration, in *Cherax destructor*, that Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) is the Inhibitory Eyestalk Factor. In: R. Keller, H. Dirksen, D. Sedlmeier, H. Vaudry (eds.), *European Comparative Endocrinologists*, pp. 389-392, International Proceedings Division.

Bulau, P. (2003). Identifizierung und massenspektrometrische Strukturaufklärung des Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) von *Cherax destructor* als das für die Hemmung der Androgenen Drüse verantwortliche Hormon der Sinusdrüse. Dissertation, Universität Bonn.

Bulau, P., Meisen, I., Reichwein-Roderburg, B., Peter-Katalinić, J., Keller, R. (2003). Two genetic variants of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the Australian crayfish, *Cherax destructor*: detection of chiral isoforms due to posttranslational modification. *Peptides* 24, 1871-1879.

Chang, E. S., Keller, R., Chang, S. A. (1998). Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 359-366.

Chang, E. S., Chang, S. A., Beltz, B. S., Kravitz, E. A. (1999). Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J. Comp. Neurol.* 414, 50-56.

Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K. P., Aiken, D. E., Van Herp, F. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 281-293.

Christ, B. (1984). Untersuchungen zur Charakterisierung und zur hormonalen Regulation von cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen des Flusskrebse, *Orconectes limosus*. Dissertation, Universität Bonn.

Chung, J. S., Webster, S. G. (1996). Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic neuropeptides?. *Eur. J. Biochem.* 240, 358-364.

Chung, J. S., Wilkinson, M. C., Webster, S. G. (1998). Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regul. Pept.* 77, 17-24.

- Chung, J. S., Dircksen, H., Webster, S. G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13103-13107.
- Chung, J. S., Webster, S. G. (1999). Neuropeptide-degrading enzymes in crabs. Abstract, Soc. Exp. Biol. Meeting, Edingburgh, p. 59.
- Chung, J. S., Webster, S. G. (2003). Moults cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. From target to transcript. *Eur. J. Biochem.* 270, 3280-3288.
- Dean, J. M., Vernberg, F. J. (1965). Effects of temperature acclimation on some aspects of carbohydrate metabolism in decapod crustaceans. *Biol. Bull.* 129, 87-94.
- De Kleijn, D. P., Linck, B., Klein, J. M., Weidemann, W. M., Keller, R., Van Herp, F. (1993). Structure and localization of mRNA encoding a pigment dispersing hormone (PDH) in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *FEBS Lett.* 321, 251-255.
- De Kleijn, D. P., Janssen, K. P., Martens, G. J., Van Herp, F. (1994a). Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 224, 623-629.
- De Kleijn, D. P., Sleutels, F. J., Martens, G. J., Van Herp, F. (1994b). Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Lett.* 353, 255-258.
- De Kleijn, D. P., De Leeuw, E. P., Van den Berg, M. C., Martens, G. J., Van Herp, F. (1995). Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1260, 62-66.
- Dieberg, G., Sedlmeier, D. (1984). Properties of crayfish abdominal muscle adenylate cyclase. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 687-691.

Dirksen, H., Heyn, U. (1998). Crustacean hyperglycemic hormone-like peptides in crab and locust peripheral intrinsic neurosecretory cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 839, 392-394.

Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Daufeldt, S., Baggerman, G., Verhaert, P., Chung, J. S., Soyez, D., Plösch, T., Jaros, P. P., Webster, S. G. (2000). Crustacean hyperglycaemic hormone-like peptides in similar peripheral and central neurosecretory cells of crustaceans and insects as spliced products of multiple genes. *Zoology 103 Suppl. III*, p. 81.

Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J. S., Baggerman, G., Verhaert, P., Daufeldt, S., Plösch, T., Jaros, P. P., Waelkens, E., Keller, R., Webster, S. G. (2001). Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* 356, 159-170.

Drach, P. (1939). Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés décapodes. *Ann. Inst. Océanogr. Paris (Monaco)* 19, 103-391.

Eckhardt, E., Pierrot, C., Thuet, P., Van Herp, F., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.-P., Charmantier, G. (1995). Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 169-177.

Endo, H., Nagasawa, H., Watanabe, T. (2000). Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 355-361.

