

Der Einfluß kompatibler Substanzen und Kryoprotektoren auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) der Arktis und Antarktis

The Effect of Compatible Solutes and Cryoprotectors on the Enzymes Malate Dehydrogenase (MDH) and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6P-DH) of *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) from Arctica and Antarctica

Katharina Kück

Katharina Kück
Universität Bremen
Fachbereich Biologie / Chemie
Meeresbotanik
D-28334 Bremen

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer Dissertation, die 1996 dem Fachbereich Biologie / Chemie der Universität Bremen vorgelegt wurde. Der Titel dieser Dissertation lautet:
Der Einfluß kompatibler Substanzen bei niedrigen Temperaturen auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) der polaren Regionen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	V
Summary	VII
1. Einleitung	1
1.1 Ziel und Fragestellung der Arbeit	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Untersuchungsobjekte und ihre Isolationsorte	9
2.2 Kultivierung	10
2.3 Extraktion	10
2.3.1 Herstellung von Rohextrakten	10
2.3.2 Fraktionierung des Rohextrakts	11
2.3.3 Bezugsgröße	12
2.4 Enzymtests	14
2.4.1 Malatdehydrogenase (MDH)	14
2.4.2 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	15
2.4.3 Pyruvat-Kinase (PK)	15
2.5 Charakterisierung der Enzyme	16
2.5.1 Aufnahme der Substratsättigungskurven	16
2.5.2 Aufnahme der pH-Wert-Kurven	16
2.5.3 Aufnahme der Temperaturkurven	17
2.6 Wirkung verschiedener Effektoren auf MDH und G6P-DH	18
2.6.1 Substratsättigungskurve bei -2°C	18
2.6.2 Konzentrationskurve bei -2°C und 30°C	18
2.7 Berechnung der V_{max} - und K_m -Werte	19
2.8 Berechnung der Aktivierungsenergie	20
2.9 Berechnung der Q_{10} -Werte	21
2.10 Gefrierschutzversuche	21
2.10.1 Enzymtest - Lactatdehydrogenase	21
2.10.2 Streßversuche	22
2.10.2.1 Proteingehalt	22

2.10.2.2	Zeitkurve	22
2.10.2.3	Gefrieren unter Zusatz von Effektoren	22
2.11	Wirkung der Temperatur und DMSP auf die LDH	23
2.12	Inhaltsstoffe	23
2.12.1	β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)	23
2.12.2	Prolin	24
2.12.3	Saccharose	25
2.12.4	Proteinbestimmung	25
2.12.5	Wachstum	25
2.13	DMSP-Synthese	25
2.14	Verhältnis von Molarität zu Osmolarität	26
3.	Ergebnisse	29
I. ENZYMATIK		
3.1	Charakterisierung der Enzyme MDH und G6P-DH	29
3.1.1	Einfluß der pH-Werte auf die Enzymaktivität	29
3.1.2	Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität	30
3.1.3	Interaktion von Temperatur und Substratkonzentration	37
3.1.4	Einfluß der Temperatur auf die K_m -Werte der MDH	38
3.1.5	Einfluß der Substratkonzentration auf die Q_{10} -Werte	40
3.2	Wirkung verschiedener Effektoren auf MDH und G6P-DH	41
3.2.1	Einfluß der Effektoren bei Unterkühlung (-2 °C)	41
3.2.2	Interaktion von Temperatur und Effektorkonzentration	47
3.3	Gefrierschutzversuche an der kältelabilen LDH	53
3.3.1	Selbststabilisierung	53
3.3.2	Gefrierdauer	54
3.3.3	Gefrierschutz	54
3.4	Wirkung von Temperatur und DMSP auf die LDH	57
II. PHYSIOLOGIE		
3.5	Prolin-, Saccharose- und DMSP-Gehalt in Abhängigkeit der Temperatur	59
3.6	Proteingehalt in Abhängigkeit der Temperatur	60

3.7	Wachstum bei Unterkühlung (-2 °C)	60
3.8	Temperatur und DMSP-Gehalt kalt-temperierter Isolate von <i>A. arctica</i>	61
4.	Diskussion	63
4.1	Einfluß der Temperatur auf MDH und G6P-DH	63
4.1.1	Aktivitäts- und Temperaturoptima	63
4.1.2	Aktivierungsenergie (apparente E_a)	66
4.1.3	Enzym-Substrat-Affinität (apparenter K_m)	69
4.1.4	Temperaturkoeffizient (Q_{10})	73
4.1.5	pH-Änderungen	75
4.1.6	Proteinkonzentration	76
4.1.7	Einfluß der Enzymeigenschaften bei der Adaptation	78
4.2	Schutzwirkung verschiedener Osmolyte auf Enzyme	79
4.2.1	Modelle zur Schutzwirkung von kompatiblen Substanzen	81
4.2.2	Schutzwirkung bei niedrigen Temperaturen	85
4.2.2.1	DMSP	85
4.2.2.2	Prolin	91
4.2.2.3	Saccharose	94
4.2.3	Gefrierschutz	97
4.2.4	Einfluß von DMSP, Prolin, Saccharose bei der Adaptation	102
5.	Schlußbetrachtung	104
6.	Literaturverzeichnis	109
	Danksagung	125
	Anhang :	126
Tab. I:	MDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur	126
Tab. II:	G6P-DH-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur	126
Tab. III:	LDH-Aktivität nach Gefrieren im flüssigem Stickstoff unter Zusatz anorganischer Salze	127
Tab. IV:	LDH-Aktivität nach Gefrieren im flüssigem Stickstoff unter Zusatz organischer Substanzen	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
DMS	Dimethylsulfid
DMSP	β -Dimethylsulfoniumpropionat
E_a	apparente Aktivierungsenergie
E-S-Affinität	Enzym-Substrat-Affinität
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
K_m	<i>Michaelis</i> -Konstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
min	Minute
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvat-Kinase
Q ₁₀	Temperaturkoeffizient
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
(S)	Substratkonzentration
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Verwendete Puffer:

Bis-Tris-Propan	1,3-Bis-Tris-[Hydroxymethyl]methylamino-Propan
CHES	2-[Cyclohexylamino]ethansulfonsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N`-[2-ethansulfonsäure]
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MOPS	4-[N-Morpholino]propansulfonsäure
Tricin	N-Tris-[Hydroxymethyl]methylglycin

Zusammenfassung

Makroalgen der Polarregionen sind nicht nur andauernder Kälte, sondern auch der Gefahr des Gefrierens ausgesetzt. Die Anpassung polarer Algen an ihr extrem kaltes Habitat könnte auf biochemischen Eigenschaften ihrer Enzyme selbst und / oder auf die Synthese bestimmter Schutzstoffe wie Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP), Prolin und Saccharose beruhen. Bei niedrigen Temperaturen wurde die Aktivität ausgewählter Enzyme und die Reaktion auf die Zugabe potentieller Gefrierschutzsubstanzen untersucht.

Aus der Grünalge *Acrosiphonia arcta* beider Polarregionen wurden Enzyme verschiedener Stoffwechselwege isoliert. Schwerpunktmäßig wurde die cytoplasmatische Malatdehydrogenase (MDH) aus dem Citratzyklus und die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6P-DH) aus dem oxidativen Penthosephosphatzyklus extrahiert und durch Ammoniumsulfatfällungen angereichert. Die Enzymeigenschaften bei niedrigen Temperaturen wurden anhand des Temperaturoptimums, der Aktivierungsenergie (E_a), der *Michaelis*-Konstante (K_m) sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) charakterisiert.

In vitro lagen die Temperaturoptima der Enzyme mit 30°C deutlich über dem Wachstumsoptimum von *A. arcta* (zwischen 0°C und 10°C). Die Aktivierungsenergie der MDH wurde nach Akklimatisation an tiefe Temperaturen (0°C) reduziert. Diese Modifikation muß als eine quantitative Strategie gesehen werden, um die katalytische Effizienz der MDH zu steigern. Die G6P-DH zeigte diese Strategie dagegen nicht, hier lagen die Aktivierungsenergien der 0°C-Kulturen höher als die der 10°C-Kulturen. Die MDH aus den kälteakklimatisierten Kulturen (0°C) wiesen zwischen -2°C und 0°C die höchste Substrataffinität ($K_m = 18,5 \mu\text{M}$) auf, die mit ansteigenden Temperaturen (40°C) deutlich abnahm ($K_m = 109 \mu\text{M}$). Die hohe Substrataffinität der MDH bei niedrigen Temperaturen führte zu einem Ausgleich in der Katalysegeschwindigkeit (modulierte Strategie). Der K_m -Wert der G6P-DH blieb im Temperaturbereich zwischen 30°C und 5°C nahezu konstant ($K_m = 1,3 \text{ mM}$) und stieg bei -2°C auf den dreifachen Wert an. Somit wurde bei niedrigen Temperaturen kein Ausgleich in der Katalysegeschwindigkeit festgestellt.

Nicht nur die Änderung der biochemischen Eigenschaften, sondern auch die Quantität der Enzyme kann eine Anpassung an niedrige Temperaturen darstellen. Die Proteinkonzentration von *A. arcta* stieg mit abnehmender Temperatur an und könnte somit auf eine quantitative Anpassung der beiden Enzyme hindeuten. Insgesamt konnten für die MDH aus *A. arcta* mehrere Anpassungsstrategien an tiefe Temperaturen belegt werden, für die G6P-DH dagegen wird nur eine quantitative Anpassung angenommen.

Zusammenfassung

Um den Beitrag der von *A. arcta* synthetisierten organischen Osmolyte DMSP, Prolin und Saccharose an der Kälteadaptation abzuschätzen, wurde die Wechselwirkung einzelner Osmolyte mit den Enzymen MDH und G6P-DH untersucht und anhand der Änderung der K_m - und V_{max} -Werte charakterisiert.

Für die G6P-DH konnte *in vitro* eine Schutzwirkung durch DMSP, Prolin und Saccharose bei niedrigen Temperaturen (-2°C) belegt werden. Alle drei Substanzen bewirkten bei diesem Enzym eine Senkung des K_m -Wertes sowie eine leichte Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Dies führt bei nicht-sättigenden Substratbedingungen zu einem Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit. Bei der MDH dagegen war die Wirkung der Substanzen bei niedrigen Temperaturen uneinheitlich. Während DMSP und Prolin zu keiner Beeinträchtigung der Enzymaktivität führten, wurde diese mit steigenden Saccharosekonzentrationen (600 mM) um das 1,9 fache inhibiert. Die Enzym-Substrat-Affinität der MDH wurde durch Prolin erhöht, durch DMSP und Saccharose dagegen nur unwesentlich beeinflusst. Als Schutzstoff für die MDH ist somit nur Prolin eindeutig zu klassifizieren. Allerdings wird auch eine Schutzwirkung des DMSP für die MDH *in vivo* als wahrscheinlich angenommen.

Die kryoprotektive Wirkung von DMSP, Prolin und Saccharose wurde anhand des Modellenzym Lactatdehydrogenase (LDH, Schweinemuskel) getestet, das aufgrund seiner Kältelebensfähigkeit als besonders geeignet erschien. Für alle drei Substanzen konnte in physiologisch relevanten Konzentrationen (50 bis 200 mM) eine kryoprotektive Wirkung nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Wiederauftauen belegt werden. Hinsichtlich des Schutzgrades nahm DMSP dabei eine herausragende Stellung ein. DMSP stabilisierte die LDH nicht nur, sondern führte in höheren Konzentrationen (300 mM) sogar zu einer Stimulierung der Aktivität.

Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, daß DMSP, Prolin und Saccharose nicht nur als Osmolyte bei Salzstreß, sondern auch als Schutzstoffe gegen die temperaturinduzierten Streßformen Kälte und Gefrieren gelten können. Das Ausmaß sowie die Art und Weise der Schutzwirkung variierten allerdings in Abhängigkeit sowohl von der jeweiligen Substanz als auch von der Natur des Enzyms.

Summary

Polar macroalgae are not only exposed to permanent cold but may also be damaged from complete freezing on a cellular level. In macroalgae of the polar regions, biochemical properties of the enzyme systems and / or the presence of protective substances such as dimethylsulfoniopropionate (DMSP), proline and sucrose may be of major importance to survive extreme environmental conditions. This study investigated selected enzymes for their activities under low temperature and their response to additions of potential antifreeze substances.

Cytoplasmatic malate dehydrogenase (MDH), which is involved in the citric acid cycle, and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH), an enzyme in the oxidative pentose phosphate pathway, were extracted and partially enriched by ammonium sulfate precipitation from *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta). Temperature optima, apparent energy of activation (E_a), enzyme activity (V_{max}) and the *Michaelis* constant (K_m) characteristics were determined for both enzymes in isolates from arctic and antarctic locations.

In vitro temperature optima for both enzymes were at 30°C, which is in contrast to the preferred growing temperatures of 0°C to 10°C in *A. arcta*. After adaptation of specimen to low temperatures (0°C), the E_a of MDH was reduced in both isolates. This could be explained as a quantitative strategy to increase the catalytic efficiency of MDH. However, the E_a of G6P-DH increased in 0°C adapted cultures compared to cultures grown at 10°C. Substrate affinity of MDH from cold acclimated cultures (0°C) was high at temperatures of -2°C to 0°C ($K_m = 18,5 \mu\text{M}$). The K_m value increased to a maximum of 109 μM at 40°C. The high substrate affinity of MDH at low temperatures indicates a compensation of reduced metabolic turnover at these temperatures (modulated strategy). The K_m of G6P-DH remained almost constant in a temperature range of 30°C to 5°C ($K_m = 1,3 \text{ mM}$) while at -2°C the K_m increased by three times. Therefore, at low temperatures the catalysis of G6P-DH was not compensated.

Not only enzyme biochemistry but also enzyme quantity may be a function of low temperature. In this study protein concentration of *A. arcta* increased at low temperature which points to a quantitative adaptation of both enzymes investigated. With respect to MDH it was possible to indicate various adaptation mechanisms to cold temperatures, whereas for G6P-DH only a quantitative adaptation may exist. The organic osmolytes DMSP, proline and sucrose were tested for their contribution of cold adaptation in MDH and G6P-DH. The interaction of these enzymes with the organic osmolytes were characterized due to the variations in K_m and V_{max} values. At low temperatures (-2°C), for G6P-DH the *in vitro* addition of the organic osmolytes resulted in a decrease of K_m and a small increase of V_{max} .

Summary

This results in a compensation of the rate of enzymatic reaction at unsaturated substrate conditions and points to protective effects of all osmolytes investigated. In contrast, DMSP and proline did not affect enzyme activity of MDH but high concentrations of sucrose (600 mM) resulted in 1,9-fold inhibition of enzyme activity. However, proline addition resulted in a decreased K_m for MDH, whereas the effects of DMSP and sucrose additions in MDH activity were insignificant. Therefore, only proline could be classified as a protective substance for MDH. Nevertheless, a protective function of DMSP for MDH at low temperatures may be possible *in vivo*.

To compare the results obtained with enzymes from *A. arcta*, the effect of organic osmolytes on the cold sensitive enzyme lactate dehydrogenase (LDH) from pig muscle was investigated. DMSP, proline und sucrose added at physiologically relevant concentrations (50 to 200 mM) conserved LDH activity after shock freezing in liquid nitrogen. Concerning the extent of protection, DMSP exhibited intriguing funktion: DMSP did not only stabilize LDH activity but additions did also result in activity stimulation at concentrations above 300 mM.

This study verified DMSP, proline and sucrose not only as osmolytes but also as compounds with cryoprotective properties at various kinds of temperature stress through chilling and freezing. The mechanisms and extend of the protective effects are not general but specific and exhibited high enzyme specificity as well.

1. Einleitung

Temperaturänderungen haben einen fundamentalen Einfluß auf den Metabolismus von Algen, da viele Prozesse, insbesondere enzymatisch katalysierte Reaktionen, stark temperaturabhängig sind (LOBBAN et al. 1985). Die Geschwindigkeit der Stoffwechselreaktionen sowie biochemischen Strukturen und Ultrastrukturen werden entscheidend durch die Temperatur bestimmt (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Bei suboptimalen Temperaturen laufen physiologische Prozesse im allgemeinen langsamer ab oder kommen ganz zum Erliegen (FRANKS 1986). Somit beeinflusst die Temperatur nachhaltig den physiologischen Zustand von Algen. Darüber hinaus wird die Verbreitung einer Algenspezies maßgeblich durch deren Temperaturtoleranz determiniert. Die Verbreitungsgrenzen werden durch die jeweilige obere und untere Letaltemperatur sowie den Temperaturbedarf für Reproduktion und Wachstum bestimmt (BISCHOFF und WIENCKE 1994).

Die Polarmeere sind durch extrem variierende Lichtintensitäten, saisonal fluktuierende Tageslängen und durch niedrige Wassertemperaturen zumeist in einem Bereich von - 1,8 °C bis 2 °C (in flachen Gewässern bis 10 °C) charakterisiert (KIRST und WIENCKE 1995). Diese Regionen zeichnen sich demnach durch relativ konstante tiefe Temperaturen aus. Die Energie der im Sommer einfallenden Sonneneinstrahlung wird nicht zur Erwärmung der Ozeane, sondern fast ausschließlich zum Abschmelzen des Meereises verbraucht (VINCENT 1988). Die Küsten der Polarregionen sind vom Sublitoral bis ins Supralitoral hinein von benthischen Makroalgen besiedelt. Die sublitoralen Arten leben bezüglich der Umweltfaktoren Temperatur und Salinität in einem relativ stabilen Bereich. Da die polaren Gewässer außerdem ganzjährig durch hohe Nährstoffgehalte gekennzeichnet sind, wird der Stoffwechsel dieser Makroalgen hauptsächlich durch die Lichtintensität und die Photoperiode beeinflusst (WIENCKE 1990 a,b). Auch im Winter, wenn eine 1 bis 4 m dicke Eisschicht dem Wasser auflagert, sind diese Algen nicht der Gefahr des Einfrierens ausgesetzt (LÜNING 1985). Im Gegensatz zu den sublitoralen Arten müssen die Algen des Eulitorals durch periodisches Trockenfallen und anschließender Überflutung wesentlich größere Schwankungen der abiotischen Faktoren Salinität, Licht und Temperatur bis hin zum Einfrieren überstehen.

Die Widerstandsfähigkeit der Organismen gegen Kälte ist somit ein wesentliches Charakteristikum der Ökosysteme hoher Breiten. In der arktischen Region erträgt z.B. *Fucus vesiculosus* monatelanges Einfrieren bei Temperaturen bis -40 °C (GESSNER 1970).

Die polaren Eulitoralzonen werden vor allem von annuellen Grünalgen dominiert, die hauptsächlich während des Frühjahrs und Sommers wachsen, wie z.B. die in dieser Arbeit untersuchte *Acrosiphonia arcta*. Solche Arten werden in der Literatur als "season responders" (sogenannte Opportunisten) bezeichnet, die nur dann wachsen, wenn die Außenbedingungen günstig sind (WIENCKE 1995).

In den letzten Jahren sind einige zusammenfassende Arbeiten zum Temperaturbedarf des Wachstums sowie der Temperaturtoleranz von polaren Algen beider Hemisphären erschienen, die auch im Zusammenhang mit der Klimageschichte diskutiert werden (DUNTON 1992, WIENCKE et al. 1994, CLAYTON 1994, BISCHOFF und WIENCKE 1995). Ökophysiologisch konnten diese Untersuchungen belegen, daß die Wachstumsmuster der polaren benthischen Makroalgen gut an die tiefen Temperaturen und den saisonalen Wechsel des Unterwasser-Lichtregimes adaptiert sind (Zusammenfassung in KIRST und WIENCKE 1995). Sowohl arktische als auch antarktische Spezies erreichen ihre maximalen Wachstumsraten bei niedrigeren Temperaturen als temperierte Algen, wobei antarktische Spezies einen geringeren Temperaturbedarf als die der Arktis haben. Nach WIENCKE et al. (1994) sind diese Unterschiede auf die unterschiedlich lange Kaltwassergeschichte der beiden Polarregionen zurückzuführen. Während die Antarktis seit mindestens 14 Millionen Jahren durch tiefe Wassertemperaturen charakterisiert ist, trifft dies für die Arktis erst seit ungefähr 2 bis 3 Millionen Jahren zu (LÜNING 1985, HEMPEL 1987).

Die Besiedlung der Kaltwassergebiete durch Algen wurde erst durch die evolutionäre Entwicklung molekularer Prozesse möglich, die es insbesondere der Photosynthese erlaubten, auch bei niedrigen Temperaturen weitgehend "normal" zu funktionieren (DESCOLAS-GROS und DE BILLY 1987). Die Mechanismen einer Adaptation an kalte Klimate wurden vorwiegend an höheren Pflanzen, aber auch an Algen untersucht (TEERI 1980, ÖQUIST 1983, GRAHAM und PATTERSON 1982, RAVEN und GEIDER 1988). Bei ektothermen Organismen sind unter anderem die Produktion und Aktivierung neuer sowie modifizierter Enzyme als adaptive Prozesse bekannt (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Dennoch ist man weit davon entfernt, die Frage vollständig beantworten zu können, welche Mechanismen die Algen der Polarregionen entwickelt haben, um bei tiefen Temperaturen zu überleben (WIENCKE 1995).

Über die hohe Kälteanpassung hinaus müssen die Algen der polaren Gezeitenzone, im Gegensatz zu den sublitoralen Arten, auch eine Resistenz gegenüber dem Einfrieren aufzeigen. Wie Landpflanzen aus Gebieten mit einem Jahreszeitenklima, so erwerben auch Keimlinge und ausgewachsene Thalli von z.B. eulitoral *Fucus*-Arten eine Frosthärte, wenn sie einige Tage Temperaturen um 0 °C ausgesetzt sind (BIRD und MCLACHLAN 1974). An Algen der

Gezeitenzone läßt sich nachweisen, daß die Gefriertoleranz eng mit der vertikalen Abundanz im natürlichen Habitat korreliert. Algen, die weit oben im Küstenstreifen wachsen, sind toleranter als Spezies, die im unteren Bereich wachsen (DAVISON et al. 1989, DUDGEON et al 1989, 1990). Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Austrocknungstoleranz (DRING und BROWN 1982).

Zusätzlich zum Kältestreß kommt beim Gefrieren die Gefahr der Dehydratation oder intrazellulärer Eisbildung hinzu. Für einen Organismus, der Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ertragen muß, wie z.B. beim Trockenfallen der polaren *A. arcta*, ist es lebensnotwendig, ein Gefrieren des Zellwassers und damit den Zelltod zu vermeiden.

Während des Einfrierens bildet sich zunächst in den Interzellularen sowie zwischen Zellwand und Protoplast extrazelluläres Eis, wodurch die Zelle partiell dehydriert wird. Dadurch werden die gelösten Stoffe im Zellwasser aufkonzentriert und so das tödliche, intrazelluläre Gefrieren verzögert. Diese Aufkonzentrierung der gelösten Substanzen, überwiegend von Salzen, könnte jedoch toxisch für die Zelle sein (FRANKS 1985). Um solche Schädigungen, insbesondere der Proteine und Membranen, zu verhindern, werden von einigen Organismen bestimmte Schutzsubstanzen (Kryoprotektoren) synthetisiert. Diese Substanzen können zwar auch den Gefrierpunkt herabsetzen, in erster Linie schützen sie die Proteine jedoch gegen Denaturierung, indem sie den osmotisch bedingten Ausstrom des Zellwassers in den extrazellulären Raum vermindern.

Algen, die nahe dem Gefrierpunkt leben, sind ebenfalls aufgrund einer Kälteelastizität der hydrophoben Wechselwirkungen ihrer Proteine der Gefahr ausgesetzt, daß einige wichtige Stoffwechselwege inaktiviert werden. So verlieren viele Enzyme bei niedrigen Temperaturen ihre Tertiär- und / oder Quartärstruktur (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Bei Proteinuntersuchungen *in vitro* konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von Kryoprotektoren, wie z.B. Glycerin und Saccharose, die hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert wurden (SUELTER 1990). Demnach können Kryoprotektoren nicht nur die Gefrierresistenz bzw. -Toleranz unterstützen, sondern bereits bei niedrigen Temperaturen (oberhalb des Gefrierpunktes) stabilisierend auf Proteine wirken. Hinsichtlich dieser Funktion könnte man bestimmte Kryoprotektoren nicht nur als Gefrier-, sondern schon als Kälteschutzsubstanzen bezeichnen. Während der Kälteanpassung werden bereits verschiedene kryoprotektive Substanzen akkumuliert (FRANKS 1986). Zusammenfassend lassen sich die genannten, eng miteinander verbundenen Funktionen der Kryoprotektoren wie folgt charakterisieren (SCHLEE 1986):

Einleitung

- Kryoprotektoren verhindern unspezifisch das Erreichen kritischer Konzentrationen von toxischen Verbindungen, die zur Inaktivierung wichtiger Zellstrukturen z.B. der Membranen führen würden;
- Kryoprotektoren beeinflussen direkt und spezifisch die kältesensitiven Strukturen wie Membranen, Proteine und Enzyme.

Zu den bisher als Kryoprotektoren bekannten Verbindungen zählen Zucker (z.B. Saccharose, Abb. 1), Zuckerderivate (z.B. Sorbitol, Mannitol, α -Galactosylglycerol), Aminosäuren (z.B. Prolin, Abb.1), quartäre Ammoniumverbindungen (z.B. Glycinbetain), Polypeptide und einige Proteine (HEBER und SANTARIUS 1973, 1976, FRANKS 1986, ROSAS et al. 1986, HINCHA et al. 1990, SANTARIUS 1991, 1992). Viele dieser kryoprotektiven Substanzen spielen nicht nur bei Kälte eine Rolle, sondern werden von den Algen auch bei anderen Streßfaktoren wie z.B. hohen Salinitäten oder Austrocknung synthetisiert bzw. akkumuliert. So wird z.B. das bei höheren Pflanzen als Kryoprotektor bekannte Prolin (FRANKS 1986) von Algen auch häufig als Osmolyt bei Salzstreß synthetisiert (BISSON und KIRST 1995). Prolin und andere, bei hohen Salinitäten akkumulierte organische Substanzen ersetzen die toxisch wirkenden Ionen im Cytoplasma (besonders Na^+) und stellen so das osmotische Gleichgewicht wieder her, ohne selbst schädigend auf den Metabolismus zu wirken. Solche gut verträglichen, löslichen Verbindungen werden gemeinhin als kompatible Substanzen ("compatible solutes") bezeichnet (BROWN und SIMPSON 1972; BROWN 1976). Allgemein versteht man hierunter organische Osmolyte, die salzsensitive Enzyme auch in hohen Konzentrationen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigen (BROWN 1976, YANCEY et al. 1982). Trotz ihrer recht unterschiedlichen chemischen Verbindungsklassen (z.B. Polyole, Zucker und Aminosäuren) zeigen kompatible Substanzen eine Reihe von Gemeinsamkeiten (KIRST 1994):

- hohe Löslichkeit;
- Ladungsneutralität (Nettoladung) bei physiologischem pH-Wert;
- auch in hohen Konzentrationen ungiftig;
- schneller Auf- und Abbau der Substanzen und Umsatz aus Reservestoffen.

Die Annahme, daß kompatible Substanzen ausschließlich osmotische Aufgaben übernehmen, wird ihrer wahren Bedeutung aber nicht gerecht. Eine Akkumulation kompatibler Substanzen würde dann zwar ein osmotisches Gleichgewicht schaffen, dennoch unterläge das Cytoplasma bei hohen Salinitäten, wie auch beim Gefrierstreß, einem Zustand beträchtlich reduzierter Wasseraktivität (GALINSKI 1992). Die Hydratation empfindlicher nativer Systeme wäre aber weiterhin beeinträchtigt. In der neueren Literatur wird daher vermutet, daß kompatible Sub-

stanzen eine stabilisierende Funktion auf den Zellmetabolismus ausüben und so bestimmte molekulare Eigenschaften verknüpft werden können (GALINSKI 1995). Untersuchungen zum Salz-, Gefrier- und Hitzestreß zeigten, daß die destabilisierenden Effekte auf Enzyme *in vitro* durch kompatible Substanzen verringert werden (POLLARD und WYN JONES 1979, MANETAS et al. 1986, CARPENTER und CROWE 1988, CROWE et al. 1990, GALINSKI 1992). Es wird nun vermutet, daß alle genannten Streßfaktoren auch *in vivo* ähnliche physikalische Effekte haben, die zu einer Schwächung der Hydrathülle führen. Daher wird in der Literatur teilweise angenommen, daß kompatible Substanzen, wie sie auch von Algen häufig produziert werden, als universelle Schutzstoffe gelten können, die dem Organismus bei unterschiedlichen Streßsituationen Schutz bieten (GALINSKI 1992, 1995, BISSON und KIRST 1995).

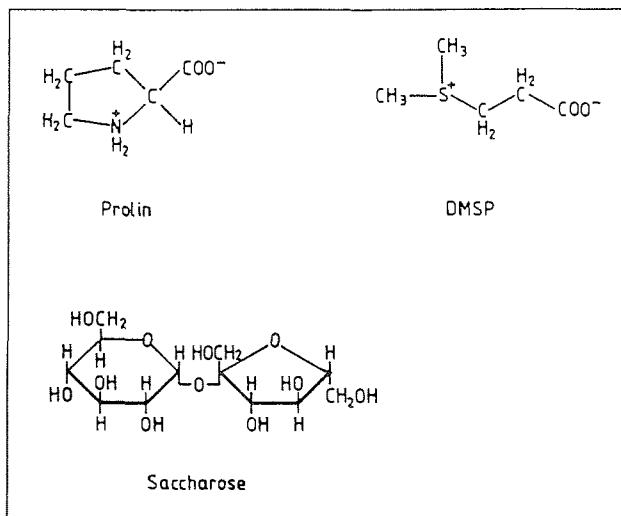


Abb. 1: Chemische Strukturen der von *A. arcta* bei hyperosmotischer Belastung angereicherten organischen Verbindungen Prolin, Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) und Saccharose.

Eine in den letzten Jahren immer wieder als kompatibel diskutierte Substanz ist die tertiäre Sulfoniumverbindung β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP, Abb. 1), die von einigen Mikro- und Makroalgen synthetisiert wird (ACKMAN et al. 1966, REED

1983a). DMSP ist die wichtigste biochemische Vorstufe der leicht flüchtigen Schwefelverbindung Dimethylsulfid (DMS, ANDREAE 1990). Unter alkalischen Bedingungen zerfällt das DMSP in DMS und Acrylsäure. Im Oberflächenwasser der Ozeane, Küsten und Ästuare ist DMS die quantitativ wichtigste gasförmige Schwefelverbindung (IVERSON et al. 1989). Das im großen Umfang von Phytoplankton und benthischen Makroalgen produzierte DMSP wird durch Zellysis, bakterielle Aktivität, "Grazing" von Zooplankton sowie enzymatische Spaltung zu DMS umgewandelt (CANTONI und ANDERSON 1956, ISHIDA 1968, DACEY und WAKEHAM 1986, NGUYEN et al. 1988, BELVISO et al. 1990, KIENE und SERVICE 1991). Ein Teil des im Meerwasser gelösten DMS diffundiert in die marine Atmosphäre und wird dort photochemisch schließlich zu Sulfat und Methansulfonat oxidiert (ANDREAE und RAEMDONCK 1983). Diese Moleküle wirken ihrerseits als Kerne bei der Aerosolbildung. Die jeweiligen Aerosolpartikel wiederum spielen eine wichtige Rolle als Kondensationskerne für Wasserdampf und begünstigen somit die Entstehung von Wolken, insbesondere in der südlichen Hemisphäre (FOGELQVIST 1991). Die atmosphärische Konzentration der Aerosolpartikel korreliert mit der Ausbildung mariner Stratuswolken und mit der globalen Albedo. Dieser Wolkenbildungsprozeß kann entsprechend der *Gaia*-Theorie Wetter und Klima erheblich beeinflussen (CHARLSON et al. 1987; MONASTERSKY 1987, LOVELOCK 1988).

DMSP wird hauptsächlich von marinen Mikro- und Makroalgen; aber auch von einigen salztoleranten höheren Pflanzen synthetisiert (WHITE 1982, REED 1983a, KELLER et al. 1989, KARSTEN 1990a, HANSON et al. 1994, PAQUET et al. 1994). Die Fähigkeit zur DMSP-Synthese bzw. Akkumulation ist jedoch nicht in allen Algen nachzuweisen. Innerhalb der Makroalgen enthalten die meisten Grün- und einige Rotalgen hohe DMSP-Konzentrationen (REED 1983a, 1983b, KARSTEN et al. 1990a). Der intrazelluläre DMSP-Gehalt wird durch abiotische und biotische Faktoren wie Licht (KARSTEN et al. 1990b, 1991a), Salinität (DICKSON et al. 1980), Temperatur (KARSTEN et al. 1992), Nährstoffe (GRÖNE und KIRST 1992) und Seneszenz (MATRAI und KELLER 1993) beeinflusst. Obgleich die metabolische Rolle des DMSP nicht vollständig bekannt ist, ist seine Funktion als organisches Osmolyt für Mikro- und Makroalgen verschiedener taxonomischer Gruppen gut belegt (ACKMAN et al. 1966, VAIRAVAMURTHY et al. 1985, DICKSON und KIRST 1986, EDWARDS et al. 1988, KARSTEN et al. 1991b).

Eine Besonderheit des DMSP ist, daß es als Sekundärmetabolit und nicht, wie viele andere Osmolyte (z.B. Kohlehydrate, Zucker, Zuckeralkohole), als Haupt-Photosyntheseprodukt gebildet wird (KIRST 1990). Die Biosynthese des DMSP geht von der Aminosäure Methionin aus (cf. HANSON et al. 1994) und ist energetisch recht aufwendig, was zu der Vermutung führte, daß DMSP nicht ausschließ-

lich als Osmolyt wirkt, sondern noch weitere physiologische Aufgaben übernimmt. In der Literatur werden mögliche Funktionen des DMSP als Fraßschutz (KELLER et al. 1989), als Methylgruppendonator (WHITE 1982), als Speicherpool für überschüssigen Schwefel (VAN DIGGELEN et al. 1986) oder eine antibakterielle Wirkung seines Zerfallsproduktes Acrylsäure (SIEBURTH 1961, BARNARD et al. 1984) diskutiert. Diese Funktionen sind jedoch bisher eher Vermutungen denn belegt.

Untersuchungen an polaren Grünalgen, insbesondere der Gattung *Ulva*les, zeigten signifikant höhere DMSP-Gehalte als entsprechende Spezies aus temperierten und tropischen Regionen (KARSTEN 1990a, 1992, BISCHOFF et al. 1994). Als besonders wahrscheinlich wird daher eine kryoprotektive Wirkung des DMSP angenommen. Berechnungen konnten belegen, daß DMSP den intrazellulären Gefrierpunkt herabsetzt und somit einen Gefrierschutz bewirken könnte (GRÖNE 1995). Dem hält der Autor allerdings richtigerweise entgegen, daß eine Zelle, um einen effizienten Gefrierschutz gegen u.U. extreme Minusgrade zu erzielen, derartige Mengen an DMSP synthetisieren müßte, daß osmotische Probleme die logische Folge wären. Ein Gefrierschutz durch DMSP kann daher nicht allein auf dessen gefrierpunktreduzierender Wirkung beruhen, vielmehr müßten noch weitere Schutzmechanismen hinzukommen. So gehen NISHIGUCHI und SOMERO (1992) davon aus, daß Proteine durch Interaktion mit DMSP stabilisiert und so geschützt werden. Diese Untersuchungen wurden an der kältelabilen Phosphofruktokinase aus dem Hasenmuskel gemacht und zeigten, daß DMSP die Destabilisierung des Enzyms bei Kälte verringert. Der Nachweis, ob dieser Effekt auch auf Enzyme aus Algen übertragbar ist, steht noch aus.

1.1 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel der Grünalge *A. arcta*, zu untersuchen, inwiefern bestimmte Schutzstoffe (DMSP, Prolin und Saccharose) die gute Adaptation polarer Algen an ihr extrem kaltes Habitat unterstützen.

Hierzu wurden zunächst aus unterschiedlich akklimatisierten *A. arcta* Schlüsselenzyme verschiedener Stoffwechselwege isoliert. Diese Enzyme waren die cytoplasmatische Malatdehydrogenase (MDH) aus dem Citratzyklus, die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus dem oxidativen Penthosephosphatzyklus und die Pyruvat-Kinase (PK) aus der Glykolyse.

Sodann war die Frage zu klären, ob die Adaptation der Algen an niedrige Temperaturen auf biochemischen Eigenschaften des Enzyms selbst beruht. Die Enzymeigenschaften wurden anhand des Temperaturoptimums, der Aktivierungs-

energie (E_a), der *Michaelis*-Konstante (K_m) sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) charakterisiert. Für diese Untersuchungen wurden Isolate beider Polarregionen herangezogen, da möglicherweise Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften ihrer Enzyme bestehen.