Fernlund, P., Josefsson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: Amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* 177, 173-174.

Fernlund, P. (1976). Structure of a light-adapting hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 439, 17-25.

Gäde, G. (1984). Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A, 495-502.

- Gasparini, S., Kiyatkin, N., Drevet, P., Boulain, J.-C., Tacnet, F., Ripoche, P., Forest, E., Grishin, E., Menez, A. (1994). The low molecular weight protein which co-purifies with  $\alpha$ -latrotoxin is structurally related to crustacean hyperglycemic hormones. *J. Biol. Chem.* 269, 19803-19809.
- Glowik, R. M., Golowasch, J., Keller, R., Marder, E. (1997). D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J. Exp. Biol.* 200, 1421-1431.
- Goy, M. F., Mandelbrot, D. A., York, C. M. (1987). Identification and characterization of a polypeptide from a lobster neurosecretory gland that induces cyclic GMP accumulation in lobster neuromuscular preparations. *J. Neurochem.* 48, 954-966.
- Goy, M. F. (1990). Activation of membrane guanylate cyclase by an invertebrate peptide hormone. *J. Biol. Chem.* 265, 20220-20227.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P., Cazzamali, G. (2002). The Orphan Receptor Strategy in *Drosophila*: Cloning of Novel Receptors and Their Ligands. In: R. Keller, H. Dircksen, D. Sedlmeier, H. Vaudry (eds.), *European Comparative Endocrinologists*, pp. 7-9, International Proceedings Division.
- Gu, P. L., Chan, S. M. (1998). The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Lett.* 441, 397-403.
- Gu, P. L., Yu, K. L., Chan, S. M. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett.* 472, 122-128.
- Hamann, A. (1974). Die neuroendokrine Steuerung tagesrhythmischer Blutzuckerschwankungen durch die Sinusdrüse beim Flusskrebs. *J. Comp. Physiol.* 89, 197-214.
- Hergenhahn, H. G., Kegel, G., Sedlmeier, D. (1984). Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in crayfish abdominal muscle. Evidence for a calmodulin lacking trimethyllysine. *Biochim. Biophys. Acta.* 787, 196-203.

Huberman, A., Aguilar, M. B., Brew, K., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (1993). Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides* 14, 7-16.

Jaros, P. P. (1990). Enkephalins, biological active neuropeptides in invertebrate, with special reference to crustaceans. In: K. Wiese, W.-D. Krenz, J. Tautz, H. Reichert, B. Mulloney (eds.), *Frontiers in Crustacean Neurobiology*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Kallen, J. L., Abrahamse, S. L., Van Herp, F. (1990). Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *Biol. Bull.* 179, 351-357.

Kamemoto, F. I., Tullis, R. E. (1972). Hydromineral regulation in decapod crustacea. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 299-307.

Kamemoto, F. I. (1976). Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod crustacea. *Am. Zool.* 16, 141-150.

Kamemoto, F. I., Oyama, S. N. (1985). Neuroendocrine influence on effector tissues of hydromineral balance in crustaceans. In: B. Lofts, W. N. Holmes (eds.), *Current Trends in Comparative Endocrinology*, pp. 883-886, Hong Kong University Press, Hong Kong.

Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinić, J., Keller, R. (1989). Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenes*. *FEBS Lett.* 255, 10-14.

Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C. P., Keller, R. (1991). Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. *Peptides* 12, 909-913.

Keller, R., Beyer, J. (1968). Zur hyperglykämischen Wirkung von Serotonin und Augensteinextrakt beim Flusskrebs *Orconectes limosus*. *Zeitsch. Vergl. Physiol.* 59, 78-85.