Im weiteren war zu klären, ob die von *A. arcta* bei hyperosmotischer Belastung akkumulierten organischen Osmolyte Prolin, Saccharose und DMSP (KARSTEN 1991b, 1992, Abb. 1) auch bei niedrigen Temperaturen zur Enzymstabilisierung beitragen und damit einen Schutz gegen Kälte bis hin zum Einfrieren gewährleisten können. Dazu wurde zunächst der intrazelluläre Gehalt dieser Substanzen bei unterschiedlichen Temperaturen (10°, 0° und -2° C) quantifiziert. Darüber hinaus wurde der DMSP-Gehalt verschiedener kalt-temperierter *A. arcta* - Isolate überprüft, um festzustellen, ob die Fähigkeit zur Akkumulation hoher DMSP-Gehalte eine Besonderheit der polaren Isolate ist.

Um eine mögliche Schutzwirkung der organischen Substanzen zu charakterisieren, wurde die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substanz anhand der Veränderung des K_m - und V_{max} -Wertes überprüft. Dabei wurde auch die Frage nach der Funktion, insbesondere des DMSP, als kompatible Substanzen bei verschiedenen is-osmolalen Konzentrationen erörtert.

Die Makroalgen der Polarregionen sind nicht nur andauernder Kälte, sondern auch der Gefahr des Gefrierens ausgesetzt. Daher stellte sich abschließend die Frage nach dem kryoprotektiven Potential der untersuchten Substanzen. Die zur Beantwortung erforderlichen Untersuchungen wurden anhand des Modellenzym Lactatdehydrogenase (LDH) durchgeführt, das aufgrund seiner Kälteabilität als besonders geeignet erschien.

2. Material und Methode

2.1 Untersuchungsobjekte und ihre Isolationsorte

Acrosiphonia arcta (Dillwyn) J. Agardh gehört zu der Abteilung der Chlorophyta, der Klasse Ulvophyceae und wird in der Ordnung der Codiolales geführt (VAN DEN HOEK et al. 1993).

Die Pflanze besteht aus verzweigten Zellfäden, die aus vielkernigen Zellen zusammengesetzt sind. Die Kerne einer Zelle zeigen eine synchrone Mitose in der Ebene der zukünftigen Zellteilung. Der Chloroplast ist wandständig und hat die Form eines perforierten Zylinders. Die Zellfäden wachsen in Büscheln bis zu einer Höhe von 10 cm. Die älteren Exemplare bilden dabei hakig gebogene Kurztriebe aus, die den basalen Teil der Hauptfäden umklammern und so dem Büschel ein verfilztes Aussehen verleihen. *A. arcta* teilt sich nur an den Apikalzellen. Der Lebenszyklus von *A. arcta* ist heteromorph diplohaplont. Die Art wächst vor allem im mittleren und unteren Eulitoral vom gemäßigten bis polaren Bereich beider Hemisphären (KORNMANN und SAHLING 1983; VAN DEN HOEK et al. 1993).

Das arktische Isolat stammt von der grönländischen Disko-Insel und wurde im Jahre 1990 während einer Expedition von C. WIENCKE (AWI, Bremerhaven) isoliert. In diesem Gebiet dauert die Polarnacht von Dezember bis Januar und der Polartag von Mitte Mai bis Mitte Juli an. Die Lufttemperatur schwankt zwischen -32 °C im Februar / März und maximal 18 °C Ende Juni. Von Dezember bis März ist die Meeresoberfläche mit einer Eisschicht bedeckt, nur von Juni bis Oktober ist das Wasser eisfrei. Die Temperatur der Wasseroberfläche liegt zwischen -2 °C und maximal 10 °C im Juli / August (Arctic Station, University of Copenhagen, Denmark).

Das antarktische Isolat stammt von der Insel King-George der South Shetlands und wurde ebenfalls von C. WIENCKE (AWI, Bremerhaven) während einer Expedition im Januar / Februar 1987 isoliert. Im Sommer (November / Dezember) beträgt die Tageslänge auf der King-George-Insel rund 20 Stunden Licht, während im Winter (Juni / Juli) die Tageslänge auf nur 5 Stunden Licht abfällt. Die Wassertemperaturen dieser Region liegen im Jahresverlauf zwischen -2 °C und +1 °C (LÜNING 1985). Um die King-George-Insel ist die Meeresoberfläche sechs Monate im Jahr (Mai bis Oktober) eisbedeckt (BISCHOFF und WIENCKE 1995).

2.2 Kultivierung

Kultiviert wurden die Algen in 600 mL Bechergläsern, die mit membran-filtriertem (Sartorius Sartobran II, 0,2 μm) und nach *Provasoli* (STEIN 1973) angereichertem Nordseewasser gefüllt waren. Die Salinität betrug 34 PSU. Die Medien wurden kontinuierlich mit Pressluft begast und alle 2 Wochen gewechselt. Beim Mediumwechsel wurden die Algen jeweils ausgedünnt, um der Verfilzung der Algen und damit einer Verschlechterung des Lichtklimas durch Selbstbeschattung vorzubeugen. Thalli der überschüssigen Algen wurden als neue Stammkulturen angesetzt. Beleuchtet wurden die Kulturen mit Tageslicht-Leuchtstoffröhren (Osram L58/W19). Die Photonenflussrate betrug 30 bis 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und wurde an der Gefäßoberseite mit einem Radiometer (Licor-185B, Li-Cor, USA) mit 2π -Sensor (Li-190SB Quantum) gemessen. Die Algen wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 18 : 6 Stunden gehalten. Für die Enzym-Versuche wurden die Algen in Kühlräumen bei Temperaturen von 0 °C und 10 °C gehältert. Für die Untersuchung der Inhaltsstoffe wurden beide Isolate zusätzlich noch bei -2 °C kultiviert. Um ein Gefrieren des Mediums bei dieser Temperatur zu vermeiden, wurde das Medium von 34 PSU auf 36 PSU mit synthetischem Meersalz (Wimex hw-Meersalz, Wiegandt GmbH, Krefeld) aufgesalzen. Vor Beginn aller Untersuchungen waren die Algen mindestens 8 Wochen an die jeweilige Temperatur akklimatisiert.

2.3 Extraktion

2.3.1 Herstellung von Rohextrakten

Für die Versuche zur Wirkung von kompatiblen Substanzen auf die Enzymstabilität bei niedrigen Temperaturen wurde aus den Algen ein Rohextrakt hergestellt. Dazu wurden 1 bis 5 g Algenmaterial zweimal in eiskaltem Aqua bidest. für je 1 min gewaschen, um extrazelluläre Ionen zu eliminieren (Abb. 2a). Anschließend wurden die Algen sorgfältig auf Filterpapier trockengetupft und das Frischgewicht bestimmt. Das so behandelte Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die eingefrorenen Proben wurden nach spätestens vier Wochen in einen Mörser überführt und abermals mit flüssigem Stickstoff behandelt, um die Thalli leichter aufzubrechen. In diesem tiefgefrorenen Zustand wurden die Algen mit etwas Quarzsand homogenisiert. Hierbei wurde wiederholt mit Stickstoff gekühlt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Algenpulver wurde in

Zentrifugengläser überführt und mit gerade so viel Extraktionspuffer (3 - 5 mL) übergossen, daß das Algenmaterial resuspendiert werden konnte. Die Zusammensetzung des Extraktionspuffers und die Wirkung der einzelnen Substanzen auf den Enzymrohextrakt sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das Homogenat wurde dann bei 1200 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand auf Eis gesichert. Das Pellet wurde noch zweimal mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und, wie oben beschrieben, extrahiert. Dann wurden die gesammelten Überstände bei 4500 g für 10 min abzentrifugiert und der so gewonnene Überstand als Rohextrakt für die Fällung eingesetzt.

Tab. 1: Bestandteile des eingesetzten Extraktionspuffers und deren Wirkung auf den Enzymrohextrakt.

50 mM HEPES (pH 7,4)	
bestehend aus :	
2 mM Na-EDTA	- komplexiert essentielle Spurenmetalle
2 mM Na-ascorbat	- Oxidationsschutz
5 mM MgCl ₂	- Cofaktor für Dehydrogenasen
5 mM Dithiothreitol	- stabilisiert Sulfhydrylgruppen, die gegen O ₂ empfindlich sind
13 mM CaCl ₂	- unterdrückt Proteasen
0,5% Tween 80	- Detergenz zur Membransolubisierung
10% Glycerin	- Kältestabilisierung
4% Polyclar AT	- eliminiert proteindenaturierende Phenole

2.3.2 Fraktionierung des Rohextrakts

Zur Aufreinigung wurde der Rohextrakt mit Hilfe von Ammoniumsulfat gefällt (Abb. 2b). Dies ist eine einfache Methode, um selektiv Proteine über ihre Hydrophobizität aus einem Proteingemisch zu trennen und damit die relative Aktivität zu erhöhen sowie schädigende Einflüsse durch z.B. Proteasen zu vermindern.

In Vorversuchen wurde geklärt, welche Ammoniumsulfatkonzentration und wieviele Fällungsschritte benötigt werden, um die Proteinfraction mit den höchsten Enzymaktivitäten zu erhalten. Für den Rohextrakt von *A. arcta* ergaben sich zwei

Fällungsschritte, eine 0 bis 35% (0 bis 1.4 M) Ammoniumsulfatfällung und eine weitere von 35 bis 70% (1.4 bis 2.8 M). In der zweiten ($\geq 70\%$) Proteinfraction konnten alle untersuchten Enzyme Malatdehydrogenase (MDH), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und Pyruvat-Kinase (PK) mit einer höchsten Aktivität nachgewiesen werden. Das Ammoniumsulfat wurde dem Rohextrakt als fein gemörstertes Salz unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes langsam zugesetzt. Während des gesamten Fällungszeitraums (je 30 min) wurde der Rohextrakt vorsichtig im Eiswasserbad gerührt.

Nach jedem Fällungsschritt wurde der Niederschlag bei 20.000 g und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für die nächste Fällung (35 bis 70%) eingesetzt. Das Pellet der letzten Fällung ($\geq 70\%$) ergab den Enzymextrakt und wurde mit gerade so viel Puffer (1 -1.5 mL) resuspendiert, daß der Niederschlag in Lösung ging. Diese Pufferlösung bestand aus 50 mM HEPES (pH 7.4); 2 mM Na-EDTA; 5 mM MgCl₂; 5 mM Dithiothreitol und 20% Glycerin (Wirkung siehe Tab. 1).

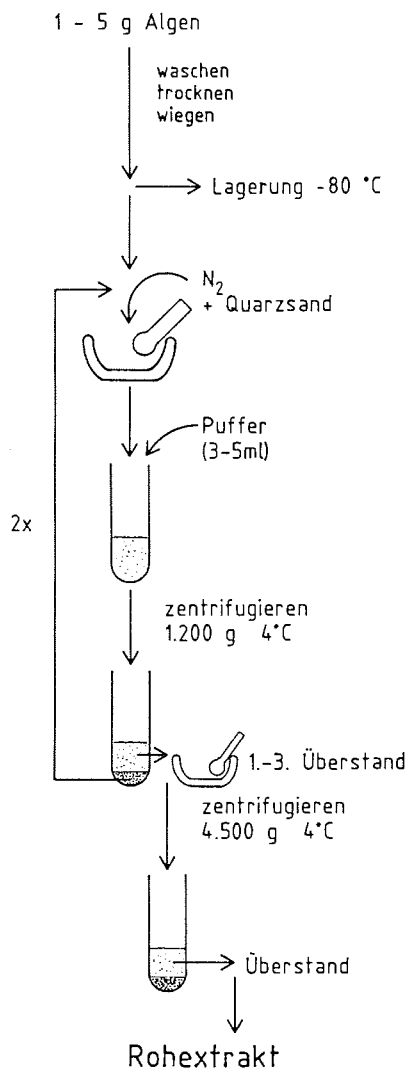
Aus dem Enzymextrakt wurden gleich nach der Fällung die Grundaktivitäten der MDH, der G6P-DH und der PK (Kap. 2.4.1 bis 2.4.3) sowie der Gesamtproteingehalt als Bezugsgröße bestimmt (Kap. 2.3.3). Anschließend wurde der Extrakt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Enzymversuche bei -80 °C für maximal 4 Wochen gelagert.

In Abbildung 2 ist der Arbeitsablauf zur Herstellung des Rohextraktes und die weiteren Anreicherungs- bzw. Reinigungsschritte in einem Fließdiagramm zusammengefaßt.

2.3.3 Bezugsgröße

Als Bezugsgröße für die Enzymversuche diente der Proteingehalt. Die quantitative Proteinbestimmung wurde mit einem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, München) im Anschluß an die jeweilige Extraktion durchgeführt. Dieser kommerzielle Proteintest basiert im wesentlichen auf der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976).

A. Rohextraktion



B. Fällung

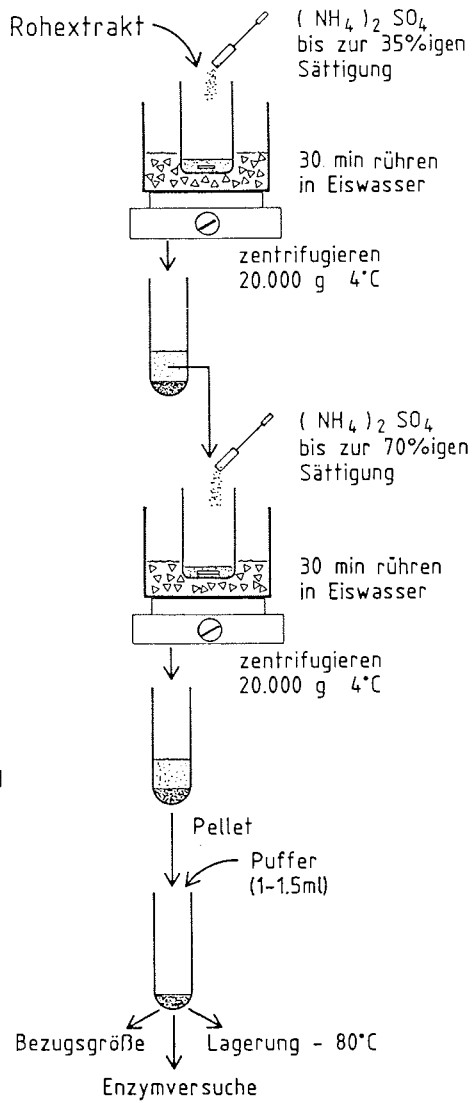


Abb. 2: Fließdiagramm der Enzymextraktion (A) und Anreicherung (B) aus *Acrosiphonia arcta*.

2.4 Enzymtests

Die Aktivität der Enzyme wurde als Kinetik durch die Reduktion bzw. Oxidation der Pyridinnukleotide NAD^+ , NADP^+ , NADH und NADPH unter Zugabe der entsprechenden Substrate spektralphotometrisch bzw. fluorometrisch bei 340 nm aufgenommen. Bestimmt wurde jeweils die Initialgeschwindigkeit, d.h. der Anstieg der Tangente im Startpunkt der Zeit-Umsatz-Kurve, da hier die Substrat- und Effektorkonzentrationen am genauesten definiert sind.

Die Kinetiken der MDH sowie PK wurden an einem Spektralphotometer durchgeführt, die der G6P-DH am Spektralfluorometer. Aufgrund der Biomasseknappheit wurde nur das Isolat aus Grönland für die Aufnahme der Substratsättigungs- und pH-Wert-Kurven herangezogen. Die Ansätze wurden vor jeder Messung für 20 min an die Meßtemperaturen im Wasserbad akklimatisiert. Das Photo- und das Fluorometer hatten temperierbare Meßkammern, die die Temperatur während der Messung konstant hielten. Für jede Kinetik wurden vier Parallelen aus dem jeweiligen Enzymextrakt gemessen.

Im folgenden sind die Standardzusammensetzungen der Enzymtests (modifiziert nach BERGMEYER 1983) angegeben.

2.4.1 Malatdehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37)

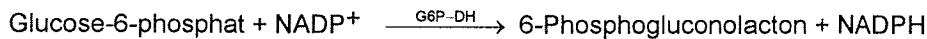
Die MDH-Aktivität wurde durch Bestimmung der NADH -Oxidation am Spektralphotometer bei 340 nm verfolgt :



Der Standardansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 mL : 100 mM HEPES (pH 7.4); 5 mM MgCl_2 ; 2 mM Dithiothreitol; 0.15 mM NADH ; 0.25 mM Oxalacetat und 10 bis 50 μL Enzymextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Oxalacetat gestartet.

2.4.2 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH, E.C. 1.1.1.49)

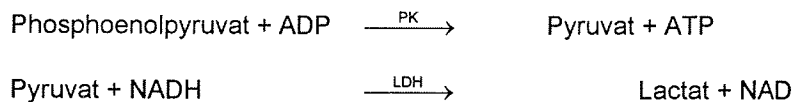
Die Enzymaktivität der G6P-DH wurde durch Messung der NADP⁺-Reduktion am Spektralfluorometer bei 340 nm gemessen :



Der Standardansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 mL : 80 mM HEPES (pH 7.4); 3.7 mM MgCl₂; 1.5 mM NADP; 3.3 mM Glucose-6-phosphat und 10 bis 50 µL Enzymextrakt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von Glucose-6-phosphat.

2.4.3 Pyruvat-Kinase (PK, E.C. 2.7.1.40)

Die Kinetik der PK wurde am Spektralphotometer bei 340 nm über einen gekoppelten Test mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase (LDH, Sigma, Typ XXX-S, Schweinemuskel) aufgenommen:



Die Testbedingungen wurden so gewählt, daß die LDH immer im Überschuß vorlag. Der Standardansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 mL: 50 mM HEPES (pH 7.4); 0.5 mM NADH; 5 mM MgCl₂; 5 mM Phosphoenolpyruvat; 1.5 mM ADP; 100 mM KCl; 25 Unit Lactat-Dehydrogenase und 10 bis 50 µL Enzymextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phosphoenolpyruvat gestartet.

Um einen Einfluß der LDH auf die Kinetik der PK auszuschließen und um die Empfindlichkeit des Test zu steigern, wurde noch ein "direkter" Enzymtest nach PON und BONDAR (1967) für die PK durchgeführt. Bei dieser Methode wurde die kontinuierliche Abnahme des Phosphoenolpyruvats am Spektralphotometer bei 230 nm nach folgender Reaktion verfolgt :



Beide Tests ergaben bei Raumtemperatur für die PK sehr geringe Aktivitäten. Eine Erhöhung der Biomasse im Enzymrohextrakt führte zwar zu verbesserten Aktivitäten, stand aber aufgrund des relativ langsamen Wachstums von *A. arcta*

nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Ein weiteres Problem stellte die Lagerfähigkeit der PK da, die für ihre Thermolabilität bekannt ist (SUELTER 1990). Auch mit Erhöhung des Glycerin-Anteils im Puffer oder in "ausgesalztem" Zustand auf Amoniumsulfat konnte die Lagerfähigkeit nicht verbessert werden. Ein direktes Messen nach der Extraktion war aufgrund der zeitaufwendigen Aufarbeitung der Algen und der relativ hohen Zahl an Messungen nicht möglich. Außerdem war die Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen soweit reduziert, daß die Empfindlichkeit des Photometers unterschritten wurde. Aus diesen genannten Gründen konnte die PK für die temperaturabhängigen Untersuchungen nicht herangezogen werden, auch wenn gerade die Kältelebensfähigkeit der PK für die Fragestellung der Arbeit von besonderem Interesse gewesen wäre.

2.5 Charakterisierung der Enzyme

2.5.1 Aufnahme der Substratsättigungskurven

Für die MDH und für die G6P-DH wurden Substratsättigungskurven aufgenommen. Die Algen waren vor der Extraktion an 0 °C akklimatisiert. Für die MDH wurden sieben Oxalacetatkonzentrationen (500, 250, 125, 50, 25, 12.5 und 6.25 µM) eingesetzt, bei der G-6P-DH neun Glucose-6-Phosphat-Konzentrationen (13.20; 6.60; 3.30; 2.44; 1.22; 0.81; 0.61; 0.15 und 0.06 mM). Die Cosubstrate der beiden Enzymtests wurden nicht getestet. Alle anderen Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Verbindungen wurden konstant gehalten und im Überschuß eingesetzt (Kap. 2.4). Die Substratsättigungskurven wurden bei -2 °C, bei 5 °C und 30 °C durchgeführt.

2.5.2 Aufnahme der pH-Wert-Kurven

Die MDH wurde in einem pH-Wert-Bereich von 5.5 bis 8.5 getestet, die G-6P-DH in einem Bereich von 5.5 bis 10. Die Untersuchungen liefen in Abstufungen von 0.5 pH-Wert-Einheiten und bei einer Temperatur von 30 °C. Die für die pH-Wert-Kurven eingesetzten Puffer sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Eingesetzte Puffergemische und deren pH-Werte - Bereiche.

Puffer \ pH	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
MES	■									
MOPS			■							
HEPES				■						
Tricin						■				
CES								■		
Bis-Tris-Propan			■							

MES = 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure; MOPS = 4-[N-Morpholino]propansulfonsäure; HEPES = N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]; Tricin = N-Tris-[Hydroxymethyl]methylglycin; CES = 2-[Cyclohexylamino]ethansulfonsäure; Bis-Tris-Propan = 1,3-Bis-Tris-[Hydroxymethyl]methylamino-Propan

Die Konzentrationen der Puffer betragen bei der MDH 100 mM und bei der G6P-DH 80 mM pro Versuchsansatz. Bei den Temperaturversuchen wurde der HEPES-Puffer einmalig bei 30 °C auf pH 7.4 eingestellt und temperaturbedingte Änderungen des pH-Wertes nicht korrigiert. Diese Änderungen betragen beim HEPES-Puffer zwischen -2 °C und 40 °C etwa 0.4 pH-Einheiten.

2.5.3 Aufnahme der Temperaturkurven

Die Enzymversuche zur Temperatur wurden sowohl am arktischen als auch am antarktischen Isolat sowie an den Enzymen MDH und G6P-DH durchgeführt. Die Isolate waren vor Versuchsbeginn jeweils an 0 °C und an 10 °C akklimatisiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme wurde bei folgenden Temperaturen gemessen: -2; 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 und 40 °C. Die Vorinkubation betrug bei allen Ansätzen 20 min. In Vorversuchen wurde überprüft, ob eine Verschiebung der Substratsättigungskonzentration bei den unterschiedlichen Temperaturen auftritt und gegebenenfalls die Konzentration ändert. Die Küvettenansätze sind für die jeweiligen Enzyme in Kapitel 2.4 beschrieben.

2.6 Wirkung verschiedener Effektoren auf MDH und G6P-DH

Der Einfluß verschiedener Effektoren (Prolin, Saccharose, DMSP und NaCl) auf die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH und G6P-DH wurde bei niedrigen Temperaturen getestet. Prolin und Saccharose wurden von der Fa. Sigma bezogen. Das DMSP wurde als DMSP-Cl in Eigensynthese hergestellt (Kap. 2.12). Die 1M Stammlösungen wurden in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.0) angesetzt und mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt. Die Osmolarität der Stammlösungen sowie der Versuchsansätze wurde an einem Gefrierpunktsmometer bestimmt (Kap. 2.13).

2.6.1 Substratsättigungskurve bei -2 °C

Bei jeder Meßreihe wurden 400 mOsmol / kg des jeweiligen Effektors (DMSP, Prolin, Saccharose und NaCl) zugegeben und die Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen (Kap. 2.5.1). Die Meßtemperatur betrug -2 °C. Die Effektoren wurden 20 min bei -2 °C im Wasserbad mit dem Enzym inkubiert, bevor die Reaktion mit Substrat gestartet wurde. Als Kontrolle diente jeweils ein Enzymansatz ohne Effektor (n = 4).

2.6.2 Konzentrationskurve bei -2 °C und 30 °C

Die Enzymaktivität der MDH und der G6P-DH wurde unter Zusatz verschiedener Effekorkonzentrationen (DMSP, Prolin, Saccharose und NaCl) im Substratsättigungsbereich getestet. Die Zusatzstoffe wurden den Küvettenansätzen (Kap. 2.4) in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 mOsmol / kg (vgl. Kap. 2.13) zugesetzt und 20 min im Wasserbad inkubiert, bevor die Reaktion mit Substrat gestartet wurde. Es wurden je zwei Meßreihen bei -2 °C und bei 30 °C durchgeführt. Die Grundaktivität der Küvettenansätze (ohne Zusatz) wurde als Kontrolle vor jeder Meßreihe bestimmt und im Anschluß noch einmal überprüft (n=4).

2.7 Berechnung der V_{\max} - und K_m -Werte

Zur Bestimmung der Konstanten V_{\max} und K_m wurden die gemessenen Initialgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Kap. 2.5.1) in eine linearisierte Form entsprechend der Gleichung ($y = mx + b$) gebracht. Dabei kann die *Michaelis-Menten*-Gleichung in verschiedene Geradengleichungen umgeformt werden, die eine graphische Bestimmung von V_{\max} und K_m erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Auswertung der Meßergebnisse die Umformung der Geradengleichung nach HANES (1932) genutzt, bei der $(S) / v$ gegen (S) aufgetragen wird. Dabei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit und (S) die eingesetzte Substratkonzentration. In Tabelle 3 sind die wichtigsten Eigenschaften dieser Geraden zusammengefaßt.

Tab. 3: Koordinaten, Steigungen und Koordinatenschnittpunkte der sich durch Umformung der *Michaelis-Menten*-Gleichung ergebenden Geraden (nach LASCH 1987).

Abszisse	Ordinate	Steigung	Abszissen-schnittpunkt	Ordinaten-schnittpunkt
(S)	$(S) / v$	$1 / V_{\max}$	$-K_m$	K_m / V_{\max}

Für eine graphische Auswertung war die Darstellung nach *Hanes* am besten geeignet, da die Fehlerverzerrung der einzelnen Meßpunkte am geringsten ist und alle Meßpunkte nach Umformung gleichmäßig gewichtet werden. Demgegenüber hätte eine Darstellung nach *Lineweaver-Burk*, die in der Literatur weit verbreitet ist, die Meßpunkte bei der Transformation in die linearisierte Form recht uneinheitlich gewichtet. Bei der Auswertung nach *Lineweaver-Burk* drängen sich die Meßpunkte im Sättigungsbereich, während sie im niedrigen Substratbereich stark gedehnt und somit überbewertet werden. Die ungleiche Gewichtung der Meßpunkte macht die *Lineweaver-Burk*-Darstellung zu einer sehr ungünstigen Transformation und wurde aus diesem Grund für die Auswertung nicht herangezogen.

2.8 Berechnung der Aktivierungsenergie

Die Meßdaten aus den Temperaturversuchen (Kap. 2.5.3) wurden nach der *Arrhenius*-Gleichung ausgewertet. Die Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen :

$$k = A e^{-E_a / RT}$$

Dabei ist A eine für die untersuchte Reaktion charakteristische Konstante, e die Basis des natürlichen Logarithmus, E_a die Aktivierungsenergie (in $J \cdot mol^{-1}$), R die allgemeine Gaskonstante ($8,3143 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$) und T die absolute Temperatur in Kelvin. Der Faktor ($e^{-E_a/RT}$) gibt den Bruchteil von Teilen an, deren Energie gleich oder größer als die Aktivierungsenergie E_a ist (Maxwell-Verteilungsgesetz). In die Konstante A gehen jene Faktoren ein, welche die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen (Häufigkeit molekularer Zusammenstöße, geometrische Bedingungen).

Durch Umformung der Gleichung kann die Aktivierungsenergie einer Reaktion wie folgt berechnet werden :

$$E_a = 2,303 \cdot R \frac{T_1 - T_2}{T_2 - T_1} \log \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{MORTIMER, 1980})$$

- T_1 = tiefere Temperatur in Kelvin
- T_2 = höhere Temperatur in Kelvin
- k_1 = Stoffwechselrate bei tieferer Temperatur
- k_2 = Stoffwechselrate bei höherer Temperatur
- R = allgemeine Gaskonstante in ($8,3143 J / K \cdot mol$)

Graphisch kann die Aktivierungsenergie direkt als Steigung der Geraden abgelesen werden. Hierbei werden der natürliche Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit ($\ln V$) gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur ($1/T$) in Kelvin aufgetragen.

2.9 Berechnung der Q₁₀-Werte

Die Berechnung der Q₁₀-Werte erfolgte nach einer modifizierten *Van't Hoff'schen*-Gleichung nach KOTTMEIER und SULLIVAN (1988), bei der auch Temperaturintervalle < 10 °C berücksichtigt werden können.

$$\log Q_{10} = \left(\frac{10}{t_1 - t_2} \right) \log \left(\frac{k_1}{k_2} \right)$$

t₁ = höhere Temperatur in (°C)

t₂ = tiefere Temperatur in (°C)

k₁ = Enzymumsatzrate bei höherer Temperatur

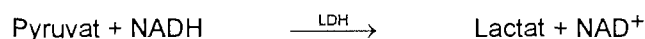
k₂ = Enzymumsatzrate bei tieferer Temperatur

2.10 Gefrierschutzversuche

Die Gefrierschutzversuche wurden mit einem kälte-lablen Testenzym, der Lactat-Dehydrogenase (LDH), durchgeführt. Die LDH wurde von der Fa. Sigma als Isoenzymgemisch (Typ XXX-S; Schweinemuskel) in 2.1 M (NH₄)₂SO₄-Lösung bezogen. 30 µL (~ 320 Units) der Enzymlösung wurden 2 min bei 8000 g abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL 10 mM HEPES-Puffer (pH 6.5) aufgenommen. Mit dieser Prozedur wurden 90% des zur Stabilisierung zugesetzten Ammoniumsulfats entfernt. Das verbliebene Ammoniumsulfat hatte keinen störenden Einfluß auf die Versuche. Falls nicht anders erwähnt, wurden jeweils 4 Parallelen gemessen. Als Bezugsgröße wurde der Proteingehalt bestimmt (Kap. 2.3.3).

2.10.1 Enzymtest - Lactat-Dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27)

Die LDH-Aktivität wurde durch Bestimmung der NADH-Oxidation bei 340 nm am Photometer verfolgt.



Der Standardansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 mL : 80mM HEPES (pH 6.5); 10 mM KCl; 0.15 mM NADH; 1 mM Pyruvat und 10 bis 20 µL LDH (0.002 bis

0,004 mg Protein). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat. Gemessen wurde die Reaktion bei Raumtemperatur (~ 22 °C).

2.10.2 Streßversuche

Getestet wurden die potentiell protektiven Eigenschaften kompatibler Substanzen und anorganischer Salze gegen die Streßfaktoren "schockgefrieren" (-196 °C in flüssigem Stickstoff) und "langames Auftauen" (20 °C Wasserbad).

2.10.2.1 Proteingehalt

Um eine Selbststabilisierung des Enzyms bei den Gefrierversuchen auszuschließen, wurden unterschiedliche Aliquots des Enzymproteins getestet. Die Aliquots wurden mit 200 µL HEPES-Puffer (10 mM) gemischt und 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen im Wasserbad wurde die Aktivität der LDH nach dem Standardansatz bestimmt (Kap. 2.10.1).

2.10.2.2 Zeitkurve

Um die Wirkung der Dauer des Gefrierens zu testen, wurden 10 µL LDH (~0,002 mg Protein) in 100 µL H₂O gemischt und für verschieden lange Zeiträume (0.5 bis 240 min) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Parallel dazu wurden die gleichen Ansätze bei 0 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben im Wasserbad wurde die Aktivität beider Ansätze nach dem Standardansatz bestimmt (Kap. 2.10.1).

2.10.2.3 Gefrieren unter Zusatz von Effektoren

Die LDH wurde unter Zugabe verschiedener anorganischer Salze (NaCl; KCl; NH₄Cl; KBr) sowie der organischen Osmolyte DMSP, Saccharose und Prolin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Effektoren wurden in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 2000 mOsmol / kg zugesetzt (vgl. Kap. 2.13). Die Stammlösungen der Zusätze wurden in 10 mM HEPES angesetzt und auf pH 6.5 eingestellt. Die Osmolarität der Stammlösungen und der Meßproben wurden am Osmometer bestimmt. Das DMSP wurde als Hydrochlorid (Fa. Research Plus, Bayonne, New Jersey, USA) und als Hydrobromid (Synthese, GRÖNE 1991) getestet. Gefroren wurden die Proben in 1.2 mL Reaktionsgefäßen (Eppendorf),

die jeweils 180 µL Effektorlösung unterschiedlicher Osmolarität und 20 µL Enzymlösung (~ 0,004 mg Protein) enthielten. Als sog. "Null-Probe" wurden jeweils 20 µL Enzymlösung und 180 µL HEPES-Puffer gefroren. Vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen wurden die Proben jeweils gut durchmischt. Die Proben wurden im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und dem Küvettenansatz jeweils 100 µL zugesetzt. Die Reaktion wurde nach Zugabe des Substrats gestartet. Vor Versuchsbeginn wurde jeweils die Grundaktivität der LDH im Standardansatz bestimmt, die als Kontrolle diente.

2.11 Wirkung der Temperatur und DMSP auf die LDH

Der Einfluß der Temperatur (0 °C, 5 °C und 30 °C) sowie die Wirkung des DMSP wurden auf die Aktivität der LDH (Typ XXX-S; Schweinemuskel) getestet. Die LDH-Aktivität wurde nach dem Standardansatz aus Kapitel 2.10.1 gemessen. Das DMSP wurde in Eigensynthese (Kap. 2.13) als DMSP-Cl hergestellt und den Küvettenansätzen in zwei Konzentrationen 400 und 1000 mOsmol / kg (Tab. 5) zugesetzt. Als Kontrollen dienten die Standardansätze ohne DMSP-Cl. Die Meßansätze wurden 60 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und danach wurde die Reaktion bei Raumtemperatur (~ 22 °C) und unter Substratsättigung gemessen (n = 4).

2.12 Inhaltsstoffe

Für die Untersuchungen der Inhaltsstoffe wurden beide Isolate der *A. arcta* aus der Arktis und der Antarktis untersucht. Die Algen wurden an -2 °C; 0 °C und 10°C akklimatisiert (Kap. 2.2). Als Bezugsgröße diente jeweils das Frischgewicht der Algen. Bei jedem Experiment wurden, wenn nicht anders angegeben, 4 Parallelen gemessen.

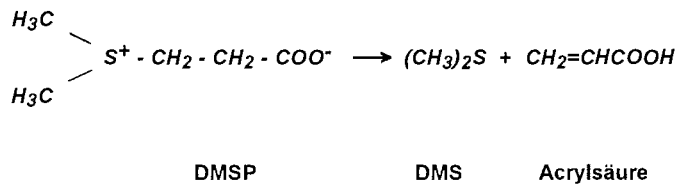
Die Isolate der kalt-temperierten *A. arcta* wurden am AWI, Bremerhaven, nach der Methode von BISCHOFF und WIENCKE (1993) kultiviert. Zur Bestimmung des DMSP-Gehaltes wurden die Isolate in Bremerhaven aufgearbeitet (Kap. 2.12.2) und später in Bremen gaschromatographisch gemessen.

2.12.1 β-Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)

Die gaschromatographische Bestimmung des zellulären DMSP-Gehaltes erfolgte indirekt über den Nachweis von Dimethylsulfid (DMS, WHITE 1982). Die Nachweis-Methode beruht auf einer Spaltung des DMSP-Moleküls unter

Material und Methode

alkalischen Bedingungen in das gasförmige DMS und die wasserlösliche Acrylsäure im Verhältnis 1 : 1 (CHALLENGER 1959).



Nach sorgfältigem Abtupfen und Abwiegen wurden 5 bis 10 mg Algen-Frischgewicht für die DMSP-Bestimmung eingesetzt. Die Algen wurden in mit Teflon-Septen verschraubbaren Glasgefäßen (26 mL) in 6 mL 25%iger NaOH (w / v) für 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde das Gewebe der Pflanzen zerstört und das intrazelluläre DMSP in DMS und Acrylsäure gespalten. Von dem in die Gasphase diffundierten DMS wurden mit Hilfe einer gasdichten Mikroliterspritze Aliquots (50 bis 200 µL) aus dem "headspace" entnommen und in einen Gaschromatographen (Shimadzu GC- 9A, Japan) injiziert.

Das DMS wurde isotherm bei 190 °C über eine mit Chromosorb 101 (80 / 100 mesh) gepackte Teflonsäule (3000*3 mm i.D.) getrennt und mit einem flammenphotometrischen Detektor (FPD) bei 394 nm quantifiziert, mit einer Nachweisgrenze von 10 pmol. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flußrate von 65 mL / min. Das Brenngas für den Detektor bestand aus einem Gemisch von Wasserstoff (0.75 kg / cm²) und Druckluft (0.75 kg / cm²). Die Injektor- und Detektor-Temperatur betrug jeweils 240 °C. Die Detektorsignale wurden mit einem Shimadzu CR-6A-Integrator über die Peakhöhe ausgewertet und über einen Standard quantifiziert. Als Standard diente reines DMSP-CL (1 mg / mg Aqua bidest., Fa. Research Plus).

2.12.2 Prolin

Der Prolingehalt der Algen wurde spektralphotometrisch nach BATES et al. (1973) bestimmt. Dafür wurden 40 bis 80 mg Algenmaterial mit eiskaltem Aqua bidest. gewaschen, um extrazelluläre Ionen zu eliminieren. Anschließend wurde das Frischgewicht nach sorgfältigem Abtupfen auf einer Analysenwaage bestimmt. Diese Proben wurden dann in verschraubbare Zentrifugengläser überführt und mit Aqua bidest. (1 mL / 10 mg Frischgewicht) in einem Wasserbad bei 100 °C für 5 Stunden gekocht (KARSTEN 1991). Nach dem Kochen wurde der Extrakt

bei 4500 g für 10 min abzentrifugiert und aus dem Überstand 100 bis 200 µL für die Prolin-Analyse entnommen.