- Keller, R., Andrew, E. M. (1973). The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20, 572-578.
- Keller, R. (1974). Stoffwechselregulation durch Neurohormone bei Crustaceen. *Fortschritte Zool.* 22, 34-54.
- Keller, R., Schmid, E. (1979). *In vitro* secretion of ecdysteroids by Y-Organs and lack of secretion by mandibular organs of the crayfish following molt induction. *J. Comp. Physiol.* 130, 347-353.
- Keller, R., Jaros, P. P., Kegel, G. (1985). Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Amer. Zool.* 25, 207-221.
- Keller, R., Sedlmeier, D. (1988). A metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In: H. Laufer, F. G. H. Downer (eds.), *Endocrinology of selected invertebrate types*, pp. 315-326, Alan R. Liss Inc., New York.
- Keller, R., Orth, H.-P. (1990). Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: A. Epple, C. G. Scanes, M. H. Stetson (eds.), *Progress in Comparative Endocrinology*, pp. 265-271, Wiley-Liss Inc., New York.
- Keller, R. (1992). Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439-448.
- Keller, R., Haylett, B., Cooke, I. (1994). Neurosecretion of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline  $K^+$  concentration quantified by a sensitive immunoassay method. *J. Exp. Biol.* 188, 293-316.
- Keller, R., Kegel, G., Reichwein, B., Sedlmeier, D., Soyeyz, D. (1999). Biological effects of neurohormones of the CHH/MIH/GIH peptide family in crustaceans. In: E.W. Roubos, S.E. Wendelaar Bonga, H. Vaudry, A. De Loof (eds.), *Recent developments in comparative endocrinology and neurobiology*, pp. 209-212, Shaker Publishing, Maastricht.

- Khayat, M., Yang, W., Aida, K., Nagasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B., Lubzens, E. (1998). Hyperglycaemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in *in vitro*-incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 307-318.
- Kleinholz, L. H., Kimball, F., McGarvey, M. (1967). Initial characterization and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. *Gen. Comp. Endocrinol.* 8, 75-81.
- Kleinholz, L. H., Keller, R. (1979). Endocrine regulation in Crustacea. In: E. J. W. Barrington (ed.), *Hormones and evolution* Vol. 1, 159-214, Academic Press, New York.
- Klein, J. M., Mangerich S., De Kleijn, D. P. V., Keller, R., Weidemann, W. M. (1993). Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Lett.* 334, 139-142.
- Klein, J. M., Mohrherr, C. J., Sleutels, F., Jaenecke, N., Riehm, J. P., Rao, K. R. (1995). A highly conserved red pigment-concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 151-158.
- Kreil, G. (1997). D-amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 337-345.
- Kummer, G., Keller, R. (1993). High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 14, 103-108.
- Lacombe, C., Grève, P., Martin, G. (1999). Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides* 33, 71-80.
- Laufer, H., Liu, L., Van Herp, F. (1994). A neuropeptide family that inhibits the mandibular organ of Crustacea and may regulate reproduction. In: A. B. Borkovec, M. J. Loeb (eds.), *Insect Neurochemistry and Neuropharmacology 1993*, pp. 203-206, CRC press, Boca Raton.

- Linck, B., Klein, J. M., Mangerich, S., Keller, R., Weidemann, W. M. (1993). Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 807-813.
- Liu, L., Laufer, H., Wang, Y., Hayes, T. (1997). A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 694-701.
- Liu, H.-F., Lai, C.-Y., Watson, R. D., Lee, C.-Y. (2004). Molecular cloning of a putative membrane form guanylyl cyclase from the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Zool.* 301A, 512-520.
- Lohr, J., Klein, J., Webster, S. G., Dircksen, H. (1993). Quantification, immunoaffinity purification and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 104, 699-706.
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52, 375-413.
- Lüschen, W., Willig, A., Jaros, P. P. (1993). The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 291-296.
- Macins, A., Meredith, J., Zhao, Y., Brock, H. W., Phillips, J. E. (1999). Occurrence of ion transport peptide (ITP) and ion transport-like peptide (ITP-L) in orthopteroids. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 40, 107-118.
- Meredith, J., Ring, M., Macins, A., Marschall, J., Cheng, N. N., Theilmann, D., Brock, H. W., Phillips, J. E. (1996). Locust ion transport peptide (ITP): primary structure, cDNA and expression in a baculovirus system. *J. Exp. Biol.* 199, 1053-1061.