2.12.3 Saccharose

Die Saccharose-Bestimmung wurde mit einem kommerziellen Enzymtest (Boehringer Nr. 139041, Mannheim) durchgeführt. Die Algen wurden wie bei der Prolin-Bestimmung (Kap. 2.11.2) aufgearbeitet und zur Analyse 50 bis 100 µL unverdünnt aus dem Extrakt eingesetzt.

2.12.4 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurden 40 bis 80 mg Algen-Frischgewicht 2 bis 3 Stunden in 1N NaOH (1mL / 10 mg Frischgewicht) bei 100 °C gekocht und 5 min bei 4500 g abzentrifugiert. 100 µL des Überstands wurden für die Proteinanalyse mit dem Bio-Rad Protein Assay (Kap. 2.3.3) eingesetzt. Als Standard diente Rinderserum-Albumin (p.a., Serva, Heidelberg).

2.12.5 Wachstum

Um eine Abschätzung über den physiologischen Zustand der Algen bei -2 °C machen zu können, wurden die Wachstumsdaten beider *Acrosiphonia*-Isolate nach der Methode von BISCHOFF und WIENCKE (1993) bestimmt. Frau BISCHOFF (AWI, Bremerhaven) erhob die Daten für die 0 °C- und 10 °C-Kulturen.

2.13 DMSP-Synthese

Das in den Versuchen eingesetzte DMSP-Chlorid wurde nach einer modifizierten Methode von LARHER et al. (1977) hergestellt. Die kernresonanzspektroskopische Analyse ergab für das synthetisierte DMSP-Chlorid einen Reinheitsgrad von 95-99% (NMR-Gruppe Universität Bremen). Bei der Schmelzpunktanalyse konnte eine Abweichung von nur 1 °C zum kommerziellen DMSP-Chlorid (Fa. Research Plus) festgestellt werden.

2.14 Verhältnis von Molarität zu Osmolarität

Die Konzentrationen der eingesetzten Effektorstoffe für die Enzymversuche wurden in mOsmol / kg angegeben, um die osmotische Vergleichbarkeit der Stoffe zu gewährleisten. Die Umrechnung von Molarität auf Osmolarität der einzelnen Substanzen erfolgte über den in Tabelle 4 angegebenen osmotischen Koeffizienten. Die Osmolarität der Stammlösung sowie die der angesetzten Proben wurde an einem Gefrierpunktsometer (030, Gonotec, Berlin) bestimmt. Die gemessenen Werte wurden jeweils als direkte Punkte in die Graphiken aufgenommen, so daß es teilweise zu leichten Verschiebungen der eingesetzten Konzentrationen kam.

Tab. 4: Die osmotischen Koeffizienten der eingesetzten Substanzen, die aus dem *Handbook of Chemistry and Physics* (1971) berechnet wurden. Der Koeffizient für Prolin stammt aus der Arbeit von SCHOBERT (1977). Für DMSP wurde der Koeffizient aus der Abb. 3 berechnet.

Substanzen	osmotischer Koeffizient
NaCl	1,85
KCL	1,84
KBr	1,91
NH ₄ Cl	1,84
DMSP*Cl	1,92
DMSP*Br	1,99
Prolin	1,17
Saccharose	1,14

Abbildung 3 gibt die gemessenen Verhältnisse zwischen Molarität und Osmolarität für DMSP-CL wieder. Die Kurve für DMSP wurde mit dem osmotischen Koeffizienten für Chlorid (0,92) aus dem *Handbook of Chemistry and Physics* (1971) berichtigt. Der hieraus berechnete Koeffizient für DMSP betrug $0,999 \pm 0,17$ und wird in Tabelle 4 mit 1 berücksichtigt.

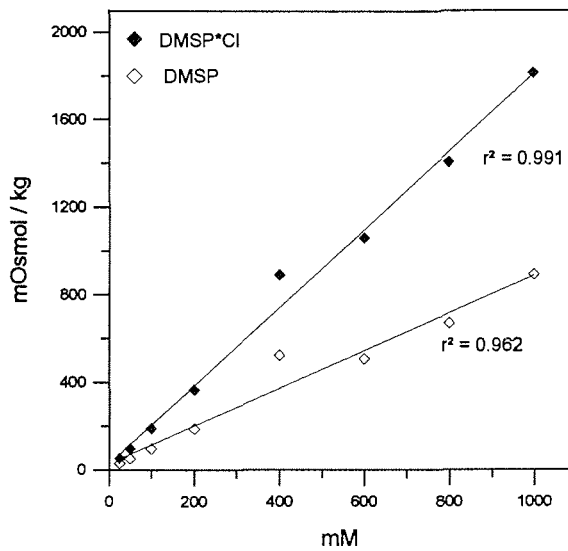


Abb. 3: Verhältnis zwischen Molarität zu Osmolarität für DMSP-CL (*). Als Stammlösung wurde 1M DMSP*Cl in H₂O gelöst (pH 1,34). Die DMSP-Gerade (◊) wurde mit dem Koeffizienten für Chlorid berichtigt. Die Regressionskoeffizienten (r) der Geraden sind angegeben.

Für die Versuchsreihen konnte das eingesetzte DMSP nur als Hydrochlorid oder Hydrobromid synthetisiert werden. Testansätze mit DMSP enthielten daher äquimolare Mengen an Br⁻ oder Cl⁻. Da die DMSP-Zugabe zu einem sehr niedrigen pH-Wert führte, wurde die Stammlösung mit 10 mM HEPES angesetzt und der pH-Wert mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt. Eine 1 M DMSP-Cl-Stammlösung enthielt daher weitere ~ 300 mM Na⁺.

In Tabelle 5 sind die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen, die in der Arbeit als mOsmol / kg angegeben werden, in mol / m³ umgerechnet. Das DMSP wurde jeweils um den Na⁺ - Anteil korrigiert.

Material und Methode

Tab. 5: Umrechnung der eingesetzten osmolaren Konzentrationen der verschiedenen Substanzen in mol / m³. Berechnet aus dem osmotischen Koeffizienten der Tabelle 4. DMSP wurde außerdem um den Na⁺ - Anteil korrigiert.

mOsmol / kg	mol / m ³							
	DMSP-Cl	DMSP-Br	Prolin	Saccharose	NaCl	KCl	KBr	NH ₄ Cl
50	22	21	43	44	27	27	26	27
200	88	86	171	175	108	109	105	107
400	177	171	342	351	216	217	209	217
600	266	257	513	526	324	326	314	326
800	355	342	684	600	432	435	419	435
1000	443	428	855	877	540	543	524	543
1200	531	513	1026	1053	649	652	628	652

3. Ergebnisse

I. ENZYMATIK

3.1 Charakterisierung der Enzyme MDH und G6P-DH

3.1.1 Einfluß der pH-Werte auf die Enzymaktivität

Die Auswirkung der pH-Werte auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus Extrakten der grönländischen *Acrosiphonia arcta* wurde mit unterschiedlichen Puffern, die jeweils in ihrem pK-Bereich eingesetzt wurden, getestet. Die Untersuchungen erfolgten bei 30 °C. Um einen kontinuierlichen Kurvenverlauf zu erhalten, überschneiden sich die pH-Bereiche der einzelnen Puffer.

Die Messung der MDH-Aktivität erfolgte mit vier unterschiedlichen Puffern in einem pH-Bereich von 5,5 bis 9,0 (Abb. 4a). Das pH-Optimum für die Oxidation von Malat lag mit MOPS bei pH 7,5 (obere Grenze des Pufferbereichs), mit HEPES ebenfalls bei pH 7,5, jedoch mit geringerer Aktivität. Der eingesetzte MES-Puffer (pH 5,5 bis 6,5) pufferte unterhalb des pH-Optimums mit einer geringen Enzymaktivität.

Der Bis-Tris-Propan- Puffer konnte in einem breiteren pH-Bereich von 6,5 bis 9,0 eingesetzt werden und bestätigte damit das pH-Optimum der MDH. Dieser Puffer hatte jedoch einen stark negativen Einfluß auf die Enzymaktivität.

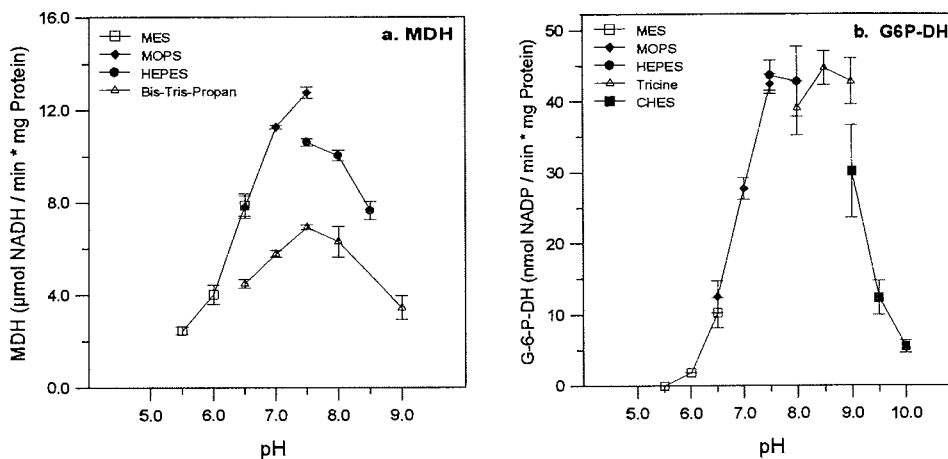


Abb. 4: Einfluß der pH-Werte auf die Aktivität der MDH (a) und G6P-DH (b) aus Extrakten von *A. arcta*. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Die Legende in der Abbildung gibt die eingesetzten Puffer wieder.

Die Aktivität der G6P-DH wurde in fünf unterschiedlichen Puffern in einem pH-Bereich von 5,5 bis 10,0 gemessen (Abb. 4b). Das pH-Optimum für die Reduktion von 6-Phosphogluconolacton wurde durch die eingesetzten Puffer nicht scharf umgrenzt, sondern bildete einen breiten, sattelförmigen Optimumsbereich. Mit HEPES lag das Optimum bei 7,0 bis 7,5, mit Tricin bei 8,0 bis 8,5. Für beide genannten Puffer stellten die genannten pH-Werte die obere Grenze ihres wirksamen Pufferbereichs dar. MES, MOPS und CHES pufferten dagegen unter- bzw oberhalb des pH-Optimums.

3.1.2 Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität

Die Temperaturabhängigkeit der beiden Enzyme MDH sowie G6P-DH wurde in einem Bereich von -2 °C bis 40 °C untersucht. Zuvor waren beide *Acrosiphonia*-Isolate jeweils an 0 °C und 10 °C akklimatisiert worden. Die Auswirkung der Temperatur auf die Enzymaktivität beider Enzyme bei optimaler Substratzugabe wurde für beide Akklimatisierungen und Isolate als *Arrhenius*-Plot dargestellt (Abb. 5 + 6). Hierbei werden der natürliche Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur aufgetragen. Nach der *Arrhenius*-Darstellung ließen alle aufgenommenen Kurven drei charakteristische Abschnitte erkennen. Der erste Bereich wurde durch die niedrigen Temperaturen bestimmt, im zweiten Bereich gehorchte die Reaktionsgeschwindigkeit der *Arrhenius*-Beziehung, während im dritten Abschnitt die Enzymaktivität durch thermische Denaturierung des Proteins beeinflusst wurde. Im Anschluß werden diese Bereiche im einzelnen für die beiden Enzyme, Isolate und Akklimatisierungen besprochen.

Im Anhang sind die Daten des Enzymumsatzes pro mg Protein, bezogen auf die Temperatur, in Tabelle I bis II zusammengefaßt.

MDH

Die MDH der arktischen *A. arcta* wies für beide Akklimatisierungstemperaturen (0 °C und 10 °C) annähernd die gleichen Umsatzraten auf (Abb. 5a). Im Bereich von 0 °C bis 30 °C stieg die Enzymaktivität beider Akklimatisierungen mit der Temperatur linear an. In diesem Temperaturbereich wurde die Enzymaktivität nur durch die Temperatur bestimmt und folgte der *Arrhenius*-Beziehung. Die Temperaturoptima für die Enzymaktivität lagen für beide Kulturen bei 30 °C. Oberhalb dieser Temperatur kam es zu einer thermischen Denaturierung des Enzyms, was durch ein starkes Absinken der Aktivität deutlich wurde.

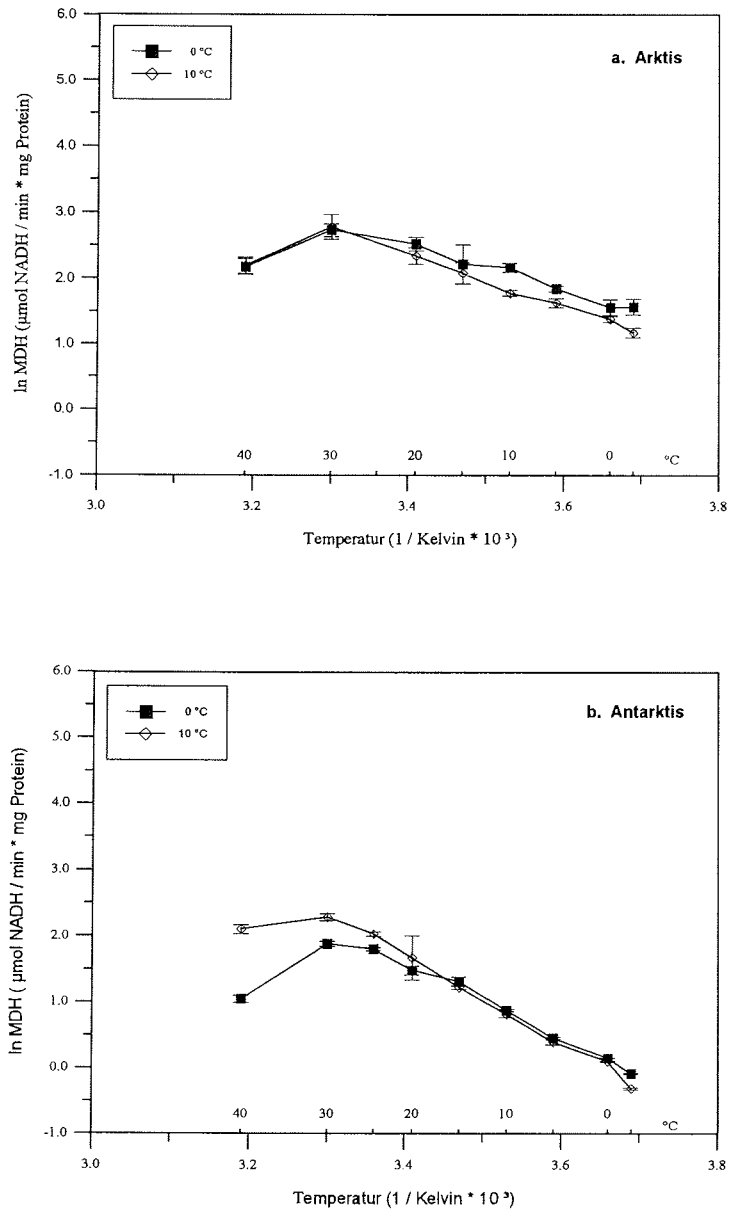


Abb. 5: Arrhenius-Plots der MDH aus Extrakten von *A. arcta* der Arktis (a) und Antarktis (b). Die Algen wurden vor den Messungen an 0 °C und 10 °C akklimatisiert. Die Enzymaktivitäten wurden als ln (Umsatzrate) gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

Ergebnisse

Die berechneten Aktivierungsenergien, die ein Maß für die Effizienz der Enzymaktivität im Bereich der *Arrhenius*-Beziehung geben, sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Aktivierungsenergie für die an 0 °C akklimatisierte *A. arcta* ist mit 26,82 kJ·mol⁻¹ niedriger als die der 10 °C-Kultur mit 32,04 kJ·mol⁻¹. Im unteren Temperaturbereich zwischen -2 °C und 0 °C erwies sich die an 10 °C akklimatisierte *A. arcta* kältesensitiver als die an 0 °C angepaßten Algen. Dies wurde durch das stärkere Abknicken der Geraden deutlich und durch die berechneten Q₁₀-Werte untermauert (Tab. 7). Im Bereich von 0 °C bis 20 °C lag der Q₁₀-Wert beider Kulturen bei 1,62. Bei Temperaturen von -2 °C bis 0 °C wurde bei der 10 °C-Kultur ein Q₁₀-Wert von 2,84 ermittelt. Dies deutet eine stärkere Enzyminhibition bei -2 °C gegenüber 0 °C an. Der Q₁₀ der 0 °C-Kultur zeigte im Bereich von -2 °C bis 0 °C einen Wert von 0,96, dies spricht für eine Temperaturunempfindlichkeit.

Tab. 6: Aktivierungsenergien der MDH und G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta* aus Arktis und Antarktis. Die Algen wurden jeweils an 0 °C und 10 °C akklimatisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (n=4) sowie das Temperaturintervall des linearen Bereiches ($r \geq 0,972$).

	Anzuchttemperatur. (°C)	Temperaturintervall (°C)	Aktivierungsenergie (kJ · mol ⁻¹)
MDH			
Arktis	0	0 - 30	26,82
	10	0 - 30	32,04
Antarktis	0	0 - 25	44,62
	10	0 - 30	54,62
G6P-DH			
Arktis	0	0 - 20	50,59
	10	0 - 25	38,85
Antarktis	0	0 - 25	40,95
	10	0 - 30	37,75

Auch die antarktische *A. arcta* zeigte für die MDH bei beiden Anzuchttemperaturen (0 °C und 10 °C) ähnliche Enzymumsatzraten, wobei die an 10 °C

akklimatisierte Kultur im Bereich des Temperaturoptimums eine höhere Rate aufwies (Abb. 5b). Die Temperatur der optimalen Reaktionsgeschwindigkeit lag bei beiden Kulturen bei 30 °C. Der lineare Bereich der Enzymaktivität, welcher nur durch die Temperatur bestimmt ist, lag für die an 0 °C akklimatisierten Algen in einem Bereich von 0 °C bis 25 °C und für die an 10 °C angepaßten in einem Bereich von 0 °C bis 30 °C. Bei beiden Kulturen konnte ab 30 °C eine thermische Denaturierung des Enzyms beobachtet werden, dabei wurde das Enzym der 0 °C-Kultur wesentlich stärker beeinflusst als das der 10 °C-Kultur. Die Aktivierungsenergie der 0 °C-Kultur lag mit $44,62 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ deutlich niedriger als die der 10 °C mit $54,62 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Im unteren Temperaturbereich (-2 °C bis 0 °C) erwiesen sich beide akklimatisierten Enzyme ähnlich kältesensitiv. Der Q_{10} -Wert lag im Bereich von -2 °C bis 0 °C bei ~ 3 und bei Temperaturen von 0 °C bis 20 °C bei ~ 2 (Tab. 7).

Tab. 7: Q_{10} -Werte der MDH und G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta* der Arktis und Antarktis. Die Algen wurden an 0 °C und 10 °C akklimatisiert. Der Q_{10} -Wert wurde aus den Mittelwerten der Temperaturkurven berechnet.

Temperaturbereich (°C)	Arktis		Antarktis	
	0 °C	10 °C	0 °C	10 °C
MDH				
-2 bis 0	0,96	2,84	3,29	3,00
0 bis 20	1,62	1,62	1,93	2,21
G6P-DH				
-2 bis 0	2,01	3,34	1,28	2,01
0 bis 20	2,14	1,93	1,83	1,75

G6P-DH

Die G6P-DH der arktischen *A. arcta* zeigte für die an 10 °C akklimatisierten Algen höhere Enzymumsatzraten als für die 0 °C-Kulturen (Abb. 6a.). Der lineare Abschnitt der *Arrhenius*-Beziehung verlief für beide Kulturen in einem Bereich von 0 bis 20 °C. Die berechneten Aktivierungsenergien (Tab. 6) waren, im Gegensatz zu denen der MDH, bei den an 0 °C akklimatisierten Algen ($50,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) höher als bei den an 10 °C gewöhnten Algen ($38,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

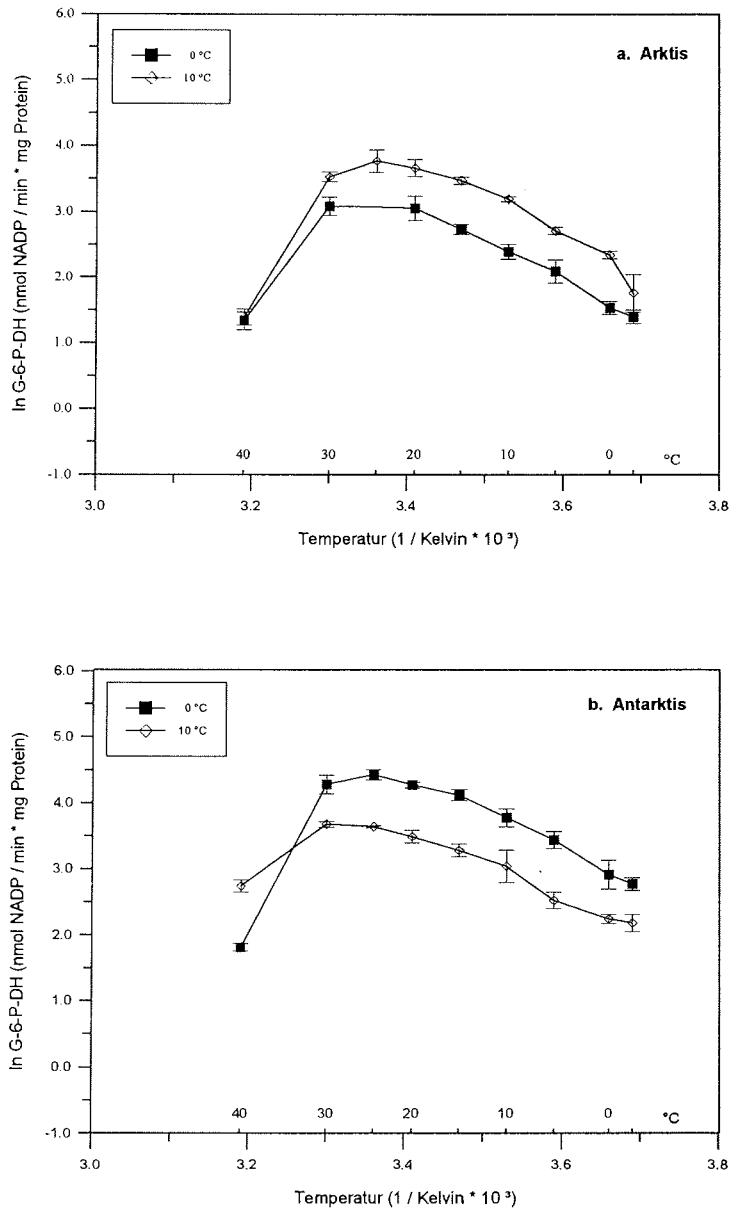


Abb. 6: Arrhenius-Plots der G6P-DH aus Extrakten von *A. arctica* der Arktis (a) und Antarktis (b). Die Algen wurden vor den Messungen an 0 °C und 10 °C akklimatisiert. Die Enzymaktivitäten wurden als ln (Umsatzrate) gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur in Kelvin aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

Aus dem Kurvenverlauf (Abb. 6a) kann das Temperaturoptimum der G6P-DH abgelesen werden (Meßdaten für 25 °C nicht erhoben). Es lag sowohl bei den an 0 °C als auch bei den an 10 °C akklimatisierten Algen bei 25 °C. Die thermische Denaturierung begann bei der G6P-DH oberhalb von 25 °C, wobei der Verlust an Enzymaktivität bis 40 °C wesentlich stärker war als bei der MDH. Im unteren gemessenen Temperaturbereich (0 °C bis -2 °C) erwies sich die G6P-DH bei den Algen aus der 10 °C-Kultur kältesensitiver als bei den Algen aus der 0 °C-Kultur. Der Q_{10} -Wert lag bei der 10 °C-Kultur bei Temperaturen zwischen 0 °C bis 20 °C bei 1,93 und im Bereich von -2 °C bis 0 °C bei 3,34, wodurch eine stärkere Enzyminaktivierung bei -2 °C gegenüber 0 °C deutlich wurde. Bei der 0 °C-Kultur lag der Q_{10} -Wert in beiden Temperaturbereichen um 2 (Tab. 7).

Die G6P-DH aus Extrakten der an 0 °C akklimatisierten antarktischen *A. arctica* zeigte eine wesentlich höhere Umsatzrate als die G6P-DH aus Extrakten von 10 °C- akklimatisierten Algen (Abb. 6b). Die 0 °C-Kultur zeigte ein Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit bei 25 °C, das Optimum der 10 °C-Kultur lag zwischen 25 °C und 30 °C. Die thermischen Denaturierungseffekte begannen bei den 0 °C-Kulturen schon ab 25 °C und waren bis 40 °C wesentlich ausgeprägter als bei den 10 °C-Kulturen. Bei den berechneten Aktivierungsenergien zeigte sich, wie auch schon bei der G6P-DH des arktischen Isolats, daß das an 0 °C akklimatisierte Enzym höhere Werte ($40,95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) aufwies als das an 10 °C akklimatisierte ($37,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Das Enzym aus der 10 °C-Kultur zeigte eine leicht stärkere Kältesensibilität (Tab. 7). Der Q_{10} -Wert lag im Bereich von -2 °C bis 0 °C bei 2,01 und bei Temperaturen zwischen 0 °C bis 20 °C bei 1,75. Bei der 0 °C-Kultur war das Enzym kälteunempfindlicher, zwischen -2 °C bis 0 °C lag der Q_{10} -Wert bei 1,28, dagegen lag der Q_{10} im Temperaturbereich zwischen 0 °C bis 20 °C bei 1,83.

Vergleich MDH und G6P-DH

Bei allen Untersuchungen der MDH zeigte sich, daß das Enzym bei Algen, die an niedrige Temperaturen (0 °C) akklimatisiert waren, eine geringere Aktivierungsenergie aufzeigte als das der Kulturen bei höherer Temperatur (10 °C). Damit wurde die Effizienz des Enzymumsatzes bei niedrigen Temperaturen erhöht. Die G6P-DH folgte diesem Muster nicht. Hier war die Aktivierungsenergie der *A. arctica*, die an niedrige Temperaturen angepaßt war, größer als bei den Algen, die an höhere Temperaturen akklimatisiert wurden. Die Akklimatisierungstemperaturen der Kulturen hatten bei der MDH keinen Einfluß auf das

Ergebnisse

Temperaturoptimum des Enzyms. Bei der G6P-DH aus dem antarktischen Isolat führten die unterschiedlichen Akklimatisationstemperaturen zu einer leichten Verschiebung der optimalen Reaktionsgeschwindigkeit. Die an 0 °C akklimatisierten Algen zeigten ein Optimum bei 25 °C, die an 10 °C akklimatisierten zwischen 25 °C und 30 °C.

Die MDH-Umsatzraten der arktischen *A. arcta* lagen bei beiden Akklimatisationstemperaturen bei 30 °C um 16 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$ und damit deutlich höher als die des antarktischen Isolats. Dieses Isolat wies bei der 0 °C-Kultur 6,52 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$ und bei der 10 °C-Kultur 9,82 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$ auf (Tab. I, siehe Anhang). Auch bei der niedrigen Temperatur von -2 °C zeigte das arktische Isolat höhere Umsatzraten als das antarktische Isolat. Die Umsatzraten der G6P-DH waren hauptsächlich von der Akklimatisationstemperatur abhängig und weniger von dem untersuchten Isolat. Die Umsatzrate beider an 10 °C akklimatisierten Isolate lag bei 30 °C bei 40 $\text{nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$, das an 0 °C akklimatisierte arktische Isolat wies eine Enzymumsatzrate von 72,30 $\text{nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$ auf, wohingegen die antarktische *A. arcta* nur 21,79 $\text{nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$ umsetzte. Die G6P-DH-Aktivität bei -2 °C war bei der antarktischen *A. arcta* höher ($\sim 12,41 \text{ nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$) als bei dem arktischen Isolat ($\sim 4,88 \text{ nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$), aber auch hier hatte die Akklimatisationstemperatur einen Einfluß (Tab. II, siehe Anhang).

3.1.3 Interaktion von Temperatur und Substratkonzentration

Die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH und der G6P-DH wurde in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Temperatur gemessen. Die Messung erfolgte bei drei Temperaturen (-2 °C; 5 °C und 30 °C). Die Ergebnisse wurden als v / S - Diagramme dargestellt und ergaben die klassischen *Michaelis-Menten*-Hyperbeln.

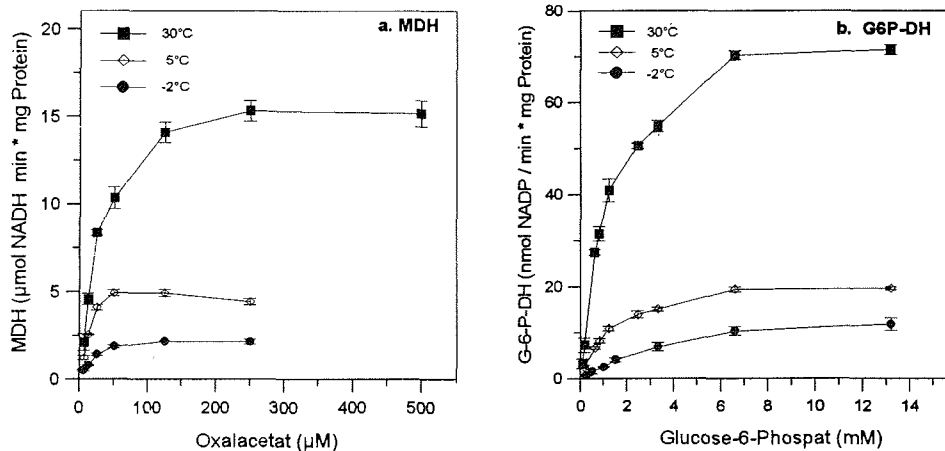


Abb. 7: Einfluß der Temperatur und der Substrate (Oxalacetat und Glucose-6-Phosphat) auf die Aktivität der MDH (a) und G6P-DH (b) aus Extrakten von *A. arcta*. Die Ansätze wurden 20 min bei der angegebenen Temperatur vorinkubiert und mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen versetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$).

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der MDH und der G6P-DH wurden von der Temperatur beeinflusst, dabei blieb die Enzymaktivität bei -2 °C und 5 °C deutlich hinter der Geschwindigkeit von 30 °C zurück (Abb. 7a + b). Die Maximalgeschwindigkeit der MDH bei -2 °C erreichte nur 13,4 % und die des 5 °C-Ansatzes 40,3 % der Aktivität der 30 °C Messung (Tab. 8). Die *Michaelis-Menten*-Konstante (K_M), die einen Wert für die Enzymaffinität zum Substrat darstellt, sank bei der MDH kontinuierlich mit Verminderung der Temperatur von 37,41 μM Oxalacetat bei 30 °C auf 18,40 μM Oxalacetat bei -2 °C (Tab. 8). Die Sättigungsbereiche waren bei den drei Temperatur-Ansätzen unterschiedlich, wobei der 30 °C-Ansatz bei 250 μM Oxalacetat und die Ansätze bei -2 °C und 5 °C schon bei 50 μM Oxalacetat gesättigt waren (Abb. 7a).

Ergebnisse

Tab. 8: Berechnete K_m - und V_{max} -Werte nach *Hanes* für die MDH und G6P-DH aus Extrakten von *A. arctica* in Abhängigkeit der Temperatur. Errechnet aus den Mittelwerten der Substratkurven (n=4).

Temperatur (°C)	K_m	V_{max}
MDH	μM	$\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$
30	37,41	17,70
5	25,33	7,14
-2	18,40	2,37
G6P-DH	mM	$\text{nmol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$
30	1,27	79,25
5	1,23	21,76
-2	4,54	16,25

Abbildung 7b gibt die Reaktionsgeschwindigkeit der G6P-DH wieder. Bei -2 °C lag die Enzymaktivität bei 16,25 nmol NADP / min * mg Protein, dies entsprach 20,5% der Maximalgeschwindigkeit des 30 °C-Ansatzes. Bei 5 °C erreichte die Reaktionsgeschwindigkeit 21,76 nmol NADP / min * mg Protein und erlangte damit 27,46 % der Maximalgeschwindigkeit bei 30 °C (Tab. 8). Der K_m -Wert bei 30 °C lag bei 1,27 nM Glucose-6-phosphat (Substrat), während der bei 5 °C etwas niedriger bei 1,23 nM lag. Bei -2 °C erhöhte sich der K_m -Wert merklich auf 4,54 nM Glucose-6-phosphat und zeigte damit einen deutlichen Unterschied zu den sinkenden K_m -Werten der MDH.

Die Sättigungsbereiche der G6P-DH lagen bei allen drei Temperaturen bei 6,6 mM Glucose-6-phosphat.

3.1.4 Einfluß der Temperatur auf die K_m -Werte der MDH

Die Änderung der Enzym-Substrat-Affinität (E-S-Affinität) der MDH, die durch den K_m -Wert charakterisiert wird, ist in Abhängigkeit von der Temperatur in Abbildung 8 für die arktische *A. arctica* dargestellt. Aufgetragen wurden die K_m -Wert für die an 0 °C und 10 °C akklimatisierten Kulturen.

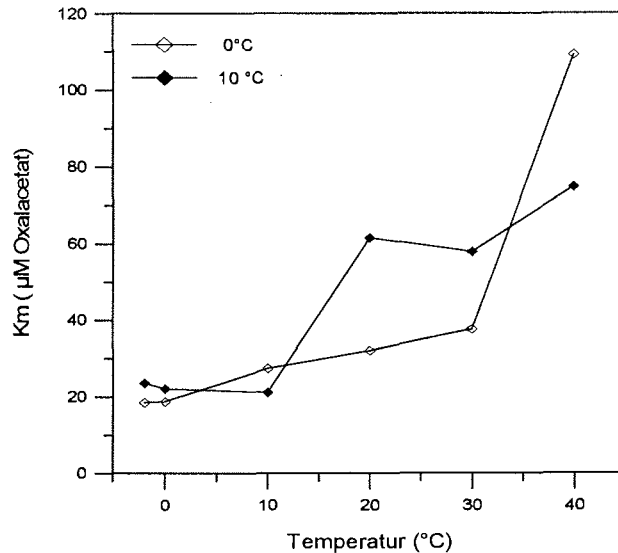


Abb. 8: Die Auswirkung der Temperatur auf den K_M -Wert der MDH (Oxalacetat) aus Extrakten von *A. arcta*. Die Algen wurden an 0 °C und 10 °C akklimatisiert. Berechnet wurden die K_M -Werte nach Hanes ((S) / v gegen (S)). Angegeben sind die Mittelwerte (n=4, Standardabweichung ≤ 10 %).

Die an 0 °C akklimatisierte MDH zeigte bei einer Temperatur von 0 °C bis -2 °C die höchste Substrataffinität, die durch die kleinsten K_M -Werte (-2 °C = 18,40 µM und 0 °C = 18,54 µM Oxalacetat) dargestellt wurde. Mit steigender Temperatur wurde das Substrat schlechter gebunden, dies wurde durch die steigenden K_M -Werte deutlich. Bei Temperaturen höher als 30 °C kam es zu einer drastischen Erhöhung des K_M -Wertes auf 109,16 µM Oxalacetat.

Die MDH, die aus Algen gewonnen wurde, die an 10 °C akklimatisiert waren, zeigte zwischen 0 °C und 10 °C das höchste Substratbindungsvermögen. Der K_M für 0 °C lag bei 21,96 µM Oxalacetat, für 10 °C bei 21,00 µM Oxalacetat. Bei Temperaturen über 10 °C nahm die E-S-Affinität rasch ab, die K_M -Werte erhöhten sich deutlich. Unterhalb von 0 °C wurde die Substrataffinität nur leicht erhöht, der K_M lag bei 23,44 µM Oxalacetat.

3.1.5 Einfluß der Substratkonzentration auf die Q_{10} -Werte

Die Temperaturkoeffizienten (Q_{10} -Werte) zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Tab. 9 + 10). Mit abnehmender Oxalacetat-konzentration nahmen auch die Q_{10} -Werte der MDH für beide Akklimatisations-temperaturen (0 °C-Kultur und 10 °C-Kultur) ab (Tab. 9). Bei allen nicht gesättigten Konzentrationen (unterhalb von 50 μM Oxalacetat) wurden stark sinkende Q_{10} -Werte beobachtet. Ab 12,5 μM Oxalacetat konnte bei einer Temperatur von 0 °C für beide akklimatisierten Enzyme höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden als bei 10 °C, dies wird durch die in der Tabelle 9 dargestellten Q_{10} -Werte < 1 deutlich.

Tab. 9: Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) für die MDH aus Extrakten von *A. arcta* bei verschiedenen Oxalacetatkonzentrationen. Die Substratsättigung liegt bei 125 μM Oxalacetat. Die Algen wurde an 0 °C und 10 °C akklimatisiert.

Substratkonzentrationen (μM Oxalacetat)	Q_{10} (Temperaturbereich 0 °C bis 10 °C)	
	0 °C-Kultur	10 °C-Kultur
500	2,01	1,95
250	1,82	1,84
125	1,82	1,68
50	1,62	1,50
25	1,22	1,12
12,5	0,75	0,80
6,25	0,71	0,63

Bei der G6P-DH konnte mit abnehmender Glucose-6-phosphatkonzentration eine Zunahme der Q_{10} -Beträge ermittelt werden (Tab. 10). Bei allen nicht gesättigten Substratkonzentrationen, unterhalb von 3,3 mM Glucose-6-phosphat, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Q_{10} -Werte. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei -2 °C wurde gegenüber 5 °C somit nicht ausgeglichen ($Q_{10} > 1$). Die Temperaturintervalle der MDH und G6P-DH für die Berechnung der Q_{10} -Werte unterscheiden sich, da für die G6P-DH nicht alle Substratsättigungskurven des gesamten Temperaturbereiches von -2 °C bis 40 °C aufgenommen wurden. Für die G6P-DH wurden keine unterschiedlichen Akklimatisierungstemperaturen betrachtet.

Tab. 10: Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) für die G6P-DH aus Extrakten von *A. arctica* bei verschiedenen Glucose-6-phosphatkonzentrationen. Die Substratsättigung liegt oberhalb von 3,3 mM Glucose-6-phosphat.

Substratkonzentrationen (mM Glucose-6-phosphat)	Q_{10} (Temperaturbereich -2 °C bis 5 °C)
13,2	2,06
6,6	2,45
3,3	3,06
1,5	3,98
1,0	5,24
0,5	7,70

3.2 Wirkung verschiedener Effektoren auf MDH und G6P-DH

Die Wirkung verschiedener Effektoren, wie DMSP-Cl, Saccharose, Prolin und NaCl wurden an den Enzymen MDH und G6P-DH aus Extrakten der grönländischen *A. arctica* untersucht. Dabei wurden Untersuchungen zur Salz- und Temperaturbelastung durchgeführt. Die Konzentration der Verbindungen (Effektoren) ist in mOsmol / kg angegeben, für eine Umrechnung in mol / m³ siehe Tabelle 5 in Kapitel 2.13.

Für die Versuchsreihen konnte das eingesetzte DMSP nur in Verbindung mit Hydrochlorid synthetisiert werden. Testansätze mit DMSP enthielten daher äquimolare Mengen an Cl⁻. Nach Beendigung der Versuchsreihen wurden die eingesetzten DMSP-Mengen mittels GC-Analyse überprüft und konnten bis zu einem Verlust von max. 20 % wiedergefunden werden.

3.2.1 Einfluß der Effektoren bei Unterkühlung (-2 °C)

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der MDH sowie der G6P-DH wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Ab- und Anwesenheit verschiedener Substanzen (DMSP-Cl, Saccharose, Prolin und NaCl) gemessen (Abb. 9 + 11). Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von -2 °C, um die Wirkung der Substanzen auf die Enzymkinetik zu testen. Die MDH und G6P-DH zeigten bei -2 °C gegenüber 30 °C eine deutlich verminderte Aktivität, die jedoch über einen Zeitraum von mehreren Stunden stabil blieb.

MDH

Die katalytische Aktivität der MDH wurde durch die eingesetzten Effektoren unterschiedlich beeinflusst. (Abb. 9). Prolin rief bei allen Substratkonzentrationen eine Aktivierung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle hervor. Saccharose aktivierte die Enzymumsatzraten nur bis zu einer Konzentration von 25 μM Oxalacetat, während sich bei Substratsättigung eine Inhibierung ergab. Das eingesetzte DMSP-Cl wirkte in weiten Bereichen leicht inhibierend auf die Enzymaktivität. Nur im unteren Konzentrationsbereich (bis 12,5 μM Oxalacetat) hatte es keinen negativen Effekt auf die Umsatzrate. Die MDH wird als stark salzempfindliches Enzym beschrieben (BERGMAYER 1983), so daß der inhibierende Effekt wahrscheinlich auf den Einfluß des Chlorids zurückzuführen ist. Diese These wird noch gestützt durch den ebenfalls stark inhibierenden Einfluß des NaCl als Zusatz.

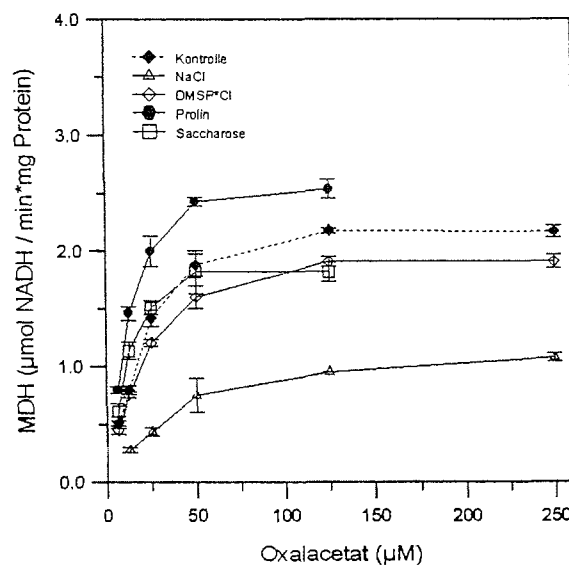


Abb. 9: Einfluß der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener Effektoren (400 mOsmol / kg) auf die Aktivität der MDH aus Extrakten von *A. arcta*, Meßtemperatur -2 °C. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Die gestrichelte Linie gibt die Kontrolle ohne Effektor an.

Die Darstellung nach *Hanes* (S/v gegen S) ließ für den Effektor NaCl einen "nicht-kompetitiven Hemmtyp" erkennen (Abb. 10b), bei dem sowohl die Konstante K_m als auch V_{max} beeinflusst wurde. Dabei erhöhte sich der K_m um das 2,3-fache, und der V_{max} -Wert wurde, bezogen auf die Kontrolle, um einen Quotienten von 1,9 erniedrigt (Tab. 11). DMSP-Cl zeigte bei der *Hanes*-Auftragung (Abb. 10a)

einen gemeinsamen Schnittpunkt mit der Kontrolle auf der Abszisse, d.h. der K_M -Wert wurde nur unwesentlich beeinflusst (Tab. 11). Die Maximalgeschwindigkeit dagegen nahm im Vergleich zur Kontrolle leicht ab. Prolin und Saccharose als Aktivatoren (Abb. 10c + d) zeigten bei der *Hanes*-Auftragung einen leicht reduzierten K_M -Wert, also eine erhöhte Enzymaffinität zum Substrat und eine leicht gestiegene Maximalgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 11). Prolin erreichte mit der Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit etwa 16,4% der Maximalgeschwindigkeit bei 30 °C (Tab. 8), dies entsprach einer Erhöhung von 3,0% (0,53 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$) im Vergleich zur Kontrolle (-2 °C). Saccharose erreichte dagegen nur 14,2% der maximalen Geschwindigkeit (30 °C), auf die Kontrolle bezogen entsprach dies einem Anstieg von 0,8% (0,14 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$). Im Vergleich zu 30 °C (Tab. 8, Kap. 3.1.3) wurde der K_M -Wert mit Saccharose um einen Quotienten von 2,2 und bei Prolin von 2,3 bei -2 °C erniedrigt.

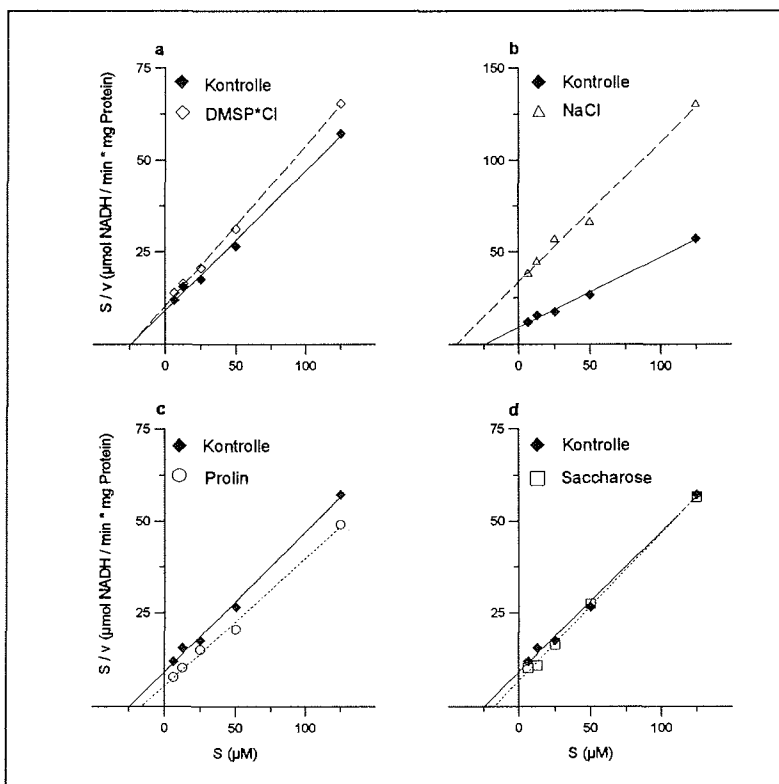


Abb. 10: *Hanes* - Plot der MDH aus Extrakten von *A. arcta* in Anwesenheit verschiedener Substanzen (400 mOsmol / kg): a) DMSP-Cl, b) NaCl, c) Prolin, d) Saccharose. Temperatur - 2 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Parallelen. Enzymaktivitäten rechts von der Kontrolle bedeutet Aktivierung, links davon Inhibition.

Ergebnisse

Tab. 11: Berechnete K_M - und V_{max} -Werte verschiedener Effektoren nach *Hanes* für die MDH aus Extrakten von *A. arcta*. Errechnet aus den Mittelwerten der Substratkurven ($n=4$). Der Korrelationskoeffizient (r) für die einzelnen Substanzen war $\geq 0,99$.

Zusatz	K_M (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol NADH} / \text{min}\cdot\text{mg Protein}$)
Kontrolle	18,40	2,37
DMSP-Cl	18,97	2,10
Saccharose	17,38	2,51
Prolin	15,96	2,92
NaCl	41,69	1,27

G6P-DH

Die G6P-DH konnte bei $-2\text{ }^\circ\text{C}$ von allen eingesetzten Effektoren und bei allen Substratkonzentrationen aktiviert werden (Abb. 11). Dabei war die Aktivierung der G6P-DH durch Prolin am stärksten. Saccharose wirkte im unteren Konzentrationsbereich (bis $1,65\text{ nM}$ Glucose-6-phosphat) genauso stimulierend auf die Enzymaktivität wie Prolin, im Bereich der Substratsättigung war die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch etwas langsamer. Das DMSP-Cl als Zusatz aktivierte das Enzym im unteren Substratbereich etwas schlechter als Prolin und Saccharose, im Sättigungsbereich erreichte es aber die Reaktionsgeschwindigkeit von Saccharose. Die G6P-DH erwies sich im Gegensatz zur MDH als salzunempfindliches Enzym. Der Effektor NaCl zeigte bis zu einer Substratkonzentration von 1 nM Glucose-6-phosphat keine Aktivierung, dann aber stieg die Aktivität deutlich über die der Kontrolle, blieb aber unterhalb derer von DMSP-Cl, Saccharose und Prolin zurück.

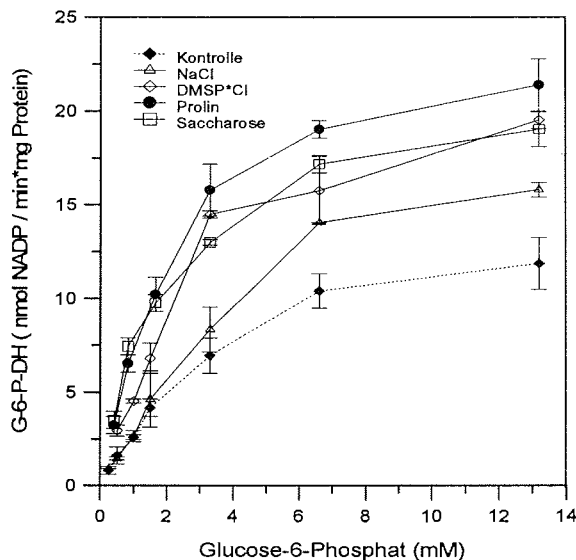


Abb. 11: Einfluß der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener Effektoren (400 mOsmol / kg) auf die Aktivität der G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta*. Meßtemperatur -2 °C. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Die gestrichelte Linie gibt die Kontrolle ohne Effektor an.

Der *Hanes*-Plot für die G6P-DH zeigte ebenfalls eine Aktivierung der einzelnen Effektoren und untermauert prinzipiell die Ergebnisse des *v / S*-Diagramms (Abb. 11), zeigte jedoch die Unterschiede in den Verhältnissen der einzelnen Aktivatoren zueinander noch erheblich deutlicher (Abb. 12a bis d).

Die Konstante K_m wurde beim NaCl im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht, und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit stieg um das 1,2-fache an (Tab. 12). Bei den eingesetzten organischen Verbindungen wurden sowohl die Konstante K_m als auch die Maximalgeschwindigkeit positiv beeinflusst (Tab. 12). Der K_m -Wert nahm bei DMSP-Cl, Saccharose und Prolin ab, blieb aber höher als der K_m bei hohen Temperaturen (30 °C, Kap. 3.1.3; Tab. 8). D.h. die Enzymaffinität zum Substrat wurde durch die Effektoren zwar erhöht, blieb aber unterhalb der maximalen Affinität bei 30 °C. Der negative Effekt der Temperatur auf die Konstante K_m wurde durch die eingesetzten organischen Substanzen nicht vollständig kompensiert (Kap. 3.1.3). Der V_{max} -Wert wurde beim DMSP-Cl und Saccharose um das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht, dies entsprach etwa 27,7% der Maximalgeschwindigkeit bei 30 °C und einem Zuwachs von 7,2% im Vergleich zur Kontrolle (5,7 nmol NADP / min * mg Protein). Das Prolin erhöhte die Reaktionsgeschwindigkeit um das 1,6-fache und erreichte damit 32,3% der Maximalgeschwindigkeit bei 30 °C, dies entsprach einer Erhöhung von 11,8% (9,4 nmol NADP / min * mg Protein) im Vergleich zur Kontrolle.

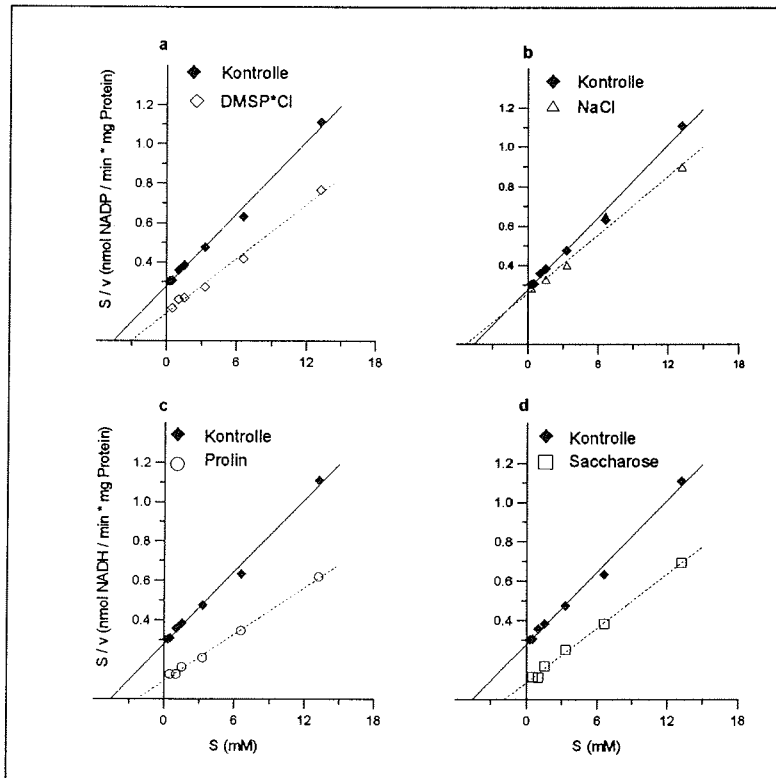


Abb. 12: Hanes - Plot der G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta* in Anwesenheit verschiedener Substanzen (400 mOsmol / kg): a) DMSP-Cl, b) NaCl, c) Prolin, d) Saccharose. Temperatur - 2 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Parallelen. Enzymaktivitäten rechts von der Kontrolle bedeutet Aktivierung, links davon Inhibition.

Tab. 12: Berechnete K_m - und V_{max} -Werte verschiedener Effektoren nach Hanes für die G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta*. Errechnet aus den Mittelwerten der Substratkurven (n=4). Der Korrelationskoeffizient (r) für die einzelnen Substanzen war $\geq 0,98$.

Zusatz	K_m (mM)	V_{max} (nmol NADP / min*mg Protein)
Kontrolle	4,54	16,25
DMSP-Cl	3,21	21,89
Saccharose	1,99	21,94
Prolin	2,45	25,63
NaCl	5,30	20,23

Vergleich MDH und G6P-DH

Insgesamt reagierte die MDH bei Unterkühlung und bei Zusatz der Aktivatoren Prolin und Saccharose jeweils mit einer Verminderung des K_m -Wertes und somit einer besseren Ausnutzung der Substratbindung unter Substratlimitierung. Ohne den negativen Effekt des Chlorids würde das DMSP wahrscheinlich diesem Muster folgen. Die G6P-DH konnte den Einfluß der Temperatur, auch in Anwesenheit der Aktivatoren, nicht vollständig kompensieren. Die K_m -Werte waren zwar im Vergleich zur Kontrolle geringer, blieben aber oberhalb des K_m -Wertes von 30 °C (vgl. Kap. 3.1.3). Dafür wirkten bei diesem Enzym die Aktivatoren stärker auf die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, die dadurch so hoch lag wie die Maximalgeschwindigkeit bei 5 °C (Kap. 3.1.3; Tab. 8).

3.2.2 Interaktion von Temperatur und Effekorkonzentrationen

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von DMSP-Cl, NaCl, Prolin und Saccharose auf die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH sowie G6P-DH wurde bei 30 °C und -2 °C gemessen. Die Enzymaktivitäten wurden mit Konzentrationen der verschiedenen Substanzen im Bereich von 50 bis 1000 mOsmol / kg (vgl. Tab. 5) 20 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und anschließend bei Substratsättigung bestimmt. Die Enzymumsatzraten sind in Abbildung 13 und 14 für die MDH und für die G6P-DH (bezogen auf $\mu\text{mol NADH}$ bzw. $\text{nmol NADP} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$) dargestellt. Die spezifische Aktivität der Enzyme war aufgrund der nur partiell gereinigten Extrakte leicht unterschiedlich (vgl. Kap. 2.3.2), so daß die Grundaktivität in den Ansätzen zum Teil differiert. Die Testansätze mit DMSP-Cl wurden mit beiden Isolaten von *A. arcta* durchgeführt, alle weiteren nur mit dem arktischen Isolat.

MDH

In Abbildung 13a + b sind die Ergebnisse für DMSP-Cl am arktischen und antarktischen Isolat von *A. arcta* dargestellt. Für beide Isolate wurde bei 30 °C die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH kontinuierlich durch steigende DMSP-Cl-Konzentrationen gehemmt. Dabei wirkte sich der hemmende Einfluß bei dem arktischen Isolat stärker aus als bei dem antarktischen. Bei 1000 mOsmol / kg DMSP-Cl erreichte die arktische *A. arcta* nur noch 31,9% der Anfangsgeschwindigkeit, das antarktische Isolat aber noch 54,0%. Bei der Unterkühlungstemperatur von -2 °C wurde bei beiden Isolaten auch mit steigender

Konzentration keine Hemmung der Enzymaktivität beobachtet. Vielmehr konnte bei beiden Isolaten zwischen 600 und 800 mOsmol / kg eine leichte Aktivierung der Reaktionsgeschwindigkeit, die über die Bandbreite der Standardabweichung hinausging, gemessen werden (SD der Kontrolle 4%). Die Enzymaktivität bei -2 °C betrug für beide Isolate etwa 10% der maximalen Aktivität bei 30 °C. Die Erhöhung der Aktivität durch DMSP-Cl erreichte, bezogen auf die Kontrollaktivität bei 30 °C, bei beiden Extrakten etwa 2%. Bei 1000 mOsmol / kg DMSP-Cl sank die Aktivität der arktischen und der antarktischen MDH wieder auf die Anfangsaktivität.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH wurde durch den Effektor NaCl bei beiden Temperaturen mit steigender Konzentration kontinuierlich gehemmt (Abb. 13c). Bei 1000 mOsmol / kg NaCl erreichte der 30 °C Ansatz nur noch 19,2% der Anfangsgeschwindigkeit, dies entsprach etwa der Geschwindigkeit von -2 °C ohne Zusatz. Die Enzymaktivität des -2 °C-Ansatzes war ab einer Konzentration von 800 mOsmol / kg NaCl fast völlig gehemmt.

Prolin als Effektor-Substanz zeigte für beide Temperaturen über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg keine destabilisierende Wirkung auf die Aktivität der MDH (Abb. 13d). Die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten beider Temperaturen lagen in der Bandbreite ihrer jeweiligen Standardabweichung (SD der Kontrollen $\leq 9\%$).

Durch steigende Saccharose-Konzentrationen wurde die Enzymaktivität der MDH bei Substratsättigung bei beiden Temperaturen vermindert (Abb. 13e). Die Hemmung der Aktivität war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Testansatz mit NaCl. Bis zu 200 mOsmol / kg Saccharose wurde die Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen nur leicht vermindert, dann aber fiel die Enzymaktivität kontinuierlich ab. Bei 800 mOsmol / kg Saccharose erreichte der 30 °C Ansatz 74,2% der Anfangsaktivität, der -2 °C Ansatz hingegen nur noch 54,0%. Der Wert für 1000 mOsmol / kg Saccharose fehlt, da bei der Überprüfung der Osmolarität der 1000er-Wert dem von 800 mOsmol / kg entsprach.

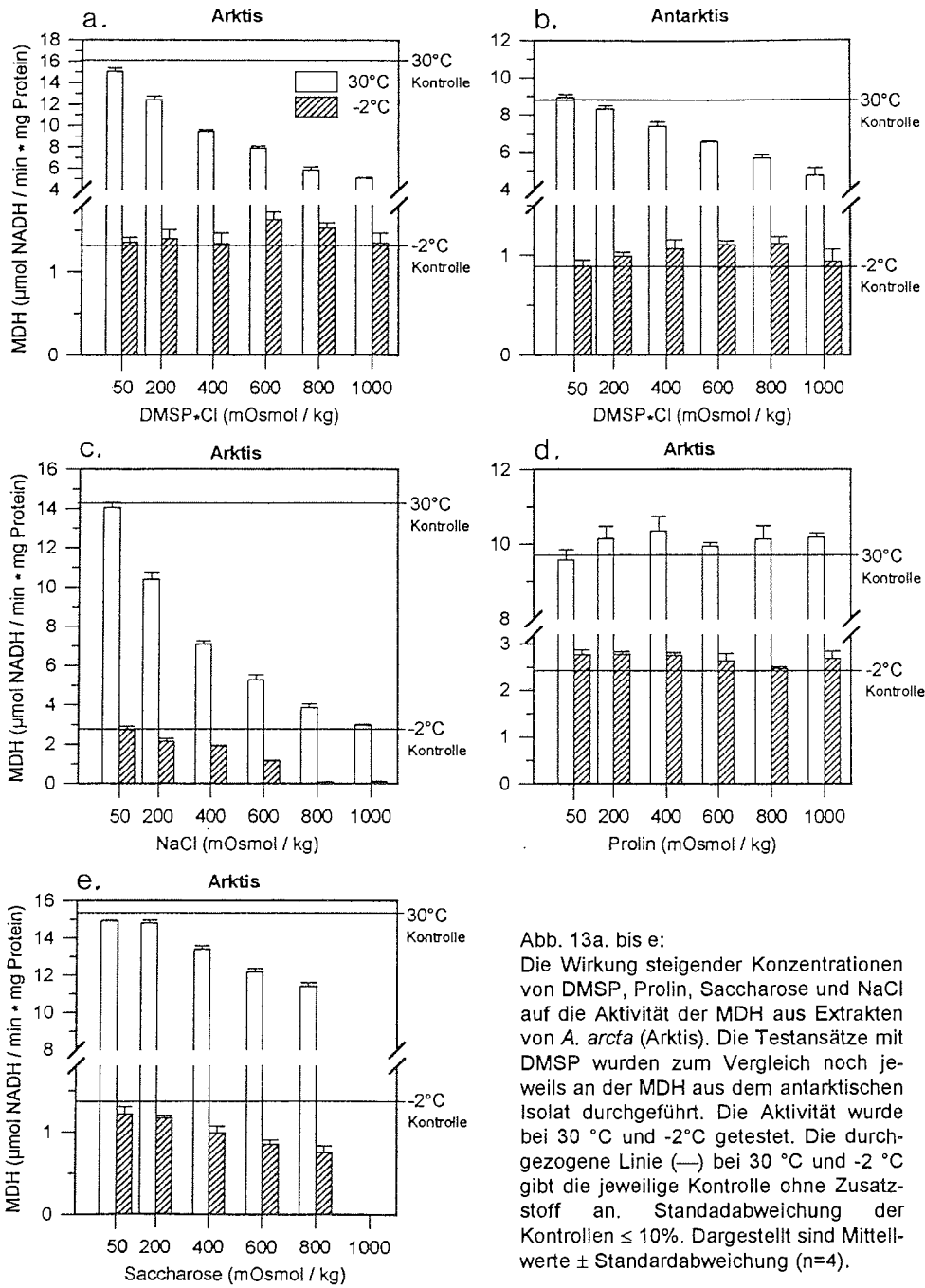


Abb. 13a. bis e:
 Die Wirkung steigender Konzentrationen von DMSP, Prolin, Saccharose und NaCl auf die Aktivität der MDH aus Extrakten von *A. arcfa* (Arktis). Die Testansätze mit DMSP wurden zum Vergleich noch jeweils an der MDH aus dem antarktischen Isolat durchgeführt. Die Aktivität wurde bei 30 °C und -2°C getestet. Die durchgezogene Linie (—) bei 30 °C und -2 °C gibt die jeweilige Kontrolle ohne Zusatzstoff an. Standardabweichung der Kontrollen $\leq 10\%$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

G6P-DH

Der Einfluß der Effektorkonzentrationen auf die Aktivität der G6P-DH bei 30 °C und -2 °C ist in den Abbildungen 14a bis e dargestellt.

Die Aktivität der G6P-DH wurde durch steigende DMSP-Cl - Konzentrationen bei beiden Temperaturen leicht erhöht (Abb. 14a.+ b.). Dabei wurden die 30 °C-Ansätze der arktischen *A. arcta* stärker stimuliert als die der antarktischen. Bis 400 mOsmol / kg DMSP-Cl stieg das arktische Isolat auf 134,4% der Anfangsaktivität und blieb bis 1000 mOsmol / kg annähernd auf diesem Niveau. Die Aktivierung der Reaktionsgeschwindigkeit lag ab 200 mOsmol / kg DMSP-Cl deutlich oberhalb der Bandbreite der Standardabweichung (SD der Kontrolle 2%). Die G6P-DH des antarktischen Isolats erreichte bei 400 mOsmol / kg DMSP-Cl etwa 120,6% der Anfangsaktivität und wurde bis 1000 mOsmol / kg auf 123,3% aktiviert. In diesem Bereich lag die Aktivierung oberhalb der Standardabweichung (SD der Kontrolle 5%). Die Enzymansätze bei -2 °C wurden bei beiden Isolaten im Vergleich zu ihrer Kontrolle (SD ≤ 5%) durch Zugabe von DMSP-Cl aktiviert, blieben aber deutlich unter der Kontrollaktivität bei 30 °C. Die Aktivität des arktischen Isolats bei -2 °C stieg schon bei 50 mOsmol / kg DMSP-Cl auf 131,7% der Anfangsgeschwindigkeit. Dies entsprach, bezogen auf 30 °C, einer Aktivierung von 7,9%. Bei der G6P-DH aus Extrakten der antarktischen *A. arcta* wurde eine Aktivierung im Bereich zwischen 200 und 600 mOsmol / kg DMSP-Cl gemessen. Hier erreichte die Reaktionsgeschwindigkeit 134,7% der Anfangsgeschwindigkeit, dies entsprach einer Aktivierung von 11,7%, bezogen auf die 30 °C-Kontrolle. Die Enzymaktivität beider Isolate verminderte sich oberhalb von 800 mOsmol / kg, blieb jedoch auch bei 1000 mOsmol / kg noch auf dem Niveau der Kontrollaktivität.

NaCl zeigte bis 600 mOsmol / kg bei 30 °C keinen hemmenden Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit der G6P-DH (Abb. 14c.). Oberhalb von 800 mOsmol / kg NaCl fiel die Aktivität deutlich unter die Kontrollaktivität. Bei 1000 mOsmol / kg NaCl wurden noch 56,7% der Anfangsaktivität gemessen. Die Enzymaktivität bei -2 °C lag über dem gesamten Konzentrationsbereich um 100% der Anfangsgeschwindigkeit.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der G6P-DH wurde bei 30 °C durch steigende Prolin-Konzentrationen leicht verringert (Abb. 14d.). Bis zu 50 mOsmol / kg Prolin blieb die Aktivität unverändert zur Kontrolle. Mit steigender Konzentration verminderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit und betrug bei 1000 mOsmol / kg noch 79,0% der anfänglichen Aktivität. Die Messungen bei -2 °C ergaben mit steigender Prolin-Konzentration keine Hemmung der Enzymaktivität. Ab 400 mOsmol / kg Prolin kam es zu einer Erhöhung der Aktivität, die oberhalb der

Bandbreite der Standardabweichung der Kontrolle lag (SD der Kontrolle 5%). Die Aktivierung betrug 133,6% der Anfangsgeschwindigkeit, bezogen auf die 30 °C-Kontrolle machte dies eine Erhöhung von 7,7% aus. Bei 800 und 1000 mOsmol / kg fiel die Reaktionsgeschwindigkeit wieder auf die Kontrollaktivität zurück.

Mit zunehmender Saccharose-Konzentration wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der G6P-DH bei beiden Temperaturen erhöht (Abb. 14e.). Bei 30 °C kam es bis 800 mOsmol / kg Saccharose zu einer kontinuierlichen Stimulierung der Aktivität auf 139,4% der Anfangsgeschwindigkeit. Die Enzymansätze bei -2 °C wurden ab 200 mOsmol / kg Saccharose auf 155,7% der Anfangsgeschwindigkeit aktiviert, und erst oberhalb 800 mOsmol / kg fiel die Aktivität leicht ab (144,8%). Die Enzymaktivität (-2 °C), bezogen auf 30 °C, betrug ohne Saccharose 17,5%, mit 600 mOsmol / kg Saccharose wurde eine Erhöhung von 10,4% erreicht.

Vergleich MDH und G6P-DH

Insgesamt wurde die MDH aus Extrakten von *A. arcta* mit zunehmender DMSP-Cl-Konzentration bei 30 °C in ihrer Aktivität gehemmt. Demgegenüber wurde die Enzymumsatzrate mit steigendem DMSP-Gehalt bei -2 °C nicht inhibiert, sondern in höheren Konzentrationen geringfügig aktiviert. Die G6P-DH zeigte dagegen bei beiden Temperaturen eine Aktivierung der Enzymaktivität. Die Höhe der Aktivierung war jedoch konzentrations-, temperatur- sowie isolatabhängig. NaCl zeigte auf Grund der Salzeempfindlichkeit der MDH bei beiden Temperaturen mit steigender Konzentration eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei der G6P-DH wurde die Enzymaktivität dagegen nur bei hohen NaCl-Konzentrationen (800 und 1000 mOsmol / kg) bei 30 °C vermindert, bei -2 °C blieb die Anfangsaktivität über den gesamten Konzentrationsbereich erhalten. Prolin wirkte über den gesamten Konzentrationsbereich bei beiden Temperaturen nicht destabilisierend auf die MDH-Aktivität. Die G6P-DH-Aktivität nahm dagegen bei 30 °C mit zunehmender Prolin-Konzentration etwas ab. Bei -2°C wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ab 400 mOsmol / kg Prolin leicht stimuliert und fiel oberhalb 600 mOsmol / kg auf die Anfangsaktivität zurück. Die Aktivität der MDH nahm bei beiden Temperaturen mit steigender Saccharose-Konzentration kontinuierlich ab. Auch bei der Aufnahme der Substratsättigungskurven (-2 °C) hatte Saccharose unter Substratsättigung einen hemmenden Einfluß auf die MDH-Aktivität (Kap. 3.13). Bei der G6P-DH wurde die Reaktionsgeschwindigkeit durch Saccharose bei beiden Temperaturen deutlich erhöht.

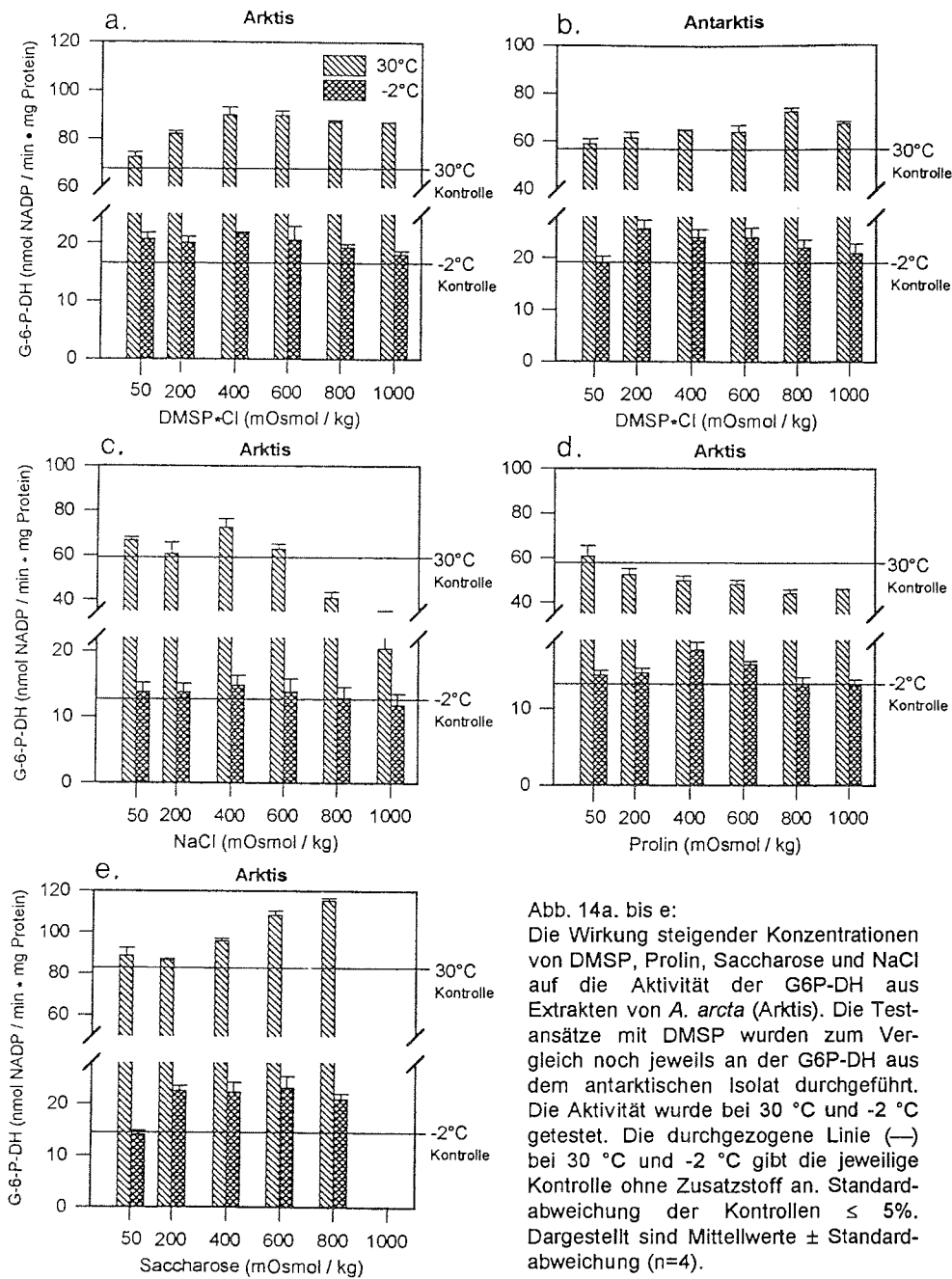


Abb. 14a. bis e:
 Die Wirkung steigender Konzentrationen von DMSP, Prolin, Saccharose und NaCl auf die Aktivität der G6P-DH aus Extrakten von *A. arctica* (Arktis). Die Testansätze mit DMSP wurden zum Vergleich noch jeweils an der G6P-DH aus dem antarktischen Isolat durchgeführt. Die Aktivität wurde bei 30 °C und -2 °C getestet. Die durchgezogene Linie (—) bei 30 °C und -2 °C gibt die jeweilige Kontrolle ohne Zusatzstoff an. Standardabweichung der Kontrollen $\leq 5\%$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

3.3 Gefrierschutzversuche an der kältelabilen LDH

Die Erfassung der Schutzwirkung anorganischer Salze und kompatibler Substanzen nach Gefrieren und Wiederauftauen erfolgte an einem Testenzym, der Lactat-Dehydrogenase (LDH), die bekanntermaßen als Modell für labile, native Konformationen Verwendung findet. Die Enzymumsatzraten zu den Gefrierschutz-versuchen sind jeweils prozentual in Relation zur Anfangsaktivität bei 20 °C dargestellt. Die Daten, bezogen auf NADH-Umsatz pro mg Protein, sind als Tabellen im Anhang zusammengestellt (Tab. III + IV). Die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen sind in mOsmol / kg angegeben, für die Umrechnung in mmol / m³ siehe Kapitel. 2.14, Tabelle 5.