- Ollivaux, C., Soyez, D. (2000). Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5106-5114.
- Pavarthy, K. (1972). Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustaceans. I. Effect of eyestalk removal in *Ocypode platytarsis*. *Mar. Biol.* 14, 58-62.
- Pavloff, M. S., Goy, M. F. (1990). Purification and chemical characterization of peptide G<sub>1</sub>, an invertebrate neuropeptide that stimulates cyclic GMP metabolism. *J. Neurochem.* 55, 788-797.
- Phlippen, M. K., Webster, S. G., Chung, J. S., Dircksen, H. (2000). Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. *J. Exp. Biol.* 203, 521-536.
- Ramamurthi, R., Mumbach, M. W., Scheer, B. T. (1968). Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 311-319.
- Riediger, W., Sedlmeier, D. (1985). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-regulated guanylate cyclase from the hepatopancreas of the crayfish *Orconectes limosus*. 13<sup>th</sup> Int. Congress Biochem. Abstractbook, Fr. 552.
- Riehle, M. A., Garczynski, S. F., Crim, J. W., Hill, C. A., Brown M. R. (2002). Neuropeptides and peptide hormones in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 172-175.
- Rothe, H., Lüschen, W., Asken, A., Willig, A., Jaros, P. P. (1991). Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C, 57-62.
- Salminen, I., Lindquist, O. V. (1975). Effect of temperature change on the blood glucose level in the crayfish *Astacus astacus* L. In: J. W. Avault (ed.), *Freshwater crayfish papers from the Second International Symposium on Freshwater crayfish*, pp. 203-209, Louisiana State University, Baton Rouge.

- Santos, E. A., Keller, R. (1993a). Effect of exposure to atmospheric air on the blood glucose and lactate concentrations on two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 343-347.
- Santos, E. A., Keller, R. (1993b). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *J. Comp. Physiol. B* 163, 374-379.
- Santos, E. A., Nery, L. E. M., Keller, R., Gonçalves, A. A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70, 415-420.
- Scaloni, A., Simmaco, M., Bossa F. (1991). Determination of the chirality of amino acid residues in the course of subtractive Edman degradation of peptides. *Anal. Biochem.* 197, 305-310.
- Scholz, N. L., Goy, M. F., Truman, J. W., Graubard, K. (1996). Nitric oxide and peptide neurohormones activate cGMP synthesis in the crab stomatogastric nervous system. *J. Neurosci.* 16, 1614-1622.
- Sedlmeier, D., Keller, R. (1981). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 82-90.
- Sedlmeier, D. (1982). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47, 426-432.
- Sedlmeier, D., Dieberg, G. (1983). Crayfish abdominal muscle adenylate cyclase. Studies on the stimulation by a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein. *Biochem. J.* 211, 319-322.
- Sedlmeier, D. (1985). Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Amer. Zool.* 25, 223-232.

Sedlmeier, D. (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regul. Pept.* 20, 91-98.

Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J. Exp. Biol.* 206, 979-988.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamid gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.

Smullen, R. P., David, J. A., Pitman, R. M. (1996). Endocrine regulation of the phosphatidylinositol pathway in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, and the shore crab, *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104, 84-91.

Soyez, D., Noël, P. Y., Van Deijnen, J. E., Marin, M., Morel, A., Payen, G. G. (1990). Neuropeptides from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus*: Characterization of hyperglycemic peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 261-274.

Soyez, D., Le Caer, J.-P., Noël, P. Y., Rossier, J. (1991). Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* 20, 25-32.

Soyez, D., Van Herp, F., Rossier, J., Le Caer, J.-P., Tensen, C. P., Lafont, R. (1994). Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *J. Biol. Chem.* 269, 18295-18298.

Soyez, D., Laverdure, A.-M., Kallen, J., Van Herp, F. (1998). Demonstration of a cell-specific isomerization of invertebrate neuropeptides. *Neuroscience* 82, 935-942.

Soyez, D., Toullec, J.-Y., Ollivaux, C., Géraud, D. (2000). L to D amino acid isomerization in a peptide hormone is a late post-translational event occurring in specialized neurosecretory cells. *J. Biol. Chem.* 275, 37870-37875.