3.3.1 Selbststabilisierung

Der Effekt der Selbststabilisierung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach einmaligem Gefrieren und anschließendem Auftauen mit steigender Proteinkonzentration ist in Abbildung 15 dargestellt. Angegeben ist die Restaktivität der LDH nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen im Wasserbad (20 °C) bezogen auf die Anfangsaktivität (100%). Die Graphik zeigt, daß die Resistenz gegen schnelles Einfrieren und langsames Auftauen mit steigender Enzymkonzentration (= Proteinkonzentration) bei der LDH zunahm. Bei den übrigen Experimenten zum Gefrierschutz wurde aufgrund dieser Ergebnisse eine Proteinkonzentration (ca. 3 µg Protein / mL Testansatz) mit einer geringen Kapazität an Selbststabilität eingesetzt, um so die Schutzwirkung der Substanzen hervorzuheben.

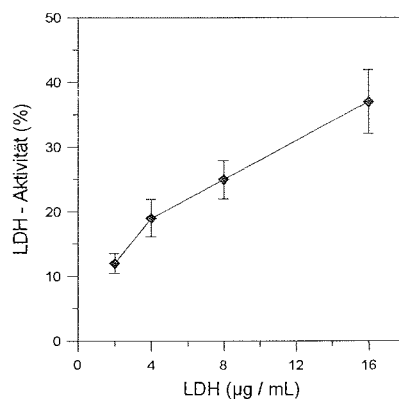


Abb. 15: Einfluß der Proteinkonzentration auf die Stabilität der LDH nach Gefrieren und Auftauen. Die Grundaktivität vor dem Gefrieren ergibt 100% Aktivität. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 4).

3.3.2 Gefrierdauer

In Abbildung 16 ist der Einfluß der Gefrierdauer in flüssigem Stickstoff sowie der Lagerung bei 0 °C auf die LDH-Aktivität dargestellt. Die LDH in 10 mM HEPES-Puffer verlor nach einmaligem Einfrieren und Wiederauftauen im Wasserbad bei 20 °C ca. 90% ihrer Anfangsaktivität. Die Dauer der Lagerung in flüssigem Stickstoff hatte dagegen keinen Einfluß auf die Reststabilität der LDH. Die Meßpunkte aus der Zeitreihe sind nach dem t-Test (Student-Verteilung, zweiseitig) nicht signifikant unterschiedlich ($\alpha > 0,2$). Die Stabilität bei 0 °C wurde allerdings von der Lagerungszeit beeinflusst. Der Aktivitätsverlust zwischen Zeitpunkt 0 min und 240 min ist signifikant ($\alpha < 0,01$). Für alle weiteren Experimente wurden daher die angesetzten Proben (Enzym und Zusatzstoffe) sofort eingefroren und einzeln aufgetaut, um den Verlust an Grundaktivität so gering wie möglich zu halten.

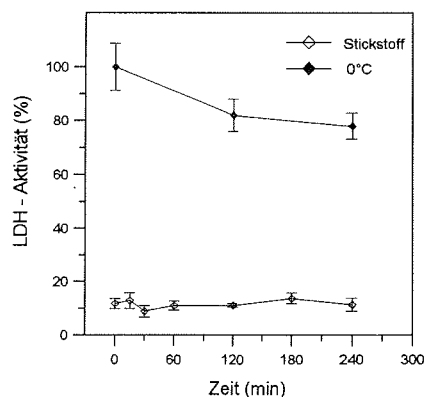


Abb. 16: Einfluß der Gefrierdauer bzw. Lagerung bei 0 °C auf die Stabilität der LDH. Die Anfangsaktivität bei 20 °C entspricht 100%. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$).

3.3.3 Gefrierschutz

Verschiedene anorganische Salze und kompatible Substanzen wurden in ihrer Wirkung als Gefrierschutzstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (Abb. 17 + 18).

Die LDH wird bei 30 °C durch Zugabe von Chlorid in ihrer Aktivität gesteigert (BERGMEYER 1983). In Vorversuchen konnte zudem gezeigt werden, daß die LDH durch hohe NaCl-Gaben nicht in ihrer Aktivität beeinflusst wurde. Daraus ergab

sich die Frage, ob anorganische Salze einen wirksamen Schutz für die LDH gegen das Einfrieren in flüssigem Stickstoff bieten. Mit Erhöhung der Konzentration der eingesetzten Salze (NaCl; KCl; NH_4Cl ; KBr) stabilisierte sich die Enzymaktivität kontinuierlich (Abb. 17).

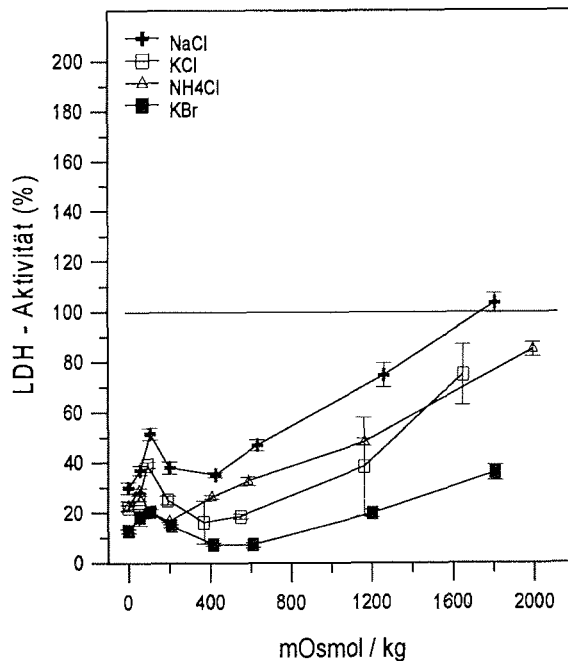


Abb. 17: Restaktivität (%) der LDH als Funktion der Salzkonzentrationen nach einmaligem Gefrieren und Wiederauftauen. Die durchgezogene Linie (—) gibt die Grundaktivität (100%) ohne Gefrieren an (SD 5%). Die Enzymaktivität ohne Zusatzstoffe nach dem Gefrieren wird jeweils durch den ersten Punkt der Graphik repräsentiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$).

Alle Salze zeigten schon bei 100 mOsmol / kg eine leichte Zunahme der Aktivität, die bei 200 mOsmol / kg zwar wieder auf das Anfangsniveau abfiel, aber mit weiterer Erhöhung der Konzentration zunahm. Es zeigte sich, daß der Grad der Stabilisierung abhängig von dem eingesetzten Salz und dessen Konzentration war. Die LDH erreichte mit KCl bei einer Konzentration von 1600 mOsmol / kg etwa 75% der Anfangsaktivität. Bei einer Konzentration von 1800 mOsmol / kg erreichte KBr 36% und NH_4Cl 80% der ursprünglichen Aktivität. Eine Stabilisierung der Enzymaktivität auf 100% wurde mit NaCl bei 1800 mOsmol / kg erreicht.

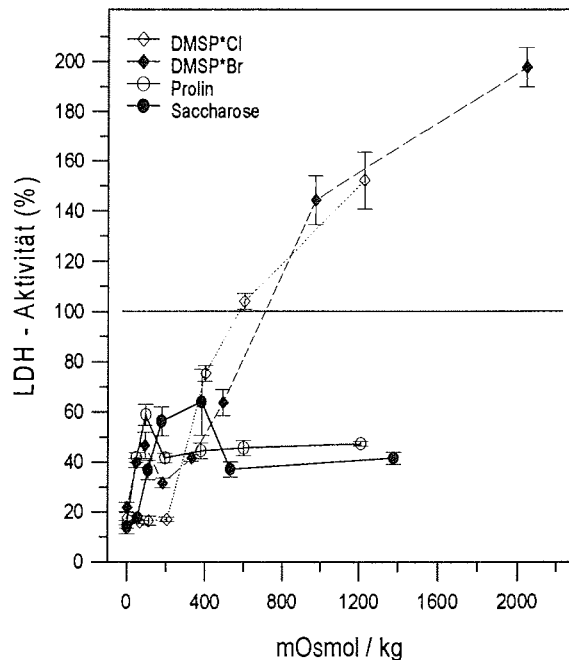


Abb. 18: Restaktivität (%) der LDH als Funktion der Osmolytkonzentrationen nach einmaligem Gefrieren und Wiederauftauen. Die durchgezogene Linie (—) gibt die Grundaktivität (100%) ohne Gefrieren an (SD 5%). Die Enzymaktivität ohne Zusatzstoffe nach dem Gefrieren wird jeweils durch den ersten Punkt der Graphik repräsentiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

Die kompatiblen Substanzen (Prolin, Saccharose, DMSP-Cl und DMSP-Br) wirkten in einem wesentlich engeren Konzentrationsbereich stabilisierend auf die Aktivität der LDH als die anorganischen Salze (Abb. 17 + 18). Das Ausmaß der Schutzwirkung war in erheblichem Maße von den eingesetzten kompatiblen Substanzen abhängig. Auch in Gegenwart der kompatiblen Substanzen (mit Ausnahme des DMSP-Cl) kam es bei 100 mOsmol / kg zu einem kurzfristigen Anstieg in der Enzymstabilisierung, der bei 200 mOsmol / kg aber wieder leicht abfiel.

Prolin und Saccharose zeigten einen geringen stabilisierenden Effekt nach dem Gefrieren. Im Bereich von 200 bis 400 mOsmol / kg Saccharose wurden ungefähr 60% der Anfangsaktivität der LDH gemessen. Bei weiterer Erhöhung (600 bis 1400 mOsmol / kg) fiel der stabilisierende Effekt auf 35% zurück. Prolin stabilisierte die Enzymaktivität über den gesamten Konzentrationsbereich von 50 bis

1200 mOsmol / kg um 45%, mit Ausnahme bei 100 mOsmol / kg (60%). Das DMSP wurde als Bromid- und Chloridsalz getestet, um den schon beschriebenen Chlorideffekt auf die LDH auszuschließen. DMSP-Cl zeigte bis 200 mOsmol / kg keinen Effekt auf die Restaktivität der LDH. Mit weiterer Konzentrationserhöhung trat aber eine bemerkenswerte Stabilisierung ein. Durch Zusatz von 600 mOsmol / kg DMSP-Cl wurden 100% der Anfangsaktivität des Enzyms erreicht. Bei einer weiteren Erhöhung der DMSP-Cl-Konzentration kam es zu einer Stimulierung der Enzymaktivität. Bei 2000 mOsmol / kg (885 mol / m³) Zusatz wurden sogar 160% der Anfangsaktivität gemessen. Das DMSP-Br erreichte bei 600 mOsmol / kg erst 64% der Anfangsaktivität, aber auch hier kam es bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration zu einer Stimulierung der Grundaktivität. Bei 2200 mOsmol / kg (940 mol / m³) DMSP-Br wurden rund 198% der Anfangsaktivität gemessen. Die beiden eingesetzten DMSP-Salze zeigten annähernd die gleichen Effekte, so daß die alleinige Wirkung des Chlorids ausgeschlossen werden kann. Dennoch kann ein möglicher Einfluß von Halogeniden nicht ausgeschlossen werden.

3.4 Wirkung von Temperatur und DMSP auf die LDH

In Abbildung 19 ist der Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Aktivität der LDH sowie die Wirkung des DMSP-Cl auf die Enzymstabilität wiedergegeben. Die thermische Denaturierung der LDH nach 60 min Inkubation im Wasserbad war bei 30 °C gegenüber 5 °C und 0 °C stärker ausgeprägt. Unter Zusatz von 400 und 1000 mOsmol / kg (~ 0,2 M und ~ 0,4 M, vgl. Tab. 5) DMSP-Cl stabilisierte sich die Aktivität der LDH kontinuierlich. Die Unterschiede in der Enzymstabilität, die durch die verschiedenen Temperaturen hervorgerufen wurden, konnten aber auch mit den beiden eingesetzten Konzentrationen an DMSP-Cl nicht vollständig ausgeglichen werden. Der 30 °C-Ansatz blieb in seiner Aktivität deutlich hinter den Ansätzen von 5 °C und 0 °C zurück. Mit 1000 mOsmol / kg DMSP-Cl konnten bei den 5 °C- und 0 °C-Ansätzen in etwa 110% der Anfangsaktivität erreicht werden, wohingegen der 30 °C-Ansatz nur 90% an Aktivität erreichte.

Ergebnisse

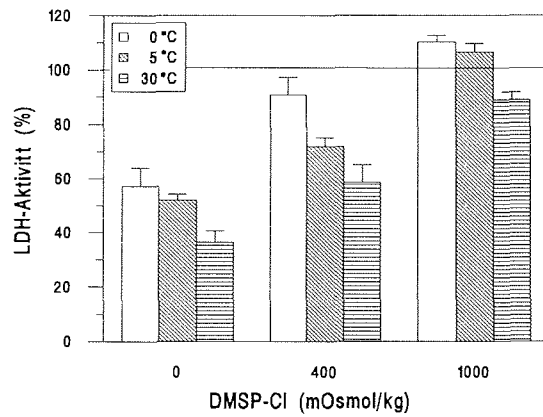


Abb. 19: Restaktivität der LDH nach 60 min. Inkubation bei 0 °C, 5 °C und 30 °C sowie nach Zugabe von 400 und 1000 mOsmol / kg DMSP-Cl. Die durchgezogene Linie (—) gibt die Grundaktivität (100%) zu Beginn des Versuches an (SD 7%). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

II. PHYSIOLOGIE

3.5 Prolin-, Saccharose- und DMSP-Gehalt in Abhängigkeit der Temperatur

Die zellulären Gehalte der organischen Osmolyte Prolin, Saccharose und DMSP wurden in Abhängigkeit von der Temperatur an den Stammkulturen von *A. arcta* der Arktis und Antarktis (Abb. 20a + b) bestimmt. Diese drei Substanzen wurden von KARSTEN (1991) als die wichtigsten organischen Osmolyte bei Salzstreß für *A. arcta* nachgewiesen.

Die Prolinkonzentration stieg in beiden Isolaten mit sinkender Temperatur deutlich an. Beide Isolate zeigten den proportional stärksten Anstieg bei einer Temperaturreduzierung von 0 °C auf -2 °C. Bei der arktischen *A. arcta* stieg der Prolin-Gehalt um das 1,6-fache, beim antarktischen Isolat um das 2,2-fache gegenüber den 0 °C-Kulturen. Die Gehalte an Prolin waren bei beiden Isolaten annähernd gleich. Saccharose trat bei beiden Isolaten in viel geringeren Konzentrationen auf als Prolin, eine deutliche Temperaturabhängigkeit wurde nicht beobachtet.

Die DMSP-Gehalte wurden durch die Temperatur bei den beiden Isolaten unterschiedlich beeinflusst. Das arktische Isolat zeigte eine deutliche Erhöhung der DMSP-Konzentration mit sinkenden Temperaturen. Der DMSP-Gehalt stieg bei einer Temperaturerniedrigung von 0 °C auf -2 °C um das 1,4-fache. Bei dem antarktischen Isolat stiegen die DMSP-Gehalte nicht mit sinkenden Temperaturen, hier wurde die höchste Konzentration bei 10 °C erreicht. Auch blieben die Gehalte an DMSP beider Isolate deutlich hinter denen von Prolin zurück.

Die -2 °C-Kulturen wurden, um das Gefrieren der Medien zu verhindern, von 34 PSU auf 36 PSU aufgesalzen. Die Gehalte von Prolin und DMSP bei -2 °C könnten somit auch durch die leicht erhöhte Salinität beeinflusst worden sein.

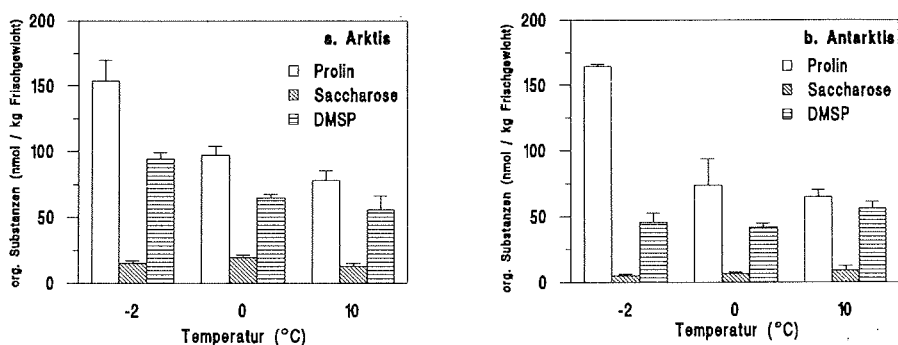


Abb. 20: Zelluläre Konzentrationen der organischen Verbindungen Prolin, Saccharose und DMSP in *A. arcta* der Arktis (a) und Antarktis (b) als Funktion der Temperatur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

3.6 Proteingehalt in Abhängigkeit der Temperatur

In Abbildung 21 sind die Proteingehalte der beiden *Acrosiphonia*-Isolate nach Akklimation an verschiedene Temperaturen dargestellt. Bei beiden Isolaten stieg der Protein-Gehalt mit sinkender Temperatur. Der Korrelationskoeffizient, der den Zusammenhang zwischen Temperatur und Konzentration angibt, lag für beide bei 0,99. Die Protein-Konzentrationen waren bei der arktischen *A. arcta*, außer bei 0 °C, etwas geringer als bei der antarktischen.

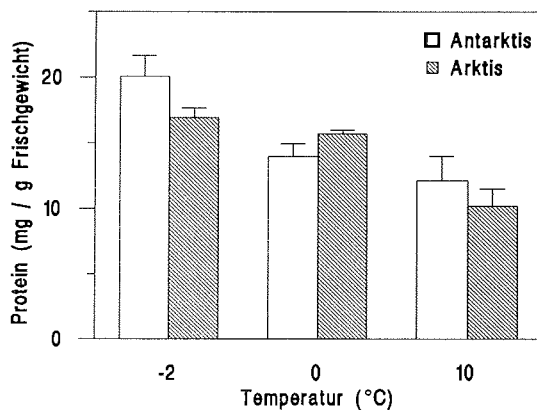


Abb.21: Proteingehalt von *A. arcta* der Antarktis und Arktis in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Algen wurden vor den Untersuchungen mindestens 8 Wochen an die jeweilige Temperatur akklimatisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

3.7 Wachstum bei Unterkühlung (-2 °C)

Um die Vitalität von *A. arcta* bei Unterkühlung (-2 °C) abzuschätzen, wurden die Wachstumsraten beider Isolate bestimmt (Tab. 13). *A. arcta* zeigte für beide Isolate auch bei -2 °C noch eine geringe Zuwachsrates pro Tag. Die antarktische *A. arcta* zeigte dabei eine geringere Wachstumsrate (9,48 %*Tag⁻¹) als die arktische (14,18 %*Tag⁻¹). Die Wachstumsraten für 0 °C und 10 °C wurden für das arktische Isolat von WIENCKE und TOM DIECK (1990) und für das antarktische von BISCHOFF und WIENCKE (1993) erhoben.

Tab. 13: Wachstumsraten von *A. arcta* der Arktis und Antarktis in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Algen wurden vor den Messungen an die jeweilige Temperatur akklimatisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$). Die Werte mit * wurden von WIENCKE und TOM DIECK (1990) und die Werte mit + von BISCHOFF und WIENCKE (1993) erhoben.

Temperatur (°C)	spezifische Wachstumsrate (% * Tag ⁻¹)	
	Arktis	Antarktis
-2	14,18 \pm 2,75	9,48 \pm 3,45
0	31,51 \pm 3,21*	14,53 \pm 2,93 ⁺
10	32,99 \pm 3,10*	18,38 \pm 7,20 ⁺

3.8 Temperatur und DMSP-Gehalt kalt-temperierter Isolate von *A. arcta*

Die intrazellulären DMSP-Gehalte in Abhängigkeit von der Temperatur sind für verschiedene kalt-temperierte Isolate von *A. arcta* in Abbildung 22 dargestellt. Die Algen wurden in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 15 °C untersucht und jeweils 5 Wochen an die entsprechende Temperatur akklimatisiert.

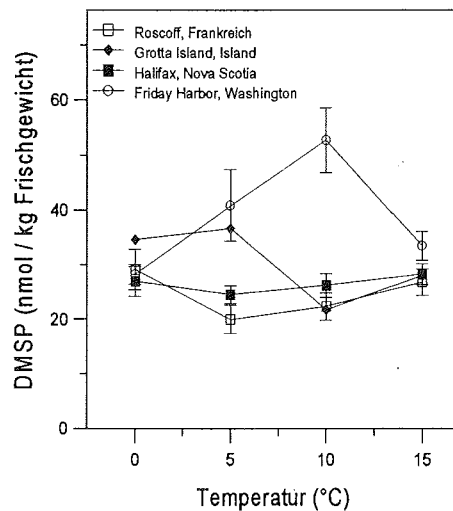


Abb. 22: Intrazelluläre DMSP-Gehalte verschiedener Isolate von *A. arcta* in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Algen wurden jeweils 5 Wochen an die entsprechenden Temperaturen akklimatisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$). Die Legende gibt die einzelnen Fundorte der Isolate wieder.

Ergebnisse

Alle Isolate zeigten bei 0 °C annähernd die gleichen DMSP-Gehalte, mit zunehmender Temperatur wurde kein einheitlicher Trend unter den Isolaten festgestellt. Der DMSP-Gehalt für das Isolat aus Roscoff, Frankreich, erniedrigte sich bei 5 °C leicht im Gegensatz zu 0 °C und blieb dann bis 15 °C auf einem Niveau. Bei dem Isolat aus Grotta Island, Island, blieb die DMSP-Konzentration zwischen 0 °C und 5 °C annähernd gleich und fiel bei 10 °C deutlich ab, um bei 15 °C wieder leicht anzusteigen. Das Isolat aus Halifax, Kanada, zeigte über den gesamten Temperaturbereich nahezu die gleichen DMSP-Gehalte. Zu einem linearen DMSP-Anstieg kam es bei dem Isolat aus Friday Harbor, Washington U.S.A., zwischen 0 °C und 10 °C, bei 15 °C fiel der Gehalt wieder auf das Niveau von 0 °C zurück.

4. Diskussion

4.1 Einfluß der Temperatur auf MDH und G6P-DH

Jedes biologische System toleriert einen begrenzten Bereich der Temperatur bzw. der Wärmeintensität. Dieser für Wachstum und Produktivität eines Organismus spezifische Temperaturbereich ist Ausdruck der in den lebenden Zellen integriert wirkenden Enzymsysteme und der von Thermostabilität bzw. -Labilität abhängigen Funktionsfähigkeit der Zellstrukturen und -Ultrastrukturen (ZUBER 1969, INNIS und INGRAHAM 1978, HOCHACHKA und SOMERO 1980). Im nachfolgenden Kapitel sollen die wichtigsten Enzym-Parameter (Temperaturoptimum, E_a , K_m und Q_{10}) von MDH und G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta*, die eine Aussage über eine biochemische Anpassung an die Temperatur zulassen, diskutiert werden. Ein Grundproblem niedriger Temperatur ist die Regulation der enzymatischen Wirkungsgeschwindigkeit. Nach HOCHACHKA und SOMERO (1980) werden in der Literatur drei Strategien für diese Regulation diskutiert :

1. eine Konzentrationsänderung bereits existierender Enzyme ("quantitative Strategie")
2. ein Wechsel der Enzymarten eines Enzyms ("qualitative Strategie")
3. eine Modulation der Aktivitäten bereits existierender Enzyme ("Modulationsstrategie").

Die oben genannten Enzym-Parameter für MDH und G6P-DH sollten klären, welche der drei Strategien es *A. arcta* ermöglicht, die tiefen Temperaturen ihres Habitats in Arktis und Antarktis zu tolerieren.

4.1.1 Aktivitäts- und Temperaturoptima

Die extrahierten Enzyme der polaren *A. arcta* waren in einem breiten Temperaturbereich (-2 °C bis 40 °C) aktiv. Die Optima für die Enzymkomplexe MDH und G6P-DH lagen für das arktische und antarktische Isolat in einem Bereich von 25 °C bis 30 °C (Abb. 5 + 6). Diese Temperaturoptima sind deutlich höher als die Wassertemperaturen des Nord- und Südpolarmeeres. Im Südpolarmeer, um King-George-Inland, liegen die Wassertemperaturen zwischen -2 °C im Winter und +2 °C im Sommer; im Nordpolarmeer, um Disko-Inland, zwischen -2 °C und +6 °C (BISCHOFF und WIENCKE 1995). Das Wachstumsoptimum der beiden *Acrosiphonia*-Isolate liegt deutlich unterhalb der Temperaturoptima der unter-

suchten Enzyme. Das arktische Isolat weist ein Wachstumsoptimum zwischen 0 °C und 10 °C (BISCHOFF und WIENCKE 1993) auf, das antarktische von etwa 5 °C (WIENCKE und TOM DIECK 1990). Diese offensichtliche Diskrepanz zwischen *in situ*-Temperatur und Temperaturoptimum einzelner Enzyme scheint für kälteadaptierte Organismen keine Seltenheit zu sein (BAROSS UND MORITA 1978, KRISTIANSEN 1983, REICHARDT UND DIECKMANN 1985, FELLER et al. 1994). Untersuchungen der RUBISCO dreier antarktischer Diatomeenarten und zweier temperierter Spezies zeigten, daß das Temperaturoptimum der temperierten Diatomeen bei 40 °C lag, das der Antarktischen bei 50 °C (DESCOLAS-GROS und DE BILLY 1987). Die antarktischen Diatomeen wurden zuvor bei 3 °C und die temperierten bei 18 °C kultiviert. Es scheint ein allgemein gültiges Phänomen der polaren Algen zu sein, daß viele ihrer physiologischen Prozesse, wie z.B. Wachstum oder Photosynthese, Temperaturoptima zeigen, die solchen von temperierten Spezies sehr ähnlich sind (KIRST und WIENCKE 1995).

Das Temperaturoptimum eines Enzyms, bei dem die höchste katalytische Aktivität auftritt, ergibt noch keine Aussage über die eigentliche katalytische Effizienz des Enzyms (DIXON et al. 1979). Auch ist zu bedenken, daß ein Enzym *in vivo* durch die "zelluläre Integrität" ein ganz anderes Verhalten als im isolierten Zustand aufweisen kann. Bei thermolabiler Enzymaktivität kann der zelluläre Verbund Enzyme vor Temperaturen schützen, die außerhalb der Wachstumsgrenzen eines Organismus liegen (INNIS und INGRAHAM 1978). Dieser Schutz würde isolierten Enzymen fehlen. Die meisten Enzyme sind thermolabile Proteine, so daß es im Optimumbereich häufig zu einer Überlagerung von der mit der Temperatur steigenden Umsatzrate und der gleichzeitigen Inaktivierung des Enzyms kommt. Die experimentell ermittelten Temperaturoptima müssen deshalb mit Vorbehalt interpretiert werden, da durch die Anwesenheit von Effektoren oder Änderung der Inkubationsdauer Verschiebungen des Temperaturoptimums auftreten können. Temperaturoptima können um 10 °C differieren, wenn die Inkubationsdauer z.B. 30 min oder 60 min beträgt (RUTTLOFF et al. 1978). In Tabelle 14 sind zum Vergleich die *in vivo* zu *in vitro* Reaktionsbedingungen eines Enzyms gegenüber gestellt. Das Temperaturoptimum, als in der Literatur oft verwendete Größe, läßt sich ohne genaue Angaben der Versuchsbedingungen, insbesondere der Inkubationszeit, nicht vergleichend diskutieren. Die Verschiebung der Temperaturoptima bei unterschiedlichen Anzucht- oder Standorttemperaturen lassen bei einer Versuchsreihe mit identischen Versuchsbedingungen aber sehr wohl eine Aussage zu.

Tab. 14: Vergleich der Reaktionsbedingungen in der lebenden Zelle (*in vivo*) und im Reagenzglas (*in vitro*; modifiziert nach AEBl et al. 1982)

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Räumliche Anordnung der Enzyme	meist kompartimentiert	frei in Lösung
Enzymbestand	wird laufend erneuert bzw. angepaßt durch Variation der Syntheserate (Adaptation)	Anfangskonzentration festgelegt; teilweise Inaktivierung im Verlauf der Inkubation
Substrat	[S] relativ klein; [S] ~ K_m ; beschränktes Substratangebot	[S] relativ hoch; [S] > K_m ; Substratsättigung
Reaktionsgeschwindigkeit begrenzt durch	Substrat	Enzym
Reaktionssystem	offen ("steady state", meist in Nähe der Gleichgewichtslage)	geschlossen (Ausgangssituation, weit vor, Gleichgewichtslage entfernt)
Reaktionsprodukte	laufend Beseitigung durch andere Enzyme oder durch Diffusion und Zirkulation	bei Versuchsbeginn = 0 Anhäufung mit zunehmender Versuchsdauer
Temperatur	dem Habitat entsprechend	30 °C (25 °C)
pH	entsprechend den einzelnen Kompartimenten	pH-Optimum

Die Akklimatisationstemperaturen (0 °C und 10 °C) beider Isolate von *A. arcta* hatten bei der MDH keine Verschiebung des Temperaturoptimums zur Folge. Bei der G6P-DH aus dem antarktischen Isolat führte die Anzuchttemperatur zu einer leichten Verschiebung der optimalen Reaktionsgeschwindigkeit. Die an 0 °C akklimatisierten Algen zeigten ein Optimum der Enzymaktivität bei 25 °C, die an 10 °C akklimatisierten Kulturen zwischen 25 °C und 30 °C. Der Einfluß der Anzuchttemperatur auf verschiedene Enzymaktivitäten von *Laminaria saccharina* zeigte unterschiedliche Wirkung (DAVISON und DAVISON 1987). Für die Enzyme MDH, Aminotransferase, Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase konnte keine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Anzuchttemperatur festgestellt werden. Bei der Nitratreduktase und der Glutamin-Synthetase konnte ein Zusammenhang beider Parameter aufgezeigt werden. Eine umgekehrte Proportionalität zwischen Anzuchttemperatur und Enzymaktivität zeigten die Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und RUBISCO. Der Einfluß der *in situ*-Temperatur bzw. der Anzuchttemperatur scheint keine

einheitliche Wirkung auf Enzymsysteme zu haben. Die Nitratreduktase aus Extrakten der Diatomee *Skeletonema costatum*, die bei unterschiedlichen Temperaturen angezogen wurde, zeigte bei allen Akklimatisierungstemperaturen (10 °C, 17 °C und 25 °C) ein Aktivitätsoptimum von 10 °C bis 15 °C (KRISTIANSEN 1983). Das Temperaturoptimum für die Nitratreduktase liegt damit niedriger als das des Wachstums (20 °C bis 25 °C, FALKOWSKI 1977). Die Nitratreduktase aus natürlichem Phytoplankton des Oslofjords mit Wassertemperaturen zwischen 0 °C und 2 °C zeigte ein Aktivitätsmaximum bei 10 °C (KRISTIANSEN 1983). Diese Beispiele machen deutlich, daß die Darstellung der maximalen Kapazität eines Enzyms keine Aussage über den wahren Einfluß der Temperatur auf eine Enzymreaktion, geschweige denn auf den Gesamtstoffwechsel zuläßt.

4.1.2 Aktivierungsenergie (apparente E_a)

Anhand der *Arrhenius*-Beziehung wird die Rate einer chemischen Reaktion als Funktion der Energie ausgedrückt, die zur Aktivierung der Reaktionspartner benötigt wird (VINCENT 1988). Eine niedrige Aktivierungsenergie bedeutet, daß zur Bildung des Enzymsubstratkomplexes wenig freie Energie benötigt wird. Somit ist dasjenige Enzym für eine gegebene Stoffwechselreaktion am besten geeignet, welches die Aktivierungsenergie am stärksten herabsetzt. Für poikilotherme Organismen, die an eine kühle oder kalte Umwelt adaptiert sind, wäre ein Enzymsystem, das mit einer insgesamt niedrigeren Aktivierungsenergie arbeiten kann, von großem Nutzen (VROMAN und BROWN 1963).

Die Aktivierungsenergien für die MDH aus Extrakten von *A. arctica* der Arktis und Antarktis lagen in einem Bereich zwischen 26,82 kJ / mol und 54,62 kJ / mol (vgl. Tab.6). Die ebenfalls untersuchte G6P-DH zeigte ähnliche Aktivierungsenergien zwischen 37,75 kJ / mol und 50,59 kJ / mol (vgl. Tab. 6). Damit liegen die Aktivierungsenergien der beiden untersuchten Enzyme in einem Bereich, der allgemein für enzymatische Reaktionen angegeben wird (40 - 60 KJ / mol; LASCH 1987, RAVEN und GEIDER 1988). Die Enzyme (MDH und G6P-DH) der beiden Isolate wiesen hinsichtlich der benötigten Aktivierungsenergie keine ausgeprägten Unterschiede auf, lediglich die der MDH des arktischen Isolates war geringfügig niedriger als die der antarktischen. Aufgrund der unterschiedlich langen Kaltwassergeschichte der Arktis (3 Millionen Jahre) und Antarktis (14 Millionen Jahre) wären vielleicht deutlichere Unterschiede zu erwarten gewesen. Neuere Untersuchungen konnten jedoch belegen, daß sich *A. arctica* in einer der beiden Hemisphären entwickelt hat und während der letzten Eiszeit den Äquator überquert haben muß (VAN OPPEN et al. 1993, BISCHOFF und WIENCKE

1995). Somit kann für *A. arcta* beider polarer Regionen davon ausgegangen werden, daß sie eine annähernd gleich lange Kaltwassergeschichte haben und deshalb auch ähnliche Aktivierungsenergien aufweisen.

Für die kalt-gemäßigte *Laminaria hyperborea* konnte eine Aktivierungsenergie für die MDH in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 25 °C von 62,8 KJ / mol nachgewiesen werden (KÜPPERS und WEIDNER 1980). Untersuchungen zur MDH aus einem kalt- sowie warmadaptierten Genotypen von *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) zeigten Aktivierungsenergien zwischen 30,9 KJ / mol (7,38 Kcal / mol, Temperaturbereich 10 °C bis 20 °C) und 49,06 KJ / mol (11,68 Kcal / mol, Temperaturbereich 10 °C bis 20 °C; SIMON 1979a). Eigene Untersuchungen an einem kalt-gemäßigten Isolat von *A. arcta* aus Helgoland zeigten Aktivierungsenergien für die MDH von 42,59 KJ / mol (Temperaturbereich 0 - 20 °C, Daten nicht dargestellt) und für die G6P-DH von 41,46 KJ / mol (Temperaturbereich 0 - 30 °C). Die in dieser Arbeit ermittelten Aktivierungsenergien der beiden untersuchten Enzyme der polaren *A. arcta*-Isolate zeigten somit auch gegenüber kalt-gemäßigten Arten keine niedrigere Aktivierungsenergie.

Hohe Aktivierungsenergien deuten darauf hin, daß Enzyme stark sensitiv auf Temperaturschwankungen reagieren (VOROMANN und BROWN 1963, VOSJAN und OLANCZUK-NEYMANN 1991). So konnten hohe Aktivierungsenergien von 75 KJ / mol bei Untersuchungen der Elektronentransportaktivität an polarem Phytoplankton in einem Temperaturbereich von 0 bis 10 °C belegt werden (VOSJAN und OLANCZUK-NEYMANN 1991). Diese Organismen leben in einem nahezu stabilen Temperaturregime. Aus diesem Grunde müssen sie nicht an fluktuierende Temperaturen adaptiert sein, wie es z.B für Organismen des Wattenmeeres nötig ist, bei denen tatsächlich auch extrem niedrige Aktivierungsenergien von 25 JK / mol nachgewiesen wurden (OLANCZUK-NEYMANN UND VOSJAN 1977). Eine niedrige Aktivierungsenergie bzw. Sensibilität gegenüber Temperaturschwankungen schützt die Enzyme vor wiederholten und abrupten Änderungen ihrer Aktivität. *A. arcta* kommt im Bereich des unteren Eulitorals vor, wo sie aufgrund der Gezeiten Temperaturschwankungen ausgesetzt ist. Die mittleren Aktivierungsenergien für MDH und G6P-DH deuten keine extreme Sensibilität gegenüber schwankenden Temperaturen an.

Eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie durch Adaptation bzw. Akklimatisation an tiefe Temperaturen konnte für einige Enzyme von höheren Pflanzen, wie z.B *Typha latifolia*, *Lathyrus japonicus* und *Oxyria digyna* nachgewiesen werden (McNAUGHTON 1972, SHOMER-ILAN et al. 1979, SIMON 1979a,b, ÖQUIST 1983), dagegen ist dies bei Enzymen aus Algen bislang wenig belegt. Neuere Untersuchungen am ETS-System aus polaren Diatomeen konnten jedoch eine

Diskussion

deutliche Reduzierung der Aktivierungsenergie nach Akklimatisation an tiefe Temperaturen zeigen (WANZEK 1994).

Die NAD-abhängige MDH aus einer kaltadaptierten, maritimen Population von *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) weist gegenüber dem Enzym aus Individuen eines kontinentalen Biotops eine herabgesetzte Aktivierungsenergie auf (SIMON 1979b). Die Aktivierungsenergie für die MDH aus den beiden untersuchten Isolaten von *A. arcta* variierte ebenfalls mit den jeweiligen *in situ*-Temperaturen. Dabei sank die Aktivierungsenergie aus der MDH beider Isolate nach Akklimatisation an niedrige Temperaturen. Die Aktivierungsenergie des arktischen Isolats sank von 32,04 KJ / mol (10 °C-Kultur, Temperaturbereich 0 - 30 °C) auf 26,82 KJ / mol (0 °C-Kultur, Temperaturbereich 0 - 30 °C), die des antarktischen von 54,62 KJ / mol (10 °C-Kultur, Temperaturbereich 0 - 30 °C) auf 44,62 KJ / mol (0 °C-Kultur, Temperaturbereich 0 - 25 °C). Dabei zeigte lediglich die MDH der 0 °C-Kultur des antarktischen Isolates eine schon bei 25 °C beginnende Destabilisierung, während bei allen anderen Kulturen von 0 °C bis 30 °C keine Abweichung von der *Arrhenius*-Geraden nachzuweisen war. Erst bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur war hier eine Thermolabilität festzustellen. Diese thermische Denaturierung wird damit erklärt, daß insbesondere die Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen und es dadurch zu einer Änderung der funktionellen Eigenschaften des Enzyms kommt. Bei warmakklimatisierten Organismen liegt die kritische Temperatur, bei der schwache Bindungen gelöst werden, höher als bei kaltakklimatisierten (INNISS und INGRAHAM 1978, HOCHACHKA und SOMERO 1980).

Die Modifikation der Aktivierungsenergie als Antwort auf eine veränderte Temperatur könnte eine mögliche Strategie sein, um die katalytische Effizienz der MDH bei niedrigen Temperaturen zu steigern. Diese Modifizierung des Enzyms beansprucht jedoch einen längeren zeitlichen Abschnitt, da sie unmittelbar mit einer *de novo*-Synthese und/oder dem Aufbau von MDH-Isoenzymen gekoppelt ist (SIMON 1979c). Diese Art der Enzymmodifikation kann aus der temperaturbeeinflussten Veränderung der Sekundärstruktur der rRNA oder der Tertiärstruktur der tRNA resultieren (HOCHACHKA UND SOMERO 1980). Die Reaktion der MDH auf veränderte Temperaturen könnte ein erster Hinweis für eine "qualitative Strategie" zur Regulation der enzymatischen Wirkungsgeschwindigkeit sein. Jedoch wird die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH aus Extrakten von *A. arcta* bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu Höheren nicht vollständig ausgeglichen (vgl. Kap. 4.1.1).

Die G6P-DH der *Acrosiphonia*-Isolate reagierte bei abnehmender Temperatur nicht mit einer herabgesetzten Aktivierungsenergie. Bei diesem Enzym lagen die Aktivierungsenergien der 0 °C-akklimatisierten Kulturen der Arktis und Antarktis

höher als bei den an 10 °C akklimatisierten Kulturen (vgl. Tab. 6). Bei Untersuchungen der Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) der C₄-Pflanze *Echinochloa crusgalli* konnte ein signifikanter Anstieg der Aktivierungsenergie bei niedrigen Akklimatisierungstemperaturen beobachtet werden (SIMON et al. 1984). Die Autoren erklären diesen Anstieg der Aktivierungsenergie mit der hohen katalytischen Aktivität der PEPC zwischen 35 °C und 45 °C und damit, daß die Akklimatisierungstemperatur (7 °C Nacht und 15°C Tag) weit außerhalb der physiologischen Temperatur der *Echinochloa crusgalli* lag. Die G6P-DH aus *A. arcta* zeigte ebenfalls bei hohen Temperaturen (30 °C) ihre maximale Aktivität, die Akklimatisierungstemperaturen (0 °C und 10 °C) lagen dagegen im Wachstumsbereich von *A. arcta*. Bei einigen Enzymen aus marinem Phytoplankton konnten keine Unterschiede in der Aktivierungsenergie nach Adaptation oder Akklimatisierung an tiefe Temperaturen dokumentiert werden (PACKARD et al. 1975, KRISTIANSEN 1983, DESCOLAS-GROS und DE BILLY 1987). Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß eine erniedrigte Aktivierungsenergie ansonsten andere Katalyseprozesse bei der Enzymreaktion benachteiligen würde, wie z.B. die E-S-Affinität (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Dieses könnte für die G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta* heißen, daß sie eine erhöhte Effektivität durch herabgesetzte Aktivierungsenergie zugunsten anderer Katalyseprozesse eingetauscht hat. Für eine genauere Aussage über die Verringerung der Aktivierungsenergie müßten Daten über die freie Energie der Aktivierung (ΔG^+) und nicht, wie in dieser Arbeit, über die Aktivierungsenthalpie (E_a) erhoben werden.

Analog zur MDH zeichnet sich die G6P-DH der an 0 °C-akklimatisierten Kulturen durch eine früher einsetzende Thermolabilität (25 °C) aus als die der 10 °C-Kulturen (25 - 30 °C). Diese stärkere Thermolabilität der 0 °C-Kulturen könnte auf eine, durch die Temperatur induzierte Ausbildung spezieller Isoenzyme oder zumindest auf eine veränderte Konformation des Enzyms hindeuten.

4.1.3 Enzym-Substrat-Affinität (apparenter K_m)

Die Wirkungsgeschwindigkeit eines Enzyms kann zum einen durch die Reduzierung der Aktivierungsenergie (siehe Kap. 4.1.2) und zum anderen durch eine verbesserte Fähigkeit zur Substratbindung erhöht werden. Der apparente K_m -Wert ermöglicht eine Aussage über die Affinität zwischen Substrat und Enzym. Ein hoher K_m -Wert steht beispielsweise für eine geringe Substratbindungsfähigkeit.

Temperaturänderungen können die E-S-Affinität und damit den apparenten K_m -Wert beeinflussen, da die für die Stabilität des E-S-Komplexes verantwortlichen

schwachen Bindungen temperaturempfindlich sind (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Ein Anstieg in der E-S-Affinität bei niedrigen Temperaturen zeigt an, daß die Reaktion früher substratgesättigt ist. Dies setzt allerdings voraus, daß die Enzymreaktion *in vivo* unter nicht-sättigender Substratkonzentration arbeitet (RAVEN und GEIDER 1988). Dies konnte für einige Enzyme von Tieren und Pflanzen nachgewiesen werden (HOCHACHKA und SOMERO 1984, GRAHAM und PATTERSON 1982).

Die apparenten K_m -Beträge für die MDH aus Extrakten von *A. arcta* lagen innerhalb eines Bereiches, der auch bei höheren Pflanzen festgestellt wurde (TING et al. 1975, SIMON und VAIRINHOS 1991). Untersuchungen an der MDH aus Extrakten von *Tetraselmis subcordiformis* (Prasinophyceae) ergaben einen K_m von 43 μM ($\sim 22^\circ\text{C}$, GRÖNE 1991) und entsprachen annähernd dem K_m -Wert für die MDH aus Extrakten von *A. arcta* (37 μM , 30°C). Allgemein scheint die K_m - / Temperaturbeziehung der MDH aus *A. arcta* ähnlich der zu sein, die auch für Enzyme verschiedener poikilotherme Tiere (SOMERO 1978, HOCHACHKA und SOMERO 1980) und einiger höherer Pflanzen (SIMON 1979b, BROUILLET und SIMON 1980, SIMON et al. 1983, SIMON und VAIRINHOS 1991) beschrieben wird. In den genannten Arbeiten stieg der K_m -Wert, wie auch bei der MDH aus *A. arcta*, als positive Funktion der Ansatztemperatur (vgl. Abb. 8). Die höchste E-S-Affinität für Oxalacetat (kleinster K_m) wurde bei den an 0°C -akklimatisierten Kulturen zwischen -2°C und 0°C gemessen und nahm bis 40°C kontinuierlich ab. Die an 10°C -akklimatisierten Kulturen zeigten dagegen die höchste Affinität zwischen 0°C und 10°C . Mit steigender Temperatur nahm die Fähigkeit zur Substratbindung im Vergleich zu den 0°C -Kulturen schneller ab. Diese Änderung des K_m -Wertes durch die Temperatur wird von HOCHACHKA und SOMERO (1980) als eine "positive Temperaturmodulation" beschrieben. Die direkte Möglichkeit zur Kompensation der verringerten enzymatischen Aktivität durch eine erleichterte Substratbindung bei Temperaturschwankungen ist die entscheidende Wirkung dieser "positiven Temperaturmodulation". Die erleichterte Substratbindungsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen, wie sie bei *A. arcta* auftrat, könnte somit ein entscheidender Mechanismus sein, die Katalysegeschwindigkeit bei Temperaturschwankungen im Habitat auszugleichen. Bei dieser schnellen Änderung der E-S-Affinität werden neue Enzymvarianten aus bereits existierenden Enzymen durch die Änderung der Proteinkonformation, z.B. einer einzigen Primärstruktur, gebildet ("Modulationsstrategie").

Unterschiede in der E-S-Affinität für die MDH wurden zwischen Populationen verschiedener Standorte, aber auch, wie schon für *A. arcta* beschrieben, bei unterschiedlich akklimatisierten Kulturen nachgewiesen (SIMON 1979a, 1979d, LAPOINTE et al. 1989). Untersuchungen an je einem kalt- sowie warmadaptierten

Genotyp von *Lathyrus japonicus* zeigten beispielsweise, daß der kaltadaptierte Genotyp bei niedrigen Temperaturen die höchste E-S-Affinität aufwies und die Fähigkeit zur Substratbindung mit steigender Temperatur abnahm. Der warm-adaptierte Genotyp dagegen wies bei 20 °C die stärkste Substrataffinität auf, oberhalb und unterhalb dieser Temperatur nahm die E-S-Affinität wieder ab (SIMON 1979a). Beide Genotypen zeigten eine gute Korrelation zwischen Wachstum und Substratbindungsfähigkeit. DESCOLAS-GROS und DE BILLY (1987) untersuchten den Einfluß der Temperatur auf den K_m -Wert (Ribulosebisphosphat) der RUBISCO von temperierten und polaren Diatomeen. Die geringsten K_m -Werte konnten bei diesen Untersuchungen nahe den Temperaturen gefunden werden, bei denen die Algen kultiviert waren. Die temperierten Arten zeigten bei 20 °C die höchste E-S-Affinität, die polaren Arten bei 5 °C. Diese Unterschiede im K_m -Wert werden von den Autoren als eine genetische Akklimatisation diskutiert. RAVEN und GEIDER (1988) stellen dem gegenüber, daß allein die Tatsache, daß die antarktischen Spezies andere Wachstumstemperaturen haben als die temperierten Organismen, noch kein ausreichendes Argument für eine genetische Akklimatisation ist. Die Unterschiede in den K_m -Werten können sowohl genotypisch als auch phänotypisch bedingt sein. Neuere Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der MDH aus höheren Pflanzen haben gezeigt, daß der niedrigste apparente K_m (Oxalacetat) immer bei der niedrigsten Ansatztemperatur des Versuches (10 °C) nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der untersuchten Spezies und deren optimaler Wachstumstemperatur (SIMON und VAIRINHOS 1991, TURNER und POLLOCK 1993). Dies wurde auch bei Untersuchungen des K_m -wertes (CO_2) der RUBISCO aus der Braunalge *Laminaria saccharina* bestätigt (DAVISON und DAVISON 1987).

Die bei niedrigen Temperaturen auftretende hohe Substratbindungsfähigkeit der MDH aus *A. arctica* steht mit ihrem optimalen Wachstumsbereich gut im Einklang. Die leichte Verschiebung der K_m -Werte bei den unterschiedlichen Akklimatisierungstemperaturen deutet darauf hin, daß die K_m - / Temperaturbeziehung nicht ausschließlich eine positive Funktion der Ansatztemperatur ist. Vielmehr weist diese Verschiebung auf ein adaptives Moment des Enzyms gegenüber seiner Umwelttemperatur hin. Die MDH dient im Cytoplasma der Synthese von Malat, welches das Transportmetabolit für NADH über die Membranen ist. Somit spielt diese Reaktion eine wichtige Rolle für den Transport von Energieäquivalenten in den Citratzyklus und es wäre daher von Bedeutung, die katalytische Aktivität der MDH den gegebenen Temperaturen anpassen zu können. Die durch die Änderung der E-S-Affinitätsparameter geschwindigkeitsausgleichende Wirkung kann aber nur bei nicht-sättigenden Substratkonzentrationen, wie sie normaler-

weise in der Zelle vorherrschen, beobachtet werden (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Dieser Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit unter nicht-sättigender Substratkonzentration bei niedrigen Temperaturen wird in der Diskussion zum Q_{10} -Wert noch genauer erörtert (vgl. Kap. 4.1.4). Die Temperaturabhängigkeit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ist in erster Linie abhängig von der erleichterten Aktivierungsenergie, wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

Bei den Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der G6P-DH aus *A. arcta* konnte keine positive Temperaturmodulation festgestellt werden. Der K_m -Wert für Glucose-6-phosphat blieb im Temperaturbereich zwischen 30 °C und 5 °C nahezu konstant, um dann bei -2 °C auf etwa den dreifachen Wert anzusteigen (vgl. Tab. 8). Allerdings muß hier erwähnt werden, daß für die G6P-DH die K_m -Werte nur für diese Meßpunkte bestimmt wurden und für eine genauere Analyse nicht genügend Datenpunkte zur Verfügung stehen. Eine Verminderung der E-S-Affinität bzw. eine Erhöhung des K_m -Wertes bei Temperaturemniedrigung wird von HOCHACHKA und SOMERO (1980) als "negative Temperaturmodulation" bezeichnet. Infolge der gleichzeitigen Herabsetzung der E-S-Affinität und kinetischer Energie kommt es zu einer extremen Verminderung der Enzymaktivität, die besonders stark unter nicht-sättigenden Substratkonzentrationen hervortritt. Die apparenten K_m -Beträge für 30 °C und 5 °C lagen in einem Bereich, der bereits für die G6P-DH aus Erbsen-Chloroplasten (25 °C) bestimmt wurde (SCHEIBE et al. 1989). Der nahezu konstante apparente K_m -Wert der G6P-DH aus *A. arcta* bei 5 °C und 30 °C läßt vermuten, daß der K_m für Glucose-6-phosphat in einem breitem Bereich temperaturunempfindlich ist. Die Temperaturuntersuchungen zur G6P-DH aus höheren Pflanzen konnten zeigen, daß der kleinste K_m -Wert (Glucose-6-phosphat) immer um 2 °C bis 5 °C höher lag als die Temperatur, bei der die Pflanzen wuchsen (TERRI 1980). Bei Untersuchungen an der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus höheren Pflanzen konnte über einen weiten Temperaturbereich (10 °C bis 35 °C) keine Veränderung des K_m -Wertes mit der Temperatur festgestellt werden. Die gleichzeitig untersuchte MDH zeigte in demselben Temperaturbereich ebenfalls eine deutliche "positive Temperaturmodulation" (SIMON et al. 1983).

Wie HOCHACHKA und SOMERO (1980) postulieren, ist ein hoher K_m -Wert bzw. eine niedrige E-S-Affinität immer nur in einem Temperaturbereich festzustellen, der nahe der niedrigsten vorherrschenden Umwelttemperatur des jeweiligen Lebensraumes oder sogar darunter liegt. Hieraus könnte man folgern, daß die kritische untere Temperaturgrenze für die G6P-DH aus *A. arcta* bei -2 °C liegt, da hier der K_m -Wert stark ansteigt. Von Januar bis April herrschen auf Disko-Island (Arktis) Wassertemperaturen von -2 °C mit Eisbedeckung vor, wodurch ein Wachstum von *A. arcta* auf die eisfreien Monate im Frühjahr und Sommer be-

schränkt bleibt. *A. arcta* überdauert den Winter als ein ausgestrecktes filamentöses System und wächst erst im Frühjahr, wenn das Eis aufbricht, mit jungen aufgerichteten Filamenten aus (BISCHOFF und WIENCKE 1995). Dieses saisonale Wachstum von *A. arcta* bedeutet, daß im Winter der gesamte Stoffwechsel reduziert wird und die Alge durchaus mit einer schlechteren E-S-Affinität der G6P-DH überdauern kann. In der Wachstumsperiode mit Wassertemperaturen zwischen 0 °C und 6 °C gibt es dagegen keine negative Temperaturmodulation der G6P-DH mehr und die E-S-Affinität bleibt temperaturunempfindlich. Dies ist insofern wichtig, da die G6P-DH ein Schlüsselenzym des oxidativen Pentosephosphatzyklusses ist. Das auf diesem Stoffwechselweg erzeugte NADPH liefert die Reduktionsäquivalente für die Fettsäuren- und Aminosäuresynthese, die gerade bei niedrigen Temperaturen von Bedeutung sind.

4.1.4 Temperaturkoeffizient (Q_{10})

Der Effekt der Temperatur auf ein Enzym wird am einfachsten über den Q_{10} -Wert beschrieben. Die Q_{10} -Beträge enzymatischer Reaktionen liegen im Bereich von 1,1 bis 5,3 und haben einen deutlichen Schwerpunkt bei einem Wert von 2, somit kommt es bei einer Erhöhung der Temperatur um 10 °C zu einer Verdopplung der Katalysegeschwindigkeit (WEST et al. 1966, GRAHAM und PATTERSON 1982). Bei den Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der MDH sowie der G6P-DH aus *A. arcta* wurden Q_{10} -Werte zwischen 1 und 3 bestimmt (vgl. Tab. 7). Dabei reagierten die Enzyme der an 0 °C-akklimatisierten Isolate mit einem konstanten bzw. sinkenden Q_{10} -Wert bei tiefen Temperaturen (0 bis -2 °C), wohingegen die an 10 °C Akklimatisierten einen steigenden Q_{10} -Wert zeigten. So war die Temperaturempfindlichkeit der Enzyme, die aus 10 °C-Kulturen extrahiert wurden, bei tiefen Temperaturen stärker ausgeprägt als bei den 0 °C-Kulturen. Eine Ausnahme bildete die MDH aus dem antarktischen Isolat. Sie zeigte bei beiden Kulturen eine ähnliche Kälteempfindlichkeit.

Während der Kälteakklimatisation bzw. -Adaptation können die Enzymstrukturen infolge der Stärkung der Wasserstoffbrücken-Bindungen und der elektrostatischen Wechselwirkungen stabiler werden, auch wenn die hydrophoben Wechselwirkungen bei niedrigen Temperaturen geschwächt sind (TIMASHEFF 1978, HOCHACHKA und SOMERO 1984, FRANKS 1986). Eine temperaturinduzierte Veränderung der Tertiärstruktur kann zu einer Modifikation der kinetischen Eigenschaften eines Enzyms führen, muß aber nicht zwangsläufig einen vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität bedeuten. Durch diese Modifikation können

Proteine entstehen, die besser an die veränderten Temperaturverhältnisse angepasst sind (SCHLEE 1986). Es ist für die an 0 °C akklimatisierte *A. arcta* denkbar, daß sich die Enzymstrukturen der MDH sowie der G6P-DH geändert haben, um die Thermostabilität bei niedrigen Temperaturen zu erhöhen, ohne die hydrophoben Wechselwirkungen, die nötig sind, um das Enzym unter höheren Temperaturbedingungen zu stabilisieren, gleichzeitig zu schwächen. Eine verbesserte, auf strukturellen Veränderungen basierende Thermostabilität für die MDH als Folge der Kälteakklimatisation ist für einige höhere Pflanzen beschrieben worden (DAVIDSON und SIMON 1981, POTVISON et al. 1983, SIMON et al. 1985, SIMON und VAIRINHOS 1991).

Bei physiologischen (nicht-sättigenden) Substratkonzentrationen, die *in vivo* allgemein vorherrschen, variieren die Q_{10} -Werte erheblich stärker und die Beträge sind abhängig von dem Einfluß der Temperatur auf die E-S-Affinität (HOCHACHKA und SOMERO 1968). Für die "positive Temperaturmodulation", wie sie für die MDH aus *A. arcta* (vgl. Kap. 4.1.3) bestimmt wurde, gilt, daß die Q_{10} -Beträge der Reaktion unterhalb des Sättigungsbereiches umso niedriger liegen, je größer die temperaturbedingten Änderungen der apparenten K_m -Werte sind (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Die substratabhängige Änderung der Q_{10} -Werte konnte bei der MDH für beide Akklimatisierungstemperaturen deutlich beobachtet werden. Je niedriger die Substratkonzentrationen waren, umso kleiner wurden die Q_{10} -Beträge (Temperaturbereich 0 °C bis 10 °C, vgl. Tab. 9). Diese Beziehung wurde auch für die MDH aus vier Genotypen von *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) nachgewiesen, die an unterschiedliche Temperaturen akklimatisiert waren (SIMON 1979d). Niedrige Q_{10} -Werte im Bereich hoher E-S-Affinität deuten auf einen Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit gegenüber niedrigen Temperaturen hin. So kann die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms bei niedrigen Temperaturen und nicht-sättigender Substratkonzentration höher liegen als bei hohen Temperaturen (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Bei der MDH konnte so der negative Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit in einem gewissen Bereich kompensiert werden. Eine Ansatztemperatur von 0 °C führte z.B. bei 12 μ M Oxalacetat zu einer leicht höheren Enzymaktivität als bei 10 °C ($Q_{10} < 1$). Oberhalb von 10 °C konnte keine Kompensation der Geschwindigkeit festgestellt werden, d.h. der Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit läuft in einem Temperaturbereich ab, der dem des natürlichen Habitats von *A. arcta* entspricht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Enzymaktivität der MDH bei niedrigen Temperaturen und nicht-sättigender Substratkonzentration ausreicht, um eine positive Stoffwechselbilanz zu gewährleisten. Wenn die vollständige Enzymkapazität für einen Geschwindigkeits-

ausgleich genutzt werden müßte, läge die benötigte Substratkonzentration nahe der Sättigung des Enzyms (RAVEN und GEIDER 1988).

Unter den Bedingungen der negativen Temperaturmodulation, wie sie für die G6P-DH bei -2 °C gefunden wurde (vgl. Kap. 4.1.3), können die Q_{10} -Werte enorm ansteigen (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Mit abnehmender Glucose-6-phosphatkonzentration stieg der Q_{10} -Wert deutlich an und war bei physiologischen Substratkonzentrationen am höchsten (vgl. Tab. 10). Damit konnte bei der G6P-DH der Ausgleich der Reaktionsgeschwindigkeit mit abnehmender Substratkonzentration bei niedrigen Temperaturen ausgeschlossen werden.

4.1.5 pH-Änderungen

Bei der Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen wird häufig übersehen, daß der pH-Wert der verwendeten Puffer sich mit der Temperatur ändert. Diese Änderung kann einen Einfluß auf die Dissoziation des Enzymmoleküls haben, da viele Enzyme hochsensibel gegenüber pH-Änderungen sind. Der in dieser Arbeit verwendete HEPES-Puffer verschob sich in einem Temperaturbereich von 40 °C bis -2 °C um 0,4 pH-Einheiten, d.h. von pH 7,5 (40 °C) auf pH 7,9 (-2 °C; Daten nicht dargestellt). Die Verschiebung des pH-Wertes stimmt gut mit dem $\Delta pK_s / ^\circ C$ für diesen Puffer überein. Die temperaturbedingten Änderungen des pH-Wertes können durchaus einen Einfluß auf die kinetischen Parameter eines Enzyms haben (TURNER und POLLOCK 1993). Der K_m -Wert vieler Enzyme ändert sich mit dem pH-Wert in einem Bereich, der noch keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat (LEHNINGER 1975). BURKE et al. (1988) beschreiben für den HEPES-Puffer eine pH-Verschiebung bei einem Temperaturgradienten, der 30 °C umfaßt, von weniger als 0,5 pH-Einheiten ohne Auswirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Der Effekt auf den K_m -Wert wird in der genannten Arbeit jedoch nicht beschrieben. Untersuchungen zur Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase aus Mais zeigten, daß der apparente K_m -Wert von beiden Parametern beeinflusst wird. Der apparente K_m -Wert stieg mit der Temperatur und besaß bei konstantem pH-Wert über den gesamten Temperaturbereich bei pH 8,3 insgesamt ein höheres Niveau als bei pH 7,8. Variierte der pH-Wert mit der Temperatur, so hatte die Temperatur den stärkeren Einfluß. Der pH-Wert beeinflusste zwar die absolute Höhe des apparenten K_m -wertes, aber nicht den Kurvenverlauf (TURNER und POLLOCK 1993). Die Autoren hoben die Wichtigkeit der Angabe des pH-Wertes sowie die des Puffers bei Untersuchung der Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen

hervor, um den Einfluß auf den K_m -Wert exakt diskutieren zu können. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Enzymsätze bei 30 °C auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, der sich mit der Temperatur verändert hat. SOMERO (1981) führte anhand der Daten von poikilothermen Tieren aus, daß es wichtig sei, eine Veränderung des pH-Wertes zuzulassen, da solche Veränderungen auch *in vivo* zu beobachten sind (REEVES 1977). Über die pH-Werte der einzelnen Kompartimente in der Pflanzenzelle und deren Veränderungen mit der Temperatur ist wenig bekannt (PATTERSON und GRAHAM 1987). Untersuchungen zur pH-Veränderung im Cytoplasma zeigten aber, daß der pH-Wert bei sinkenden Temperaturen alkalischer wird (ADUCCI et al. 1982, PATTERSON und GRAHAM 1987). Enzympräparationen aus Pflanzen werden häufig bei einem pH-Wert inkubiert, der eine optimale Aktivität zeigt, aber nicht notwendigerweise mit dem pH-Wert des jeweiligen Kompartimentes, aus dem das Enzym extrahiert wurde, in Verbindung steht. Außerdem kommen die extrahierten Enzyme häufig nicht nur aus einem Zellkompartiment, so daß die pH-Verhältnisse uneinheitlich sein können. Es ist schwierig bei Enzymuntersuchungen *in vitro* auf *in vivo* Bedingungen zu übertragen und es entspricht sicherlich eher den natürlichen Bedingungen, die pH-Wert Konditionen mit der Temperatur zu ändern als sie konstant zu halten (TURNER und POLLOCK 1993).

4.1.6 Proteinkonzentration

Eine Konzentrationsänderung der vorhandenen Enzyme könnte einen weiteren Mechanismus für den Ausgleich der Temperatureffekte auf den Stoffwechsel darstellen ("quantitative Strategie"). Insbesondere im Fall geschwindigkeitsbegrenzender Enzyme könnte die Zunahme der Enzymkonzentration bei Kälte und ihre Verminderung bei wärmeren Temperaturen eine wesentliche Stabilisierung der Stoffwechselgeschwindigkeit bedeuten (HOCHACHKA und SOMERO 1980). HAZEL und PROSSER (1974) postulieren, daß ein Wechsel der Enzymkonzentration mit veränderlichen Umwelttemperaturen zusammenhängt und daß die "qualitative Strategie" mit einer Kälte-Akklimatisation verbunden ist. Die Proteingehalte der polaren Isolate von *A. arctica* stiegen linear mit sinkender Temperatur an (Abb. 21). Eine genaue qualitative Bestimmung der Enzyme MDH und G6P-DH wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Die Veränderung der Proteingehalte bei tiefen Temperaturen könnte jedoch indirekt auf eine Anreicherung von MDH und G6P-DH hindeuten. Ein Anstieg der Enzymkonzentration von MDH sowie G6P-DH bei tiefen Temperaturen könnte somit eine partielle Kompensation des Temperatureffektes auf die Katalysegeschwindigkeit

sein. Die MDH-Konzentration aus höheren Pflanzen stieg bei Akklimatisation an tiefe Temperaturen (SIMON et al. 1983). Dies konnte auch für andere Enzyme aus poikilothermen Tieren (SOMERO 1978) und für einige Pflanzen nachgewiesen werden (CHABOT 1979). Bei der Braunalge *Laminaria saccharina* stieg die Proteinkonzentration bei sinkenden Temperaturen signifikant an (DAVISON und DAVISON 1987). Die Autoren diskutieren diese Erhöhung als eine mögliche Anpassung an tiefe Temperaturen, schließen aber eine gleichzeitige mögliche Änderung der kinetischen Eigenschaften der Enzyme nicht aus. GRAHAM und PATTERSON (1982) beschreiben für höhere Pflanzen, daß sowohl eine Erhöhung der Enzymkonzentration als auch verbesserte kinetische Eigenschaften der Enzyme für die Akklimatisation an niedrige Temperaturen in Frage kommen. Auch bei marinem Phytoplankton wird eine Anpassung an tiefe Temperaturen durch Erhöhung der Proteinkonzentration diskutiert (THOMPSON et al. 1992), jedoch konnte nicht bei allen untersuchten Arten eine temperaturinduzierte Veränderung des Proteingehaltes nachgewiesen werden (MORRIS und FARRELL 1971, TILLMANN et al. 1989, ALETSEE und JAHNKE 1992, SMITH et al. 1994). Die Modulation der Enzymkonzentration als eine Änderung der Temperatur ist für den Metabolismus recht energieaufwendig (BERRY und BJÖRKMAN 1980, PLATT et al. 1982, LI et al. 1984) und sollte daher für Organismen, die häufigen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, recht uneffektiv sein (SOMERO 1978). Nach McCONVILLE (1985) wäre ein solch energieaufwendiger Mechanismus für den Stoffwechsel nur bei einer kurzzeitigen Akklimatisation an tiefe Temperaturen akzeptabel. Dem ist entgegenzuhalten, daß eine Erhöhung der Enzymkonzentration über die Synthese neuer Proteine jedoch zu lange dauern würde, um kurzfristige Temperaturschwankungen auszugleichen (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Aus den genannten Gründen ist es für *A. arctica*, die im unteren Eulitoral lebt und teilweise starken Temperaturschwankungen ausgesetzt ist, vermutlich auszuschließen, daß der Stoffwechsellausgleich nur über die Modifikation ihres Enzymgehaltes kompensiert wird. Auch ist es unwahrscheinlich, daß die Konzentration aller Enzyme oder auch nur aller geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme als Folge einer Kälteanpassung erhöht werden können, da das Lösungsvermögen in der Zelle begrenzt und die Anzahl der Bindungsstellen für membrangebundene Enzyme ebenfalls nicht unerschöpflich ist. Desgleichen scheint die Synthese vorhandener Enzymvarianten wenig zweckmäßig, wenn diese unter den neuen Umweltbedingungen nur schlecht funktionieren (HOCHACHKA und SOMERO 1980). Damit ist eine Erhöhung der Enzymmenge nur nützlich, wenn das Enzym im Hinblick auf die Temperaturveränderung nahe der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit arbeiten kann (LOBBAN et al. 1985). Aus diesem Grunde scheint die Ausbildung neuer

Enzymvarianten mit niedriger Aktivierungsenergie oder verändertem K_m -Wert ein effektiverer Mechanismus zu sein, um auf veränderliche Temperaturen zu reagieren. Für die MDH aus *A. arcta* konnte eine reduzierte Aktivierungsenergie (vgl. Kap. 4.1.2) und eine erleichterte E-S-Affinität (vgl. Kap. 4.1.3) bei niedrigen Temperaturen gefunden werden. Bei der G6P-DH zeigten diese beiden Enzymparameter bei tiefen Temperaturen keine verbesserten kinetischen Eigenschaften. Folglich könnte es möglich sein, daß die "quantitative Strategie" für die G6P-DH eine Möglichkeit darstellt, die negativen Effekte tiefer Temperaturen zu kompensieren. Für einen erfolgreichen Ausgleich der Temperatureffekte auf den Stoffwechsel von *A. arcta* ist es sehr wahrscheinlich, daß mehrere der genannten Anpassungsstrategien nebeneinander beteiligt sind.

4.1.7 Einfluß der Enzymeigenschaften bei der Adaptation

Die Charakterisierung der MDH und G6P-DH aus *A. arcta* zeigte recht unterschiedliche kinetische Eigenschaften gegenüber tiefen Temperaturen. Für beide *in vitro*-untersuchten Enzyme galt, daß die aufgenommenen Temperaturoptima weit außerhalb des optimalen Wachstumsbereiches von *A. arcta* lagen (vgl. Kap. 4.1.1). Insofern schien das Temperaturoptimum beider Enzyme kein aussagekräftiger Parameter zur Erklärung einer möglichen Anpassungsstrategie zu sein. Für die MDH wurde nach Akklimatisation an tiefe Temperaturen (0 °C) eine reduzierte Aktivierungsenergie als mögliches Indiz für eine qualitative Anpassung (vgl. Kap. 4.1.2) nachgewiesen. Eine erleichterte Substratbindungsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen, die wiederum ein Anzeichen für eine modulierte Anpassung sein könnte (vgl. Kap. 4.1.3), wurde für die MDH ebenfalls belegt. Außerdem zeigten sich die an 0 °C-akklimatisierten Kulturen kältestabiler als die 10 °C-Ansätze. Eine erhöhte Proteinkonzentration könnte auf eine Anreicherung der beiden Enzyme bei tiefen Temperaturen und somit möglicherweise auf eine quantitative Anpassung hindeuten (vgl. Kap. 4.1.6). Für die MDH scheinen mehrere Anpassungsstrategien zur Verfügung zu stehen, um die Temperatureffekte auszugleichen. Für die G6P-DH konnten anhand der untersuchten kinetischen Parameter keine eindeutigen Anpassungsstrategien ermittelt werden. Lediglich eine quantitative Anpassung durch erhöhte Enzymkonzentration erscheint möglich.

Wenngleich die erwähnten Strategien als Erklärung für eine Anpassung der MDH an wechselnde Temperaturen angenommen werden können, ist dies für die G6P-DH nicht ohne weiteres festzustellen. Da *A. arcta* ein Überleben ohne Temperaturanpassung ihrer G6P-DH wohl kaum möglich wäre, ist es wahr-

scheinlich, daß weitere Mechanismen hierzu beitragen. So könnten z.B. bestimmte Zusatzstoffe die G6P-DH stabilisieren, so daß die Enzymaktivität auch bei niedrigen Temperaturen effektiv arbeitet. Dieser Frage, ob Schutzsubstanzen für eine Stabilisierung der Enzymaktivität bei tiefen Temperaturen verantwortlich sind, wird im folgenden Kapitel nachgegangen.

4.2 **Schutzwirkung verschiedener Osmolyte auf Enzyme**

Wie aus der vorangegangenen Diskussion (Kap. 4.1) deutlich wurde, kann der Umweltfaktor Temperatur die Synthese spezifischer Isoenzyme induzieren und/oder die biochemischen Reaktionsabläufe durch Veränderungen der Substratbindungskapazität beeinflussen. Eine abnehmende Temperatur kann zu einer Veränderung im Stoffwechsel und damit zu einer Verschiebung in der Konzentration wichtiger Metabolite führen. So wäre es denkbar, daß die Temperatur die Synthese von Schutzsubstanzen induziert, die bei tiefen Temperaturen stabilisierend auf die Enzymaktivität wirken. Ein Einfluß auf die Synthese solcher Schutzsubstanzen konnte bereits sowohl für die Temperatur als auch für die Salinität nachgewiesen werden. So vermuten RICHTER und KIRST (1987), daß Aktivitätsverluste von Enzymen durch NaCl für den Gesamtorganismus sinnvoll sein können, indem sie zur Regulation der Synthese- und Abbauege beitragen. Am Beispiel der Prasinophyceae *Tetraselmis subcordiformis* konnten sie zeigen, daß das Mannitol-abbauende Enzym Mannitol-1-Phosphatdehydrogenase bei Salzstreß durch NaCl gehemmt wird und es so zu einer Anreicherung der kompatiblen Substanz Mannitol kommt (RICHTER und KIRST 1987).

Eine mögliche regulatorische Wirkung der Temperatur wurde für den Kohlehydratstoffwechsel höherer Pflanzen nachgewiesen (REES et al. 1988). Eine Temperaturabnahme von 25 °C auf 5 °C bei der Süßkartoffel (*Solanum tuberosum*) hemmte die Glykolyse stärker als den Pentosephosphatweg. Diese stärkere Reduzierung wurde durch den Aktivitätsverlust der kälteempfindlichen Phosphofruktokinase hervorgerufen, welche das Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt. Die reduzierte Aktivität der Glykolyse führt zu einer Akkumulation von Hexose-6-Phosphat und somit zu einer verstärkten Synthese von Saccharose, die in der Literatur häufig als kryoprotektive Substanz beschrieben wird (HEBER et al. 1981; CARPENTER und CROWE 1988). Die unterschiedliche Kälteempfindlichkeit der Enzyme kann somit zu einer Regulierung der Stoffwechselwege beitragen und die Synthese von Schutzsubstanzen induzieren.