- Soyez, D. (2003). Recent data on the Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. In: M. Fingerman, R. Nagabhushanam (eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, pp. 279-301, Science Publishers Inc., Enfield (NH), Plymouth.
- Spanings-Pierrot, C., Soyez, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 340-350.
- Spindler, K. D., Willig, A., Keller, R. (1976). Cyclic nucleotides and crustacean blood glucose levels. *Comp. Biochem. Physiol. A* 54, 301-304.
- Tarr, G. E. (1986a). In: J. E. Shively (ed.), *Methods of protein microcharacterization*, pp.162-163, Humana Press, Totowa, N.J., USA.
- Tarr, G. E. (1986b). In: J. E. Shively (ed.), *Methods of protein microcharacterization*, pp.170-175, Humana Press, Totowa, N.J., USA.
- Tensen, C. P., De Kleijn, D. P., Van Herp, F. (1991). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. *Eur. J. Biochem.* 200, 103-106.
- Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B., Panyim, S. (2000). Molecular cloning of a DNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244, 145-156.
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological saline for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34, 428-432.
- Van Herp, F., Kallen, J. L. (1991). Neuropeptides and neurotransmitters in the X-organ sinus gland complex, an important neuroendocrine integration center in the eyestalk of crustacea. In: E. Florey, G. B. Stefano (eds.), *Comparative aspects of neuropeptide function*, pp. 211-221, Manchester University Press, Manchester.

Van Herp, F. (1998). Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. In: G. M. Coast and S. G. Webster (eds.), *Recent Advances in Arthropod Endocrinology. Seminar Series: 65*, pp. 53-70, Cambridge University Press, Cambridge.

Wainwright, G., Webster, S. G., Wilkinson, M. C., Chung, J. S., Rees H. H. (1996). Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. Involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. *J. Biol. Chem.* 271, 12749-12754.

Webster, S. G., Keller, R. (1986). Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Comp. Physiol. B* 156, 617-624.

Webster, S. G. (1991). Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 244, 247-252.

Webster, S. G. (1993). High-affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 251, 53-59.

Webster, S. G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199, 1579-1585.

Webster, S. G., Chung, J. S. (1999). Roles of moult-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in controlling moulting in decapod crustaceans. In: E. W. Roubos, S. E. Wendelaar Bonga, H. Vaudry, A. De Loof (eds.), *Recent developments in comparative endocrinology and neurobiology*, pp. 213-216, Shaker Publishing, Maastricht.

Weidemann, W., Gromoll, J., Keller, R. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett.* 257, 31-34.

Yang, W. J., Aida, K., Nagasawa, H. (1997). Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides* 18, 479-485.

- 
- Yang, W. J., Aida, K., Nagasawa, H. (1999). Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 415-424.
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T., Naya, Y. (1994). Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 387-398.
- Yazawa, T., Ohoka, T., Kuwasawa, K., Aizawa, S., Isida, M., Ezure, T., Shibata, M. (1999). A CH-like peptide purified from the sinus gland of the crayfish enhances cardiac performance. *Comp. Biochem. Physiol.* 124A, p. 86.
- Zou, H.-S., Juan, C.-C., Chen, S.-C., Wang, H.-Y., Lee, C.-Y. (2003). Dopaminergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone and glucose levels in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Zool.* 298A, 44-52.

## Publikation wissenschaftlicher Arbeiten

Schmitz, T., Dircksen, H. (1999). Orcostatins, native allatostatin-like inhibitory neuropeptides of the crayfish *Orconectes limosus*: neuronal distribution and quantification in haemolymph. In: N. Elsner, U. Eysel (eds.), *Göttingen Neurobiology Report 1999*, p. 659, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Bulau, P., Meisen, I., Schmitz, T., Keller, R., Peter-Katalinić, J. (2004). Identification of neuropeptides from the sinus gland of the crayfish *Orconectes limosus* using nanoscale on-line liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 558-564.

Bulau, P., Okuno, A., Thome, E., Schmitz, T., Peter-Katalinić, J., Keller, R. (2005). Characterization of a molt-inhibiting hormone (MIH) of the crayfish, *Orconectes limosus*, by cDNA cloning and mass spectrometric analysis. *Peptides*, im Druck.

## **Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Keller selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Bonn, im September 2005