Für *A. arcta* wurden die Iminosäure Prolin, das Disaccharid Saccharose und die tertiäre Sulfoniumverbindung β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) als die wichtigsten organischen Osmolyte bei Salzstreß nachgewiesen (KARSTEN 1991). Seit einiger Zeit werden verschiedene organische Osmolyte als Schutzsubstanzen für Enzyme sowohl bei Salzstreß (SCHOBERT 1979, MANETAS et al. 1986, POLLARD und WYN JONES 1979, SOMMER et al. 1990, GRÖNE und KIRST 1991) als auch bei Gefrierstreß (WITHER und KING 1979, CARPENTER et al. 1986, KARSTEN 1991, NISHIGUCHI und SOMERO 1992) bzw. Hitzestreß (NIKOLOPOULOS und MANETAS 1991) in Betracht gezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Gehalte der genannten Osmolyte von *A. arcta* (Arktis und Antarktis) in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht (Abb. 20). Dabei zeigte sich, daß die zelluläre Konzentration von Prolin mit sinkender Temperatur signifikant anstieg und die der Saccharose über den gesamten Temperaturbereich nahezu konstant blieb. Der DMSP-Gehalt variierte jedoch in Abhängigkeit vom untersuchten Isolates. Der von KARSTEN (1991) postulierte stimulierende Einfluß niedriger Temperaturen auf den zellulären DMSP-Gehalt polarer Grünalgen konnte nur bei dem arktischen Isolat von *A. arcta* bestätigt werden. Beim antarktischen Isolat hingegen war der Gehalt mit zunehmender Temperatur höher. Untersuchungen an kaltgemäßigten Isolaten von *A. arcta* im Temperaturbereich von 0 °C bis 15 °C konnten eine Korrelation des DMSP-Gehaltes weder mit niedrigen Temperaturen (Abb. 22), noch mit dem optimalen Wachstumsbereich aufzeigen (BISCHOFF und WIENCKE 1995). Darüber hinaus waren die Gehalte entgegen der Annahme von KARSTEN et al. (1990a, 1991) für die polaren Isolate nicht signifikant höher als die der kaltgemäßigten Isolate von *A. arcta*. Der deutliche Anstieg der Prolin-Konzentration bei niedrigen Temperaturen mit einer gleichzeitigen Zunahme des Gesamtproteingehaltes (vgl. Kap. 3.5) könnte auf eine *de novo*-Synthese des Prolins im Zuge einer vermehrten Proteinsynthese hindeuten.

Die nachfolgende Diskussion soll klären, ob die bei Salzstreß bestimmten organischen Osmolyte von *A. arcta* eine enzymstabilisierende Wirkung auf MDH und G6P-DH entfalten und diese ggf. sowohl bei tiefen Temperaturen als auch in hohen Konzentrationen aufrecht erhalten werden kann.

Die eingesetzten Konzentrationen der Osmolyte (DMSP, Prolin, Saccharose) in den Ansätzen sollten annähernd dem Bereich der physiologischen Bedingungen in der Zelle entsprechen. Die entscheidenden Stoffwechselleistungen finden im Cytoplasma statt, daher wird von einer überwiegend cytoplasmatischen Lokalisation der kompatiblen Substanzen ausgegangen (KIRST 1990, BISSON und KIRST 1995). Die genaue Angabe der jeweiligen Osmolytkonzentration in der Pflanzenzelle gestaltet sich wegen der aufwendigen Ermittlung des Cytoplasmavolumens,

welches nur einen kleinen Teil des Gesamtvolumens ausmacht, äußerst schwierig und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt.

Die folgenden Konzentrationsangaben in mmol / kg Zellwasser entsprechen der Angabe mol / m³. Salinitätsuntersuchungen (7 bis 68 PSU) an *A. arctica* (Antarktis) ergaben pro kg Zellwasser jeweils 36,3 bis 88,1 mmol DMSP, 48,7 bis 180,3 mmol Prolin und 25,5 bis 49,3 mmol Saccharose (KARSTEN 1991). Die absoluten Osmolytgehalte im Cytoplasma dürften jedoch um einiges höher liegen, da die genannten Untersuchungen das gesamte Zellwasser, einschließlich des extrazellulären Wassers, einbeziehen und so die Cytoplasmakonzentration unterrepräsentieren. DICKSON et al. (1980) vermuten für *Ulva lactuca*, daß bei einer Salinität von z.B. 51 PSU cytoplasmatische DMSP-Beträge von bis zu 600 mmol / kg Zellwasser erreicht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden DMSP, Prolin, Saccharose und das zum Vergleich untersuchte NaCl jeweils in äquimolaren Konzentrationen bis 1000 mOsmol / kg eingesetzt. Für DMSP ergibt sich nach Abzug der Cl⁻ und Na⁺-Anteile eine Konzentration von umgerechnet 222 mol / m³, für Prolin von 854 mol / m³, für Saccharose von 877 mol / m³ und NaCl von 540 mol / m³ (vgl. Kap. 2.1.4, Tab. 5).

4.2.1 Modelle zur Schutzwirkung von kompatiblen Substanzen

Niedrige Temperaturen verringern die Entropie des Wassers, die zu einer Veränderung in der Hydrathülle der Proteine führt. Diese Änderungen bewirken eine Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen und somit eine Solvatisierung der unpolaren Aminosäure-Reste, was wiederum eine Denaturierung des Proteins bewirkt (SUELTER 1990, GALINSKI 1992). In verschiedenen Arbeiten zum Salz-, Gefrier- und Hitzestreß konnte gezeigt werden, daß diese destabilisierenden Effekte durch die Wirkung von kompatiblen Substanzen verringert werden (POLLARD und WYNE JONES 1979, ARAKAWA und TIMASHEFF 1985, MANETAS 1986, CARPENTER et al. 1986). Es wird vermutet, daß alle genannten Streßfaktoren ähnliche physikalische Effekte haben, die zu einer Schwächung der Hydrathülle, z.B. durch Wasserentzug, führen. Die Wirkungsweise kompatibler Substanzen soll dieser Schwächung durch eine weitgehende Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit der Hydrathülle begegnen (GALINSKI 1992). Kompatible Substanzen sind in einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungsklassen wie Polyole, Zucker und Aminosäuren zu finden, die sich stark in ihrer Struktur, ihren hydrophoben Wechselwirkungen und ihrer Ladungsverteilung unterscheiden. Für

die Wirkung der kompatiblen Substanzen auf native Enzyme wurden verschiedene Modelle entwickelt:

- Wasserersatz - Modell ("Water Replacement Hypothesis")

Kompatible Substanzen ersetzen Wassermoleküle in der Hydrathülle der Proteine und wirken so einer Denaturierung unter verringerter Wasseraktivität entgegen. Dieses Modell wurde für Glycerin entworfen und ist auch bei vielen anderen Polyolen denkbar (YANCEY et al. 1982). SCHOBERT (1979) konnte durch spektroskopische Untersuchungen zeigen, daß sich die Hydroxylgruppen des Glycerins ähnlich verhalten wie Wasser und es daher funktionell ersetzen können. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, wonach Glycerin aus der Hydrathülle der Proteine ferngehalten wird (LEE et al. 1979).

- Modifikations - Modell ("Solute Binding Concept")

Hydrophobe Bereiche eines Proteins können durch "Minidetergenzien" maskiert werden, so daß die Affinität zum Wasser erhöht und damit eine Stabilisierung der Hydrathülle bewirkt wird. Prolin gilt als Beispiel für solch ein "Minidetergens". Der hydrophobe Bereich des Moleküls ist dem ebenfalls hydrophoben Bereich des Makromoleküls zugewandt, dadurch tritt der hydrophile Molekülbereich der Iminosäure mit dem Lösungsmittel in Verbindung. Die hydrophoben Proteinbereiche werden somit in hydrophile "umgewandelt". SCHOBERT (1979) spricht dabei von hydrophober Hydratation. Eindeutige Beweise für dieses Modell konnten bisher jedoch nicht erbracht werden (CHIRIFE et al. 1984).

- Ausschluß - Modell ("Preferential Exclusion Model")

Für eine ganze Reihe von kompatiblen Substanzen konnte nachgewiesen werden, daß sie in unveränderter Form vorzugsweise aus der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen sind und hierdurch das Protein hydriert wird (ARAKAWA und TIMASHEFF 1985). Der Mechanismus des Ausschlusses wird kontrovers diskutiert. So erklärt Wiggins (1990) dieses Verhalten auf der Basis, daß Wasser nahe der Grenzflächen strukturell unterschiedlich ist, wobei zwischen dem dichten Hydratwasser und dem weniger dichten freien Wasser ("Bulk"-Wasser) unterschieden werden muß. Die ladungsneutralen kompatiblen Substanzen werden mit ihrer stabilen, "eis-ähnlichen" Hydrathülle von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und liegen im Nicht-Hydrat-Wasser vor, wodurch das Protein vorzugsweise hydriert wird. Andere beschreiben diesen beherrschenden Mechanismus des nicht spezifischen Ausschlusses mit einer ansteigenden Oberflächenspannung, der Beeinflussung der Kohäsion der Wassermoleküle (BULL und BREESE 1974) und / oder mit einer Verbesserung der Wasserstruktur,

da einige kompatible Substanzen strukturell zum Wassergitter passen. Außerdem sollen solche Substanzen die Formation von großen Hydrationsclustern unterstützen (GEKKO und TIMASHEFF 1981). Einigkeit besteht ungeachtet der Ursachen des Ausschlusses darüber, daß kompatible Substanzen, als thermodynamische Konsequenz (Minimierung der Entropie, Verstärkung der hydrophoben Effekte), eine stabilisierende Wirkung gegen Auffaltung und Denaturierung der Proteine zeigen, indem sie diese in ihre native kugelförmige Struktur zwingen (vgl. Abb. 23, GALINSKI 1995). Diese Modellvorstellung hilft zu verstehen, warum Substanzen aus unterschiedlichen Verbindungsklassen ähnliche Effekte hervorrufen. Aber auch dieses Modell kann bestimmte Ausnahmen (z.B. Prolin) hinsichtlich ihrer Wirkungsweise nicht überzeugend erklären.

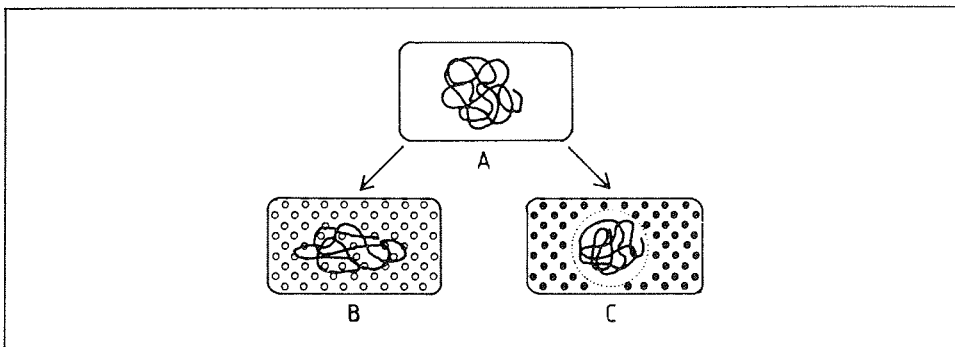


Abb. 23: Schematische Darstellung der Effekte von kompatiblen Substanzen auf die Proteinkonformation. A) Hypothetisches Protein in der nativen Konformation. B) Denaturierte Form eines Proteins in der Umgebung von störenden (bindenden) Substanzen, wie z.B. Harnstoff. C) Stabilisierte Form eines Proteins in Gegenwart von kompatiblen Substanzen, welche bevorzugt aus der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden (nach Galinski 1995).

Für jedes dieser Modelle konnten Hinweise, aber auch Ausnahmen gefunden werden, daher fehlt bis heute eine einheitliche, befriedigende Theorie. In der neueren Literatur wird jedoch dem "Ausschluß-Modell" immer mehr Beachtung geschenkt.

GALINSKI (1992) versucht, das Konzept des "Ausschluß-Modells" mit den Untersuchungen über die Verhältnisse im Cytoplasma (WIGGINS 1990) in Einklang zu bringen:

WIGGINS (1990) argumentiert, daß die gelösten Kationen im Cytoplasma ungleichmäßig verteilt sind. Ihre Konzentration ist in der Nähe negativ geladener Polyanionen größer, d.h. z.B. im Hydratmantel von Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Diese Ungleichverteilung führt zur einer Verminderung der

Wasseraktivität und damit auch zu einem reduzierten Wasserpotential in den Hydrathüllen. Das System gleicht diese Unterschiede zum Teil aus, indem das Molvolumen in den Hydrathüllen verkleinert (Erhöhung des Wasserpotentials) und im Nicht-Hydratwasser vergrößert (Erniedrigung des Wasserpotentials) wird, so daß Zonen von dichtem Wasser und weniger dichtem Wasser entstehen. Dies hat einen Einfluß auf die Fähigkeit zur Lösung von Osmolyten: kleine Moleküle hoher Ladungsdichte treten überwiegend im Wasser hoher Dichte auf, während große Moleküle geringer Ladungsdichte im Nicht-Hydrat-Wasser verteilt sind. Somit liegen Na^+ und K^+ graduell in unterschiedlichen Wasserpopulationen vor: Na^+ -Ionen überwiegen im Hydrat-Wasser, K^+ -Ionen dagegen im freien Wasser. GALINSKI (1992) vermutet, daß die ladungsneutralen kompatiblen Substanzen aufgrund ihrer großen, "eis-ähnlichen" Hydrathüllen von der Protein-oberfläche ausgeschlossen und im Nicht-Hydrat-Wasser verteilt sind. Diese eis-ähnlichen Hydrathüllen der kompatiblen Substanzen sind strukturell aufgeweitetem Wasser ähnlich und können sich daher gut in dieser Wasserpopulation integrieren.

Wasser an hydrophoben Grenzflächen hat ein größeres Potential, weil es weniger Wasserstoffbrücken ausbilden kann als freies Wasser. Daher geht GALINSKI (1992) von einer Aufweitung der Struktur an den Grenzflächen ("Frank-Evans-Eisberge") und einer Komprimierung des Restwassers aus. Da sich hydrophobe Bereiche eher in schwach strukturiertem Wasser hydratisieren lassen, kommt es leicht zu einer Proteinauffaltung in verdichteten Hydrathüllen. Gelöste Stoffe, die sich vorzugsweise in die Hydrathüllen integrieren (wie z.B. Salze), führen so zu einer Verdichtung des Hydratwassers und destabilisieren die hydrophoben Wechselwirkungen. Die kompatiblen Substanzen, die die Salze ersetzen, haben eine Präferenz für das Nicht-Hydrat-Wasser und erhöhen somit nur unwesentlich die Dichte des Hydrat-Wassers. Somit können kompatible Substanzen die Ionenstärke und die Dichte des Hydrat-Wassers verringern und damit die Konformation stabilisieren. Die Funktion der kompatiblen Substanzen ist also in der Aufrechterhaltung einer "natürlichen" Hydrathülle zu sehen.

Im folgenden wird neben der Frage, ob es eine Schutzwirkung kompatibler Substanzen auf die Enzyme MDH und G6P-DH bei tiefen Temperaturen ($-2\text{ }^\circ\text{C}$) gibt, auch die Übertragbarkeit der oben genannten, für Salz-, Gefrier- und Hitzestress entwickelten Erklärungsmodelle diskutiert. Als Maßstab für den Schutz bei tiefen Temperaturen wurde zum einen die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und zum anderen die verbesserte Fähigkeit zur Substratbindung (kleiner K_m) gegenüber dem Kontrollansatz herangezogen. Die Wirkung der einzelnen Osmolyte auf die beiden Enzyme werden nacheinander diskutiert.

4.2.2. Schutzwirkung bei niedrigen Temperaturen

4.2.2.1 DMSP

Die möglichen biologischen Funktionen des DMSP sind nicht vollständig geklärt (KIRST 1994, GRÖNE 1995). Bisher ist die Veränderung der DMSP-Konzentration primär nach hyper- und hyposaliner Belastung untersucht worden. Dabei wurde eine osmotische Regulation bei verschiedenen Mikro- und Makroalgen nachgewiesen (DICKSON et al. 1982; DICKSON und KIRST 1987; REED 1983a; KARSTEN und KIRST 1989; KARSTEN 1991; NOTHNAGEL 1995). Über eine mögliche Schutzwirkung bzw. Kompatibilität des DMSP auf native Enzyme bei unterschiedlichen Streßfaktoren, wie Salz, Hitze und Gefrieren, liegen bisher wenige Ergebnisse vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung des DMSP auf die MDH und die G6P-DH als kompatible und möglicherweise auch als kryoprotektive Substanz bestätigt werden.

Die MDH aus Extrakten von *A. arctica* (Arktis und Antarktis) wurde bei 30 °C, dem Optimum der Enzymaktivität (vgl. Kap. 3.1.2), durch steigende DMSP-Cl-Konzentrationen zunehmend destabilisiert (vgl. Abb. 13a + b). Dagegen wurde die Aktivität mit steigendem DMSP-Gehalt bei -2 °C nicht gehemmt, sondern in höheren Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (-2 °C) geringfügig beschleunigt. Diese, dem destabilisierenden Effekt des DMSP-Cl bei hohen Temperaturen entgegengesetzte gute DMSP-Verträglichkeit bei niedrigen Temperaturen, könnte ein erster Hinweis auf dessen mögliche Kälteschutzfunktion sein. Organische Substanzen, die gut als Kryoprotektoren wirken, können bei höheren Temperaturen Proteine destabilisieren und sich sogar toxisch auf die Zellen auswirken (ARAKAWA et al. 1990). Bei Kälte sollen solche Substanzen nach dem oben beschriebenen "Ausschluß-Modell" von der Proteinoberfläche ferngehalten werden und damit das Protein indirekt stabilisieren (vgl. 4.2.1; ARAKAWA und TIMASHEFF 1985, TIMASHEFF 1982, CARPENTER und CROWE 1988, ARAKAWA et al. 1990). Im Gegensatz dazu können diese Substanzen bei höheren Temperaturen durch ihre hydrophoben Komponenten die Tendenz zeigen, sich an das Protein zu binden und es dadurch zu destabilisieren (ARAKAWA et al. 1990). Diese hydrophoben Wechselwirkungen sind bei höheren Temperaturen stärker, daher können sich Substanzen mit einem hohen hydrophoben Anteil bei steigenden Temperaturen verstärkt an das Protein binden. Die Destabilisierung der MDH bei 30 °C könnte ihre Ursache in einer solchen Interaktion zwischen dem Enzym und dem DMSP als kompatible Substanz haben. In ähnlicher Weise wie die Temperatur soll auch eine Steigerung der Konzen-

tration organischer Substanzen zur Denaturierung durch hydrophobe Interaktion mit dem Protein führen (ARAKAWA et al. 1990). Für die MDH konnte bei -2 °C in dem getesteten Konzentrationsbereich (50 bis 1000 mOsmol / kg, vgl. Tab. 5) keine Enzymhemmung beobachtet werden. Untersuchungen an einigen Enzymen zur Verträglichkeit des DMSP in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentration zeigen, daß DMSP die kältelabile Phosphofruktokinase (PFK) gut gegen Kälte (6 °C) schützt. Bei hohen Temperaturen und Konzentrationen konnte jedoch das DMSP die Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Glutamat-Dehydrogenase nur geringfügig stabilisieren (NISHIGUCHI und SOMERO 1992).

Bei dem als Kryoprotektor bekannten DMSO (Dimethylsulfoxid) sollen die Methylgruppen bei hohen Temperaturen zu hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein führen (ARAKAWA et al. 1990). Da das DMSP ähnliche Methylgruppen-Strukturen aufweist, vermuten NISHIGUCHI und SOMERO (1992), daß die temperaturabhängigen Effekte des DMSP auf das Protein ebenfalls von diesen Gruppen beeinflusst werden. Die Autoren gehen davon aus, daß es bei höheren Temperaturen und Konzentrationen zu einer Interaktion zwischen den hydrophoben Bereichen des Enzyms und dem Dimethyl-Ende des DMSP kommt. Das in diesen Untersuchungen verwendete DMSP der Fa. Research Plus (Bayonne, New Jersey) wird als DMSP-Cl geliefert. Leider wird im obengenannten Artikel nicht darauf eingegangen, ob das mitgeführte Anion einen Einfluß auf die Stabilität des Enzyms hat. Es ist aber nicht auszuschließen, daß der mit der DMSP-Konzentration ansteigende Chloridanteil an der Denaturierung des Enzyms beteiligt ist. In der Reihe der Makromoleküle stabilisierenden und destabilisierenden Ionen zählt Cl^- zu den destabilisierenden Anionen (Hofmeistersche Reihe 1888, aus: YANCEY et al. 1982). So ist bei der MDH aus *A. arctica* für den 30 °C -Ansatz zu vermuten, daß der mitgeführte Chloridanteil die Wechselwirkung mit dem Protein fördert und die Aktivität schon bei niedrigen DMSP-Cl-Konzentrationen beeinflusst, so daß die Kompatibilität zwischen Enzym und DMSP gestört wird.

Die kinetischen Eigenschaften der MDH aus Extrakten von *A. arctica* (Arktis) wurden durch die Zugabe von DMSP-Cl bei -2 °C nur unwesentlich beeinflusst. Der K_m -Wert erhöhte sich minimal, wobei V_{\max} leicht reduziert wurde (vgl. Tab. 11). Von der Proteinoberfläche ausgeschlossene kompatible Substanzen sollen nur einen geringen bzw. keinen Effekt auf die kinetischen Eigenschaften eines Enzyms haben (YANCEY et al. 1982, SOMERO 1986). So ist zu vermuten, daß der leicht negative Einfluß des DMSP-Cl auf die kinetischen Parameter der MDH auf das begleitende Anion zurückzuführen ist. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß auch NaCl die Kinetik der MDH aus *A. arctica* in gleicher Weise, wenn auch in einem wesentlich höheren Ausmaß, inhibiert. Auch frühere Untersuchungen an

der MDH, hier aus *Tetraselmis subcordiformis* (Prasinophyceae), zeigen einen negativen Einfluß des DMSP-Cl sowohl auf den K_m -Wert als auch auf die Reaktionsgeschwindigkeit (GRÖNE und KIRST 1991). Die Autoren setzten bei ihren kinetischen Untersuchungen 100 mol / m^3 DMSP-Cl entsprechend einem osmotischen Potential von 349 mOsmol / kg ein. Dies stimmte in etwa mit den Versuchsbedingungen (400 mOsmol / kg) der vorliegenden Arbeit überein. Diese bei höheren Temperaturen beobachtete MDH-Hemmung führen auch GRÖNE und KIRST (1991) auf das mitgeführte Anion zurück. Es ist aber ebenso vorstellbar, daß diese Hemmung, zumindest bei höheren Temperaturen, durch eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem DMSP und der Proteinoberfläche bedingt ist, wie z.B. von NISHIGUCHI und SOMERO (1992) beschrieben.

Besonders die, trotz Chloridanteil gute Verträglichkeit bzw. mit steigender Konzentration leicht aktivierende Wirkung des DMSP auf die Aktivität der MDH bei $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ deutet im Vergleich zum völlig entgegengesetzten Effekt des NaCl (vgl. Abb. 13c) eine Schutzfunktion des DMSP gegenüber niedrigen Temperaturen an.

Die Aktivität der G6P-DH zeigte bei hohen Temperaturen im Vergleich zur MDH keine konzentrationsabhängige, destabilisierende Wirkung des DMSP-Cl. Vielmehr war bei beiden Untersuchungstemperaturen schon mit geringer Zugabe von DMSP-Cl eine, wenn auch für die unterschiedlichen Isolate verschieden starke Erhöhung der Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich festzustellen (vgl. Abb. 14a + b). Frühere Untersuchungen an Extrakten von *Tetraselmis subcordiformis* zeigten, daß die G6P-DH bei Raumtemperatur unter Zugabe von bis zu 200 mM DMSP-Cl (= 532 mOsmol / kg) annähernd stabil blieb (GRÖNE und KIRST 1991). Somit scheint DMSP-Cl bei höheren Temperaturen allgemein keinen hemmenden Einfluß auf die G6P-DH zu haben, so daß dies keine Besonderheit des Enzyms aus *A. arcta* ist. Daher dürfte die Oberfläche der G6P-DH so beschaffen sein (Hydrophobizität, Ladungsverteilung), daß die Möglichkeit zur Wechselwirkung mit den destabilisierenden Substanzen (z.B. Cl^-), anders als bei der MDH, gering ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Einfluß des NaCl auf die G6P-DH, das bei vielen Enzymen in hohen Konzentrationen destabilisierend wirkt (POLLARD und WYN JONES 1979; YANCEY et al. 1982). Die Aktivität blieb bei $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ über den gesamten Konzentrationsbereich konstant, und auch bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ wirkte das NaCl erst in höheren Konzentrationen ($430 \text{ mol / m}^3 = 800 \text{ mOsmol / kg}$) destabilisierend auf die G6P-DH (vgl. Abb. 14c). Die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH hingegen wurde bei beiden Temperaturen durch steigende NaCl-Konzentrationen stark inhibiert (vgl. Abb. 13c).

Salze werden elektrostatisch an die polaren Regionen des Proteins gebunden, wodurch die Konformation destabilisiert wird. Nur wenn diese Bindungen durch abstoßende Kräfte, wie z.B. unterschiedliche Oberflächenspannungen, aufgebrochen und überlagert werden, können Salze als Stabilisatoren wirken. Somit können auch Salze von der Proteinoberfläche ferngehalten werden und die Konformation stabilisieren (ARAKAWA und TIMASHEFF 1982; LOW 1985). Dies könnte eine Erklärung für die hohe Salz-Unempfindlichkeit der G6P-DH aus *A. arcta* sein.

Der Ausschluß der Salze ist jedoch zum einen von der Oberflächenbeschaffenheit der Proteine (hydrophobe sowie polare Bereiche) und zum anderen von der Konzentration des Salzes abhängig. So sind einige Salze, die vorzugsweise aus der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, dennoch in der Lage, die Hydrathülle des Proteins zu durchdringen und sich an die Oberfläche zu binden (CARPENTER und CROWE 1988). Unterschiedliche Salzempfindlichkeiten einzelner Enzyme eines Systems werden in der Literatur häufiger beschrieben. In Extrakten der einzelligen Grünalge *Dunaliella parva* wurden sowohl NaCl-tolerante als auch -empfindliche Enzyme nachgewiesen (GIMMLER et al. 1984). Die Aktivität der MDH aus *Tetraselmis subcordiformis* (Prasinophyceae) zeigte gegenüber NaCl eine deutliche inhibitorische Wirkung, diese Empfindlichkeit war bei der G6P-DH dagegen nicht festzustellen (RICHTER 1987, GRÖNE und KIRST 1991). Auch die MDH aus anderen niederen und höheren Pflanzen wird häufig als NaCl-empfindlich beschrieben (VON WILLERT 1974, POLLARD und WYN JONES 1979). Die genannten Autoren folgern daraus keine generelle, sondern vielmehr eine partielle Salzinhibition bei Enzymen. Außerdem ist der Grad der *in vitro* gemessenen Salzresistenz nicht unbedingt ein Indikator für eine entsprechende *in vivo*-Resistenz (SCHWAB und GAFF 1990).

Die aktivierende Wirkung des DMSP-Cl auf die Enzymaktivität der G6P-DH bei 30 °C läßt sich mit dem "Ausschluß-Modell" nicht hinreichend erklären. Dieses Modell wird in der Literatur für eine Stabilisierung der funktionsfähigen Hydrathülle des Proteins herangezogen (GALINSKI 1992). Eine beschleunigte Reaktionsgeschwindigkeit durch den Zusatz von DMSP-Cl läßt sich jedoch nicht nur mit einer Aufrechterhaltung der Hydrathülle erklären. Daher ist zu vermuten, daß neben dem bevorzugten Ausschluß aus der Hydrathülle zusätzlich spezifische Interaktionen zwischen Enzym und DMSP-Cl von Bedeutung sind.

Ohne Zusätze wurde die G6P-DH, im Gegensatz zur MDH, durch tiefe Temperaturen (-2 °C) stark negativ beeinflusst. Der K_m -Wert wurde deutlich erhöht und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit vermindert (vgl. Kap. 4.1.3 und Tab. 8). Die Ursache für die Veränderung der kinetischen Parameter bei tiefen Temperaturen könnte mit einer Konformationsänderung des Proteins erklärt werden.

Einerseits werden die hydrophoben Wechselwirkungen bei niedrigen Temperaturen geschwächt, andererseits wird die Entropie des Wassers verringert, wodurch die unpolaren Aminosäure-Reste im Enzym solvatisiert werden (SUELTER 1990). Diesem destabilisierten Zustand sollen nach dem "Ausschluß-Modell" kompatible Substanzen entgegenwirken, indem sie die ursprüngliche Hydratation, zumindest annähernd, wiederherstellen (GALINSKI 1992). Die kinetischen Eigenschaften der G6P-DH wurden bei tiefen Temperaturen durch DMSP-Cl verbessert. Sowohl die Substrataffinität als auch V_{\max} wurde im Vergleich zur Kontrolle (-2 °C) erhöht (vgl. Tab. 12). Dieser aktivierende Einfluß des DMSP-Cl wurde bei nicht-sättigenden Substratkonzentrationen noch deutlich verstärkt (vgl. Abb. 11). Im Vergleich zu 30 °C konnte aber kein vollständiger Ausgleich der kinetischen Parameter erzielt werden (vgl. Tab. 8 + 12). Dem "Ausschluß-Modell" folgend kann also für das DMSP-Cl vermutet werden, daß es aus der Hydrathülle der G6P-DH ausgeschlossen wird und somit einer durch tiefe Temperaturen hervorgerufenen Konformationsänderung entgegenwirkt. Hierdurch trägt DMSP zum Erhalt und damit zum Schutz der ursprünglichen Hydrathülle (30 °C) bei.

Im Gegensatz zum DMSP-Cl liegen zum strukturell ähnlichen Glycin-Betain (analoge Struktur, ebenfalls Zwitterion, Stickstoffatom anstelle des Schwefelatoms) bereits entsprechende Ergebnisse vor. So konnten ARAKAWA und TIMASHEFF (1983) nachweisen, daß Glycin-Betain aus der Hydrathülle der Proteine ferngehalten wird, woraus sie schlossen, daß eine direkte Bindung mit dem Protein unwahrscheinlich ist. Bei Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Hydrathülle von Proteinen konnte außerdem gezeigt werden, daß Glycin-Betain (1 M) die Hydrathülle über einen weiten Temperaturbereich (25 °C bis 45 °C) stabilisiert (LIPPERT 1992, in: GALINSKI 1992). Auch konnte für Glycin-Betain gezeigt werden, daß es die kinetischen Eigenschaften eines Enzyms verbessert. So zeigt z.B. die Trehalase aus Proteobakterien einen sehr hohen K_m -Wert für das Substrat (0,5 M) der in Gegenwart von Glycin-Betain (0,16 M) deutlich verringert wird (GALINSKI 1992).

Aufgrund der bekannten, hauptsächlich in höheren Pflanzen untersuchten, zellverträglichen Eigenschaften der quartären Ammoniumverbindung Glycin-Betain (RHODES und HANSON 1993) wurde in der Literatur vielfach auf eine äquivalente Wirkung der analogen, tertiären Sulfoniumverbindung DMSP geschlossen. Ein direkter Nachweis bei Algen fehlt bisher, doch konnte anhand von Wachstumsuntersuchungen zweier Bakterienkulturen gezeigt werden, daß DMSP die durch osmotischen Streß verursachte Hemmung genauso effektiv lindert wie Glycin-Betain (PAQUET et al. 1994).

Die Wirkung kompatibler Substanzen scheint auch von den physiologischen Bedingungen abzuhängen (BISSON und KIRST 1995). Untersuchungen an der MDH aus *Tetraselmis subcordiformis* zeigten, daß der Schutzeffekt von DMSP unter Substratlimitierung anstieg (GRÖNE und KIRST 1991). Die durch DMSP verbesserte E-S-Affinität der G6P-DH bei -2 °C läßt vermuten, daß unter physiologischer Substratkonzentration ein Ausgleich in der Katalysegeschwindigkeit gegenüber tiefen Temperaturen stattfindet und DMSP somit für dieses Enzym eine Schutzfunktion übernimmt.

DMSP kann aufgrund der Versuchsergebnisse von MDH und G6P-DH aus Extrakten von *A. arcta* als kompatible Substanz eingestuft werden. Die beobachtete MDH-Hemmung bei höheren Temperaturen (30 °C) wird einerseits auf das begleitende Anion zurückgeführt, andererseits könnten aber auch die beschriebenen hydrophoben Wechselwirkungen mit dem DMSP die Stabilität der MDH beeinflussen. Somit ist die Kompatibilität des DMSP mit der MDH nicht restlos geklärt. Aber auch andere allgemein anerkannte kompatible Substanzen sind durchaus nicht immer ohne Einfluß auf die Enzymaktivität: während z.B. POLLARD und WYN JONES (1979) keine MDH-Inhibierung durch Glycin-Betain (500 mol / m³) feststellten, berichtet GINZBURG (1987) nach Zugabe von Glycin von Inhibition, Aufhebung der NaCl-Inhibition oder Stabilisierung verschiedener Enzyme aus *Dunaliella* sp..

Bei tiefen Temperaturen von -2 °C, wie sie im natürlichen Habitat von *A. arcta* auftreten, konnte keine schädigende Wirkung des DMSP für die untersuchten Enzyme gefunden werden, vielmehr war für die G6P-DH eine leichte Aktivierung festzustellen. Für die G6P-DH konnte in den vorausgegangenen Untersuchungen (vgl. Kap. 4.1) keine eindeutige Anpassungsstrategie an tiefe Temperaturen festgestellt werden. Somit könnte die durch DMSP-CI verbesserte katalytische Effizienz gerade für dieses Enzym bedeutend sein, um eine positive Stoffwechsellanz bei niedrigen Temperaturen aufrechtzuerhalten.

Die Synthese von DMSP ist allerdings stark lichtabhängig (KARSTEN et al. 1990b; GRÖNE 1991; VETTER und SHARP 1993), nach längerer Dunkelheit wird diese Verbindung bei *A. arcta* wieder metabolisiert (KARSTEN 1991). Im Winter, bei völliger Dunkelheit, würde demnach DMSP als Schutzsubstanz ohne Bedeutung sein. *A. arcta* überdauert den Winter ohne Wachstum als ausgestrecktes, filamentöses System (BISCHOFF und WIENCKE 1995), so daß die Stabilisierung "aktiver" Enzyme energetisch sogar ungünstig wäre. Erst verbesserte Lichtbedingungen mit gesteigerten Stoffwechselraten im Frühjahr machen einen Schutz gegen Kälte und Gefrieren notwendig.

Durch den unterschiedlichen Einfluß der Temperatur auf die DMSP-Gehalte der verschiedenen *A. arcta*-Isolate (Abb. 20) scheint fraglich, ob DMSP als alleinige

Kälteschutzsubstanz in Frage kommt. Vielmehr wäre es denkbar, daß kompatible Substanzen allgemein aufgrund ihrer jeweiligen Wirkungsweise oder in Kombination verschiedener Substanzen einen gewissen Schutz gegen Kälte gewährleisten. Es scheint daher sinnvoll, die Funktion des DMSP nicht unabhängig vom Vorhandensein anderer organischer Verbindungen und / oder kompatibler Substanzen in der Zelle zu sehen.

4.2.2.2 Prolin

Die Verträglichkeit der Iminosäure Prolin ist für verschiedene Enzyme unterschiedlicher Organismen mit einer Reihe von Arbeiten belegt. So wird die Aktivität der MDH aus einigen höheren Pflanzen (*Rhizophora mangle*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Cicer arietium*, *Spinacia oleracea*) durch die Zugabe von bis zu 600 mol / m³ Prolin nicht beeinträchtigt (SOMMER et al. 1990). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen POLLARD und WYN JONES (1979), die die dehydrierende MDH aus *Hordeum vulgare* (Gerste) bis 500 mol / m³ Prolin testeten. Die Fällung der Glutaminsynthetase aus *Honduras distichom* (Gerste) konnte durch die Zugabe von Prolin vermindert bzw. kompensiert werden (PALEG et al. 1985). Der Einfluß von Prolin ist dabei jedoch pH- und konzentrationsabhängig.

Wenn auch die Funktion von Prolin als Schutzsubstanz in vielen Organismen bei Salzstreß nachgewiesen wurde, so gilt dies dennoch nicht generell. Untersuchungen an Enzymen von *Salsola soda* (Chenopodiaceae) zeigten, daß Prolin keinen Schutz gegen Inhibierung der Enzyme durch NaCl bietet, während dieser Schutz bei Enzymen aus *Cynodon dactylon* (Hundszahngras) gegeben war (NIKOLOPOULOS und MANETAS 1991). Diese Autoren gehen daher von einer Co-Evolution zwischen Osmolytensystem und Enzymstruktur aus. Damit könnte die Präferenz bestimmter Osmolyte in einigen Bakterien (GALINSKI 1993), Algen (WEGMANN 1986), höheren Pflanzen und Tieren (YANCEY et al. 1982, SOMERO 1986) erklärt werden.

Abhängig vom jeweiligen Enzym (Hexokinase, G6P-DH, α -Amylase, Glutaminsynthetase, MDH, Nitratreduktase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, LDH, PFK) war der Effekt einer Hitzestabilisierung durch Prolin extrem unterschiedlich und konzentrationsabhängig (PALEG et al. 1981, LAURIE und STEWART 1990, NIKOLOPOULOS und MANETAS 1991, GALINSKI 1992). Eine Schutzwirkung des Prolins bei Gefrieren konnte *in vivo* bei Zelluntersuchungen von *Zea mays* (Mais; WITHER und KING 1979) sowie bei Enzymuntersuchungen an der LDH und der PFK nachgewiesen werden (CARPENTER und CROWE 1988, GALINSKI 1992).

Ältere Untersuchungen haben gezeigt, daß es bei der Kältehärtung höherer Pflanzen zur Prolinakkumulation kommt (CHU et al. 1974, SOSINSKA und MALESZEWSKI 1978), aber auch bei Algen konnten höhere Prolingehalte bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen werden (WANZEK 1994, JACKSON und SEPPELT 1995). So wird die Iminosäure Prolin in der Literatur häufig als kryoprotektive Substanz diskutiert. Untersuchungen zur Wirkung des Prolins auf die Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen liegen jedoch bisher nicht vor.

Auf die Aktivität der MDH und G6P-DH aus *A. arcta* hatte die Zugabe von Prolin unterschiedliche Effekte (Abb. 13 + 14). Die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH wurde bei beiden Temperaturen (30 °C und -2 °C) durch Zugabe von Prolin über den gesamten Konzentrationsbereich (50 bis 1000 mOsmol / kg, vgl. Tab. 5) nicht beeinträchtigt. Bei der G6P-DH hingegen sank die Aktivität bei 30 °C in demselben Konzentrationsbereich nahezu kontinuierlich auf 79% der Anfangsaktivität. Die Aktivität bei -2 °C zeigte dagegen eine Stimulierung zwischen 400 und 600 mOsmol / kg (342 - 513 mol / m³) Prolin, höhere Konzentrationen erbrachten keine Aktivitätssteigerung. Der Bereich zwischen 400 und 600 mOsmol / kg Prolin könnte in etwa den physiologischen Bedingungen in der Zelle von *A. arcta* entsprechen. So konnten Untersuchungen an *Distichlis spicata* (Halophyt) cytoplasmatische Prolin-Gehalte von 280 mol / m³ bis 560 mol / m³ belegen (KETCHUM et al. 1991).

Die stabilisierende Wirkung des Prolins auf den Stoffwechsel wurde von SCHOBERT und TSCHESCHE (1978) mit dem oben beschriebenen "Modifikations - Modell" (vgl. Kap. 4.2.1) erklärt. Nach dieser Vorstellung sollen sich die hydrophoben Bereiche des Pyrrolidin-Ringes mit dem hydrophoben Anteil des Proteins verbinden. Dadurch wandeln sich diese Gruppen in hydrophile Bereiche um, steigern die Löslichkeit und damit die Stabilität des Proteins. Kalorimetrische und IR-spektroskopische Untersuchungen von RUDOLPH und CROWE (1986) konnten diese Vorstellungen erhärten, auch wenn die Autoren einräumen, daß mit ihren Untersuchungen das "Modifikations - Modell" nicht restlos bestätigt werden kann. Zusätzlich gehen sie davon aus, daß für eine polymere Assoziation zwischen Prolin und dem Protein eine Konzentration von 1 M bis 2 M nötig ist, welche für cytoplasmatische Verhältnisse sicherlich zu hoch liegt. Außerdem konnte für einige Fälle gezeigt werden, daß das Prolin sehr wohl von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird (ARAKAWA und TIMASHEFF 1985), also nach dem "Ausschluß - Modell" indirekt stabilisierend wirkt. Nach GALINSKI (1992) ist dem "Modifikations - Modell" außerdem entgegenzuhalten, daß aus thermodynamischer Sicht eine Wechselwirkung mit hydrophoben Bereichen des Moleküls wahrscheinlich auch eine Exposition dieser Gruppen und damit eine Denaturierung begünstigen müßte. So läßt sich für Prolin vermuten,

daß die Bindung an Proteine und der damit verbundene Anstieg der Proteinlöslichkeit keine feststehende Eigenschaft dieser Iminosäure ist. Vielmehr könnte eine Bindung des Prolins nur bei relativ hydrophoben Proteinen wie z.B. β -Lactoglobulin über den Ausschluß dominieren (CARPENTER und CROWE 1988, aufbauend auf: SCHOBERT und TSCHESCHE 1978). Daher könnte es auch möglich sein, daß beide Effekte bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen eine Rolle spielen. Bei niedrigen Temperaturen, wo die hydrophoben Wechselwirkungen gering sind, würde Prolin die Proteine dadurch stabilisieren, daß es von der Oberfläche ferngehalten wird. Hohe Temperaturen dagegen begünstigen die hydrophoben Wechselwirkungen, damit wäre eine Interaktion zwischen stark hydrophoben Enzymen und dem Prolin denkbar. Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit (hydrophobe sowie polare Bereiche) beider Enzyme, MDH und G6P-DH, könnten demnach die Wirkung des Prolins beeinflussen.

Die kinetischen Eigenschaften der MDH und der G6P-DH wurden bei $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch Zusatz von Prolin verbessert. Sowohl bei der MDH als auch besonders bei der G6P-DH wurde die Fähigkeit zur Substratbindung sowie V_{max} erhöht (vgl. Tab. 11 + 12). Bei der G6P-DH konnte jedoch der negative Einfluß der niedrigen Temperatur nicht vollständig kompensiert werden (vgl. Kap. 4.1). Es scheint aber durch den Zusatz von Prolin möglich, die Enzymaktivität so weit zu stabilisieren, daß eine positive Stoffwechselleistung erreicht wird. Insbesondere bei physiologischer Substratkonzentration ist der positive Effekt des Prolins auf beide Enzyme noch deutlicher (vgl. Abb. 9 + 11). Untersuchungen an der Phosphoenolpyruvate-Carboxylase zweier C_4 -Halophyten konnten zeigen, daß der Einfluß von Prolin im Bereich der Substratsättigung gering ist, unter physiologischer Substratkonzentration jedoch sowohl eine fördernde als auch eine inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität haben kann (MANETAS et al. 1986). Hieraus folgern die Autoren, daß die Wirkung kompatibler Substanzen bei Substratkonzentrationen untersucht werden muß, die den Verhältnissen *in vivo* entsprechen. Die Tatsache, daß sich die Wirkung von Schutzstoffen mitunter nicht in der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, sondern in einer Veränderung des K_m -Wertes ausdrückt, unterstreicht die Notwendigkeit enzymkinetischer Untersuchungen zur Beurteilung eines möglichen Schutzeffektes.

Sowohl die deutlich ansteigenden zellulären Prolin-Konzentrationen bei tiefen Temperaturen ($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, vgl. Abb. 20) als auch die positive Wirkung des Prolins auf die Kinetik von MDH und G6P-DH weisen auf eine Kälteschutzfunktion hin.

4.2.2.3 Saccharose

Saccharose ist der wichtigste Transportzucker grüner Pflanzen und gilt als schnell verfügbarer Energielieferant. Die Anreicherung von Saccharose unter osmotischem Streß wurde für verschiedene Cyanobakterien (REED et al. 1984; WARR et al. 1984, 1987) und Makroalgen (EDWARDS et al. 1987, KARSTEN und KIRST 1989a, WINTER und KIRST 1990, KARSTEN 1991) beschrieben. Als kompatible Substanz nimmt Saccharose eine Zwischenstellung ein. Während physiologische Konzentrationen dieser Substanz die Protein- und Membranstrukturen in unterschiedlichen Streßsituationen (z.B. Salz-, Trocken- und Gefrierstreß) schützen (CARPENTER und CROWE 1988; HEBER et al. 1981; KOSTER und LEOPOLD 1988), wirken hohe Konzentrationen oftmals inhibierend auf die Enzyme bzw. auf den gesamten Stoffwechsel (BROWN und SIMPSON 1972; WARR et al. 1984, 1988, GALINSKI 1992). Die Aktivität der Glutamin-Synthetase aus Cyanobakterien wird z.B. schon bei einer Konzentration von ≥ 200 mM Saccharose stark inhibiert (WARR et al. 1984). Solches Verhalten könnte aber durch die im Vergleich zu Prolin und DMSP wesentlich geringere Löslichkeit der Saccharose begründet sein (BISSON und KIRST 1995). Saccharose ist somit in hohen Konzentrationen weniger kompatibel als andere organische Verbindungen (z.B. Glycin-Betain, Prolin) und scheint als Schutzstoff für physiologisch aktive Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen (BROWN 1976, REED et al. 1986). So werden Algen und Cyanobakterien, die Saccharose als ihr organisches Hauptosmolyt synthetisieren, oft nur bei niedrigen Salinitäten vorgefunden (MACKAY et al. 1984; BOROWITZKA 1985). Aber auch Algen aus der Gezeitenzone benutzen Saccharose bei der osmotischen Regulation, wobei sie allerdings hier gegenüber anderen Osmolyten, so z.B. bei *A. arctica* (Antarktis) gegenüber Prolin und DMSP (KARSTEN 1991), nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Vorteil der Saccharose für den Organismus könnte darin liegen, daß sie, als Haupt-Photosyntheseprodukt, bei hyperosmotischer Belastung sehr schnell synthetisiert wird (WARR et al. 1987) und damit den anfänglichen Ionenstreß zumindest teilweise kompensieren kann. Im Gegensatz dazu setzt z.B. die Synthese von DMSP, als Sekundärmetabolit, erst später ein, so daß DMSP nicht an einer kurzfristigen osmotischen Regulierung beteiligt ist (EDWARDS et al. 1987; KIRST 1990).

In trockenresistenten Organismen wurden hohe Konzentrationen an Saccharose gefunden, die mit einer Schutzfunktion während der Austrocknung in Zusammenhang gebracht werden (MADIN und CROWE 1975; HERSHOVITZ et al. 1991). Die Stabilisierung der Enzyme und insbesondere der Membranen bei Trocknung erfolgt nach dem "Wasserersatz-Modell"(vgl. Kap. 4.2.1). Die OH-Gruppen der Saccharose interagieren mit polaren Strukturen der Enzymoberfläche, wodurch

sie das schwindende Wasser ersetzen und auf diese Weise die native Konformation bewahren (CLEGG et al. 1982).

Bei Untersuchungen zum Hitze- bzw. Gefrierschutz hing die Stabilisierung durch Saccharose jeweils von der Natur des zu schützenden Proteins ab (BACK et al. 1979; CARPENTER und CROWE 1988; GALINSKI 1992). Die Aktivitäten der MDH und G6P-DH wurden bei verschiedenen Saccharose-Konzentrationen unterschiedlich beeinflusst. Die Reaktionsgeschwindigkeit der MDH wurde bei beiden Temperaturen (30 °C und -2°C) durch Zugabe von bis zu 800 mOsmol / kg (702 mol / m³) Saccharose kontinuierlich gehemmt (vgl. Abb. 13e). Im Gegensatz dazu zeigte die G6P-DH bei beiden Temperaturen eine Steigerung der Aktivität (vgl. Abb. 14e). Nach Untersuchungen von LEE und TIMASHEFF (1981) wird auch Saccharose bevorzugt aus der Hydrathülle ausgeschlossen und wäre somit nach dem "Ausschluß-Modell" in der Lage, die Proteine indirekt zu stabilisieren. Saccharose scheint demnach das jeweilige Enzym gegen verschiedene Streßfaktoren, wie z.B. tiefe Temperaturen oder Trocknung, unterschiedlich zu schützen. So stellt eine Trocknung bis zur völligen Dehydrierung der Hydrathülle des Proteins eine grundsätzlich andere Streßsituation als das Gefrieren dar. Ihr muß dementsprechend durch andere Stabilisierungsmechanismen begegnet werden (CROWE et al. 1990, ARAKAWA et al. 1990).

Dennoch scheint die unterschiedliche Wirkung der Saccharose auf die Enzymaktivität von MDH und G6P-DH mit dem "Ausschluß-Modells" nicht hinreichend geklärt. So wäre zwar denkbar, daß sich das Ausschlußverhalten der Saccharose in Abhängigkeit von der Temperatur ändert und bei niedrigen oder hohen Temperaturen nicht unbedingt die gleiche Wirkung zeigt. Dies würde dann die unterschiedliche Wirkung in Abhängigkeit von der Temperatur erklären, nicht aber die verschiedenen Effekte auf MDH und G6P-DH. Diese Unterschiede lassen vermuten, daß zusätzliche spezifische Interaktionen zwischen der molekularen Struktur der Enzyme und der Saccharose eine Rolle spielen. So wurde schon für DMSP und Prolin als wahrscheinlich angenommen, daß sich die Oberflächenbeschaffenheit der beiden Enzyme unterscheidet und dadurch die Schutzwirkung der kompatiblen Substanzen beeinflusst wird. Um eine abschließende Aussage über die molekularen Strukturen der beiden Enzyme, sowie deren Interaktion mit den untersuchten Schutzsubstanzen treffen zu können, müßten jedoch gezielte Untersuchungen folgen.

Der K_m -Wert sowie V_{max} wurden für die MDH durch 400 mOsmol / kg Saccharose nur unwesentlich beeinflusst (Tab. 11). Bei der Aufnahme der Substratsättigungskurve für die MDH wurde deutlich, daß der hemmende Effekt der Saccharose erst im Sättigungsbereich auftrat (vgl. Abb. 9). So ist zu vermuten, daß bei physiologischer Substratkonzentration die beschriebene Hemmung der Reaktionsge-

schwindigkeit in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration deutlich vermindert wäre. Somit scheint Saccharose auch für die MDH zumindest im physiologischen Substratbereich (Oxalacetat) bei niedrigen Temperaturen verträglich zu sein.

Für die G6P-DH ist Saccharose selbst in hohen Konzentrationen und bei tiefen Temperaturen (-2 °C) verträglich. Der negative Einfluß niedriger Temperaturen auf die Kinetik der G6P-DH wurde durch Saccharose deutlich vermindert, die Fähigkeit der Substratbindung und V_{\max} wurden erhöht (Tab. 12). Diese verbesserte Fähigkeit zur Substratbindung schafft bei physiologischer Substratkonzentration einen Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit. Somit kann für die Saccharose zumindest für dieses Enzym eine Kälteschutzfunktion angenommen werden.

Ein positiver Einfluß tiefer Temperaturen auf den zellulären Saccharosegehalt konnte, im Gegensatz zu den Gehalten an Prolin und teilweise auch an DMSP, für beide *Acrosiphonia*-Isolate nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 20). Saccharose scheint also hier trotz ihrer stabilisierenden Wirkung bei tiefen Temperaturen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Dennoch wäre es denkbar, daß erst eine Kombination verschiedener kompatibler Substanzen einen Organismus befähigt, mit einer bzw. unterschiedlichen Streßsituationen (z.B. Salz, Dehydratation, Gefrieren) umzugehen. Für die osmotische Regulation bei Algen werden in der Literatur häufig Kombinationen aus verschiedenen organischen Verbindungen genannt, wie z.B. Sorbitol / Prolin bei *Stichococcus bacillaris* (BROWN und HELLEBUST 1978), Sorbitol / Duecitol bei *Bostrychia scorpioides* (KARSTEN und KIRST 1989b), Mannitol / Altritol bei *Himantalia elongata* (WRIGHT und REED 1985) und Prolin / Saccharose / DMSP bei *Enteromorpha intestinalis* (EDWARDS et al. 1987).

Insgesamt läßt also die nur isolierte Betrachtung verschiedener organischer Substanzen *in vitro* wahrscheinlich keine vollständige Aussage über die Reaktionen unter natürlichen Verhältnissen (*in vivo*) zu (SCHWAB und GAFF 1990). So gibt es einige Schwierigkeiten, die *in vitro*-Ergebnisse in Beziehung zur intakten Pflanze zu setzen:

- a) in nicht völlig gereinigten Enzymextrakten können sich Effekte überlagern, die durch exo- und endogene Substanzen hervorgerufen werden.
- b) die Ionen- und Substratkonzentrationen *in vitro* sind nicht die gleichen wie die in der intakten Pflanze.
- c) die Enzymempfindlichkeit wird durch die Extraktionsmethode, die Ansatztemperatur und die Lagerung des Extraktes nach der Isolation beeinflußt.
- d) *in vivo* Enzyme arbeiten unter substratlimitierten Bedingungen.

4.2.3 Gefrierschutz

Im Gegensatz zum zuvor beschriebenen Kältestreß (vgl. Kap. 4.1) zeigt Gefrieren ähnliche Effekte wie hohe Sälinitäten oder Austrocknung (BISSON und KIRST 1995). In erster Linie bestehen diese Effekte in einer Senkung des intrazellulären Wasserpotentials und damit in einer Dehydratation. Hieraus resultiert eine erhöhte Osmolytkonzentration im Cytoplasma (Ionen, organische Substanzen) und in der Vakuole (hauptsächlich Ionen). Es wird daher häufig vermutet, daß der Schutzeffekt der kompatiblen Substanzen (Stabilisierung der Proteine und Membranen) für die genannten Streßfaktoren identisch ist und kompatible Substanzen nicht nur bei steigenden Sälinitäten und Austrocknung schützen, sondern auch kryoprotektiv wirken (BISSON und KIRST 1995).

Die Schutzwirkung der kompatiblen Substanzen Prolin, Saccharose und DMSP sowie verschiedener anorganischer Salze gegen Gefrieren und anschließendes Auftauen wurde am Testsystem der LDH untersucht. Dieses native Enzym wurde aufgrund seiner hohen Thermolabilität ausgewählt und war bereits oft Gegenstand von Stabilitätsuntersuchungen.

Alle eingesetzten Verbindungen konnten die LDH gegen Gefrieren und Wiederauftauen schützen. Der Grad des Schutzes war jedoch von der jeweiligen Substanz sowie von deren Konzentration abhängig (vgl. Abb. 17 + 18). Wie schon erwähnt (vgl. Kap. 3.3.3), kam es in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 200 mOsmol / kg (vgl. Tab. 5) bei allen Substanzen bis auf DMSP-Cl zu einem unerwarteten Einbruch im Aktivitätsanstieg. Obwohl in den graphischen Darstellungen von CARPENTER und CROWE (1988) ebenfalls konzentrationsabhängige Schwankungen der kryoprotektiven Wirkung verschiedener Substanzen auftraten, blieb dieses Phänomen in der Diskussion unberücksichtigt. Bei einem isoliert aufgetretenen Ereignis wäre eine partiell höhere Konzentration als Folge eines Durchmischungsfehlers als mögliche Ursache in Betracht zu ziehen. Da es sich hier aber gerade um eine Gemeinsamkeit fast aller untersuchten Stoffe handelte, erscheint wahrscheinlicher, ein allgemeines Prinzip hinter diesem Phänomen zu vermuten. Ungeachtet dessen bleibt als entscheidend festzustellen, daß die kryoprotektive Wirkung aller Substanzen mit steigender Konzentration tendenziell zunahm.

CARPENTER und CROWE (1988) vermuten, daß die stabilisierenden und destabilisierenden Interaktionen verschiedener Substanzen mit dem Protein, die während des Gefrierens und Auftauens auftreten, nur in der wässrigen Phase Bedeutung haben. Somit muß der beim Gefrieren auftretende osmotische Schock, der z.B. Veränderungen im pH der Lösung sowie andere destabilisierende Bedingungen schafft (FISHBEIN und WINKERT 1979), nur als eine weitere Form von

lösungsinduzierter Störung der wässrigen Phase betrachtet werden. Infolgedessen ist es sehr wahrscheinlich, dass Substanzen, die im wässrigen System eine stabilisierende Wirkung auf Proteine haben, auch in den wässrigen Phasen des Gefrierens oder Auftauens stabilisierend wirken. CARPENTER und CROWE (1988) untersuchten die schützende Wirkung 28 verschiedener Substanzen, darunter Zucker, Polyole und Aminosäuren, auf die LDH (M_4) nach Gefrieren und anschließendem Auftauen. Die Autoren zeigten, daß (mit einer Ausnahme) alle Substanzen, die im wässrigen System überwiegend vom Kontakt mit der Proteinoberfläche ausgeschlossen waren, auch gut als Kryoprotektoren wirkten. Auch GALINSKI (1992) vermutet, daß das "Ausschluß-Modell" (vgl. Kap. 4.2.1; ARAKAWA und TIMASHEFF 1985) nicht nur für isolierte Enzyme im ungefrorenen Zustand, sondern auch bei Gefrieren und Wiederauftauen Gültigkeit hat. Die bisher für Algen bekannten kompatiblen Substanzen, die eine kryoprotektive Wirkung auf isolierte Proteine haben, sind in Tabelle 15 zusammengefaßt. Darüber hinaus ist angegeben, für welche Substanzen ein Ausschluß aus der Hydrathülle verschiedener Proteinen nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen bezüglich Prolin, Saccharose und NaCl nicht vollständig mit den Befunden von CARPENTER und CROWE (1988) überein. Bei deren Untersuchungen zeigte NaCl bis zu einer Konzentration von 2 M keinerlei stabilisierende Wirkung auf die LDH nach Gefrieren und Wiederauftauen. Dies, obwohl bekannt ist, daß dieses Salz aus der Hydrathülle verschiedener Proteine ausgeschlossen wird (ARAKAWA und TIMASHEFF 1982). Der Ausschluß von Salzen ist jedoch zum einen von deren Konzentration und zum anderen von der Oberflächenbeschaffenheit der Proteine (hydrophobe sowie polare Bereiche) abhängig. So sind einige Salze, die vorzugsweise aus der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, dennoch in der Lage, die Hydrathülle des Proteins zu durchdringen und sich an die Oberfläche zu binden (ARAKAWA und TIMASHEFF 1984). CARPENTER und CROWE (1988) vermuten daher, daß das von ihnen eingesetzte Isoenzym M_4 über einen hohen Anteil an polaren Regionen verfügt und somit das NaCl elektrostatisch an das Protein gebunden wird. Der destabilisierende Effekt einer NaCl-Bindung wäre in diesem Fall stärker als die ausschließenden Kräfte, die das Salz von der Proteinoberfläche fernhalten und damit das Protein dem "Ausschluß-Modell" entsprechend indirekt stabilisieren (vgl. Kap. 4.2.2.). In der vorliegenden Arbeit wurde statt des Isoenzym M_4 ein Isoenzymgemisch der LDH untersucht. Mit diesem LDH-Isoenzymgemisch konnte eine 100%ige Stabilisierung durch NaCl bei einer Konzentration von 0,86 M (1600 mOsmol / kg) nach Gefrieren und Wiederauftauen erreicht werden. Die differierende Wirkung des NaCl könnte auf unterschiedlichen molekularen Strukturen der beiden Enzym-Typen beruhen. Somit scheint das Ausschluß-

verhalten stark von der Natur des zu schützenden Proteins abzuhängen. Die drei anderen Salze zeigten auf die LDH nach Gefrieren und Wiederauftauen, der *Hofmeisterschen* Reihe entsprechend, folgende Stabilisierung : $\text{NH}_4\text{Cl} > \text{KCl} > \text{KBr}$. Generell scheint die Wirkung eines Salzes auf die Proteinestabilität vom Gleichgewicht zwischen der Bindung an das Enzym (destabilisierend) und dem Ausschluß aus der Proteinoberfläche (stabilisierend) abhängig zu sein (ARAKAWA und TIMASHEFF 1982, 1984), was durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert wird.

Tab. 15: In Algen vorkommende kompatiblen Substanzen, für die eine kryoprotektive Wirkung auf verschiedene isolierte Proteine nachgewiesen wurde.

Substanzen	Referenz zum bevorzugten Ausschluß aus der Hydrathülle	Proteine	Referenz der kryoprotektiven Wirkung
Saccharose	1	LDH, PFK; Katalase, Chymotrypsinogen, α -Amylase	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
Trehalose	n.n.	LDH, PFK	5
Glycerin	2	LDH, PFK, Katalase, GDH, TPD, α -Amylase,	7, 8, 9, 11, 12
Sorbitol	3	LDH	9
Mannitol	3	LDH	9
Prolin	4b	LDH, PFK	5, 7, 13
Glycin-Betain	4b	LDH, PFK	5, 6, 13
Glutamat	4a	LDH, MDH, ADH, PK, G6P-DH, Myosin	13, 14, 15,
Taurin	4b	LDH	13
DMSP	n.n.	LDH	diese Arbeit

Abkürzungen: LDH - Lactat-Dehydrogenase; PFK - Phosphofruktokinase; GDH - Glutamatdehydrogenase; TPD - Triosephosphat-Dehydrogenase; MDH - Malat-Dehydrogenase; ADH - Alkohol-Dehydrogenase; PK - Pyruvat-Kinase; G6P-DH - Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; n.n. - nicht nachgewiesen.

Literatur: 1) LEE und TIMASHEFF 1981; 2) LEE et al. 1979; 3) GEKKO und MORIKAWA 1981; 4) ARAKAWA und TIMASHEFF a: 1984, b: 1985; 5) GALINSKI 1992; 6) LIPPERT und GALINSKI 1992; 7) CARPENTER et al. 1986; 8) CHILSON et al. 1965; 9) SHIKAMA und YAMAZSKI 1961; 10) BRANDTS et al. 1970; 11) WHITTAM und ROSANO 1973; 12) ASHWOOD-SMITH und WARBY 1972; 13) CARPENTER und CROWE 1988; 14) AKAHANE et al. 1981; 15) TAMIYA et al. 1985.

Die kompatiblen Substanzen Prolin, Saccharose und DMSP wirkten in einem wesentlich engeren Konzentrationsbereich stabilisierend auf die LDH - Aktivität als die anorganischen Salze (vgl. Abb. 17 + 18). Dies liegt vermutlich darin begründet, daß bei niedriger Salzkonzentration die Bindung an das Protein die vor-

herrschende Interaktion ist und erst ab einer bestimmten Konzentration der Ausschluß des Salzes aus der Hydrathülle des Proteins überwiegt (CARPENTER und CROWE 1988).

Auch bei den kompatiblen Substanzen wurden große Unterschiede nach Gefrieren und Auftauen gefunden, sowohl bezüglich des Schutzgrades als auch in Abhängigkeit von der Natur des zu schützenden Proteins (CARPENTER und CROWE 1988, LIPPERT und GALINSKI 1992, GALINSKI 1992). Obwohl die Substanzen bei den unterschiedlichen Enzymen unter identischen Konditionen eingesetzt wurden, konnten keine vergleichbaren Resultate erzielt werden. Untersuchungen zur kryoprotektiven Wirkung kompatibler Substanzen auf die Aktivität von LDH und PFK zeigten, daß die ungeschützten Enzyme nach viermaligem Gefrieren und Auftauen vollständig inaktiviert waren, während in Gegenwart von z.B. Saccharose (1 M) die LDH (M_4) zu 80%, die PFK dagegen nur zu 60% stabilisiert wurde (LIBBERT und GALINSKI 1992). Ein weiteres interessantes Beispiel stellt Glycin-Betain (1 M) dar, welches die LDH nach viermaligem Gefrieren und Auftauen gar nicht, die PFK jedoch zu 80% stabilisiert (GALINSKI 1992).

In dieser Arbeit konnte Prolin (1000 mOsmol / kg = 854 mol / m³) die LDH beim Gefrieren und Auftauen nur zu 45% stabilisieren und Saccharose (877 mol / m³) sogar nur zu 36%. Dieses Ergebnis für Prolin verwundert, da viele Enzyme z.B. bei Salzstreß durch Prolin stabilisiert werden (POLLARD und WYN JONES 1979; SOMMER 1990). Für Saccharose ist dagegen bekannt, daß diese Substanz in hohen Konzentrationen bei manchen Enzymen als Inhibitor wirkt (WARR et al. 1984), wahrscheinlich infolge sterischer Behinderungseffekte (WARR et al. 1984). Untersuchungen zum Gefrierschutz der LDH (M_4) von CARPENTER und CROWE (1988) sowie GALINSKI (1992) zeigten in Gegenwart von jeweils 1 M Prolin und Saccharose einen wesentlich höheren Gefrierschutz. Mit Prolin konnte nach Gefrieren und Wiederauftauen 70% der Anfangsaktivität der LDH (M_4) und mit Saccharose sogar 80% erreicht werden. Diese Unterschiede in der Stabilität der verschiedenen LDH - Isoenzyme nach Gefrieren und Wiederauftauen liegt wahrscheinlich, wie auch schon bei NaCl vermutet, in Unterschieden der Oberflächenbeschaffenheit (Hydrophobizität, Ladungsverteilung, Hydratation) begründet. Somit scheinen neben dem Ausschluß-Modell auch spezifische Substanz-Protein-Interaktionen eine beachtliche Rolle zu spielen (GALINSKI 1992).

Eine bemerkenswerte Stabilisierung der LDH nach Gefrieren und Wiederauftauen, die ab einer bestimmten Konzentration (ca. 260 mol / m³; vgl. Tab. 5) sogar eine Stimulierung der Aktivität bewirkte (mehr als 100%), wurde mit DMSP-Cl und DMSP-Br erreicht (vgl. Abb. 18). Die Stabilisierung der LDH durch DMSP nach Gefrieren und Wiederauftauen wurde in einem Konzentrationsbereich

(~ 88 bis 266 mol / m³, vgl. Tab.5) erzielt, der als *in vivo* Konzentration durchaus für grüne Makroalgen gemessen werden kann. So konnten z.B. bei der polaren *Enteromorpha bulbosa* bei 0 °C zelluläre DMSP-Gehalte von 210 mol / m³ (mmol / kg Zellwasser) ermittelt werden (KARSTEN 1991). DMSP-Br stabilisierte die LDH im unteren Konzentrationsbereich etwas geringer als DMSP-Cl. Dies liegt vermutlich an den jeweils mitgeführten Anionen Cl⁻ und Br⁻, da Bromid entsprechend der *Hofmeisterschen* Reihe destabilisierender wirkt als Chlorid. Überdies wirkt sich Chlorid steigernd auf die Aktivität der LDH bei 30 °C aus (BERGMEYER 1983).

Das Phänomen einer Stimulierung der Enzymaktivität durch kompatible Substanzen über die Kontrollaktivität hinaus wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Vielmehr wird bei kompatiblen Substanzen davon ausgegangen, daß sie in physiologisch relevanter Konzentration die Enzymaktivität nicht oder nur geringfügig beeinflussen und ihre Funktion nur im Schutz gegen die Inhibierung der Enzymaktivität bei hohen Salzkonzentrationen liegt (POLLARD und WYN JONES 1979; YANCEY et al. 1982; SOMERO 1986). Dennoch könnte die Beschleunigung der Katalysegeschwindigkeit bestimmter Enzyme nach Gefrieren für einige Stoffwechselwege von Vorteil sein, um die verminderte Syntheseleistung während des Gefrierens auszugleichen. Dieser positiver Einfluß des DMSP auf die Enzymaktivität der LDH nach dem Gefrieren steht möglicherweise im Widerspruch zu den Befunden von NISHIGUCHI und SOMERO (1992), die zeigten, daß DMSP in höheren Konzentrationen (0,3 M) keine hitzestabilisierende Wirkung (50 °C) auf die LDH hatte. Die Autoren begründen dies mit einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen Enzym und DMSP, die durch höhere Temperaturen und Konzentrationen verstärkt werden und so das Protein destabilisieren (vgl. Kap. 4.2.2.1). Somit ließe sich eine Stimulierung der LDH nach dem Auftauen schlecht erklären, da die hydrophoben Wechselwirkungen sicherlich schon bei Raumtemperatur und mit steigenden Konzentrationen (> 0,3 M, vgl. Tab. 5) eine Wirkung zeigen. Die von NISHIGUCHI und SOMERO (1992) untersuchte LDH stammt aus einer tropischen Barracuda - Art, deren Metabolismus an Temperaturen um 25 °C gewöhnt sein dürfte, während die hier eingesetzte LDH dem Schweinemuskel entnommen wurde und somit bei Temperaturen von ca. 37 °C funktionieren muß. Es ist daher wahrscheinlich, daß die metabolische Aktivität der beiden LDH-Typen unterschiedlich temperaturabhängig ist, was einen verschieden starken Einfluß auf die thermische Denaturierung und damit auch die unterschiedliche Wirkung des DMSP erklären mag. Weitere Untersuchungen an der LDH zeigten, daß bei drei unterschiedlichen Temperaturen (0, 5, 30 °C) die thermische Denaturierung nach 60 min Inkubation bei 30 °C gegenüber 5 °C und 0 °C stärker ausgeprägt war (Abb. 19). Dies ist insofern verwunderlich, da für ein tierisches Enzym erst bei höheren

Temperaturen ($\geq 37\text{ °C}$) eine solche thermische Denaturierung zu erwarten wäre. Vermutlich spielte hier die Dauer der Inkubationszeit eine erhebliche Rolle, da allein die Zeit die Denaturierungsrate beeinflussen (RUTTLOFF et al. 1978) kann. Unter Zusatz von zwei unterschiedlichen DMSP-Cl - Konzentrationen ($\sim 0,2\text{ M}$ und $\sim 0,4\text{ M}$, vgl. Tab. 5) konnte die LDH deutlich stabilisiert werden. Bei 30 °C schien die stabilisierende Wirkung des DMSP-Cl den Prozeß der thermischen Denaturierung nicht vollständig auszugleichen. DMSP-Cl wirkte demnach tatsächlich bei niedrigen Temperaturen (0 °C und 5 °C) stabilisierender als bei 30 °C . Ein destabilisierender Einfluß hoher DMSP-Konzentrationen, wie von NISHIGUCHI und SOMERO (1992) beschrieben, konnte nicht gefunden werden.

4.2.4 Einfluß von DMSP, Prolin und Saccharose bei der Adaptation

Eine enzymstabilisierende Wirkung der untersuchten organischen Osmolyte bei niedrigen Temperaturen auf MDH und G6P-DH aus *A. arcta* konnte grundsätzlich bestätigt werden.

Die Intensität sowie die Art und Weise der Schutzwirkung variierten allerdings in Abhängigkeit sowohl von der jeweiligen Substanz als auch von der Natur des untersuchten Enzyms selbst. Der Schutzeffekt der Substanzen drückte sich hierbei in der Veränderung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und / oder des K_m -Wertes aus.

Für die Wirkung des DMSP auf die MDH konnte bei niedrigen Temperaturen zwar keine stabilisierende Wirkung direkt nachgewiesen werden. Allerdings sprachen verschiedene Überlegungen dennoch auch hier für eine Schutzwirkung des DMSP. Zum einen wurde die MDH im Bereich ihrer optimalen Aktivität bei 30 °C durch die Zugabe von DMSP zunehmend destabilisiert, während bei -2 °C keine Hemmung auftrat. Zum anderen hatte das eingesetzte DMSP, im Gegensatz zum ebenfalls untersuchten NaCl, trotz seines Chloridanteils einen nur unwesentlichen Einfluß auf die kinetischen Parameter der salzempfindlichen MDH. Im Umkehrschluß sprechen diese beiden Feststellungen für die Annahme einer Schutzwirkung des DMSP auf die MDH.

Für die G6P-DH führte die Zugabe von DMSP bei beiden Untersuchungstemperaturen im gesamten Konzentrationsbereich zu einer leichten Steigerung der Enzymaktivität, darüber hinaus konnte eine Erhöhung der E-S-Äffinität bei -2 °C festgestellt werden, so daß die Schutzwirkung des DMSP für dieses Enzym eindeutig zu belegen war.

DMSP ist als kompatible Substanz einzustufen. Dem steht auch nicht entgegen, daß bei höheren Temperaturen eine MDH-Hemmung auftrat, da diese auf das begleitende Anion zurückzuführen ist.

Eine Schutzwirkung des im Gegensatz zum DMSP bereits als kompatible Substanz anerkannten Prolins konnte im wesentlichen aus der Verbesserung der E-S-Affinität, außerdem aber auch, zumindest für die G6P-DH, aus einer Erhöhung der Enzymaktivität bei -2 °C abgeleitet werden.

Saccharose entfaltet eine eindeutige Schutzwirkung gegenüber der G6P-DH. So steigert sie sowohl die Enzymaktivität als auch die E-S-Affinität bei -2 °C. Hingegen wurde die Kinetik der MDH bei -2 °C nur unwesentlich beeinflusst, wobei jedoch mit steigender Konzentration die Enzymaktivität zunehmend gehemmt wurde. Diese Hemmung trat zwar nur unter substratgesättigten Versuchsbedingungen auf, hieraus alleine läßt sich aber eine stabilisierende oder gar stimulierende Wirkung unter Habitatsbedingungen nicht sicher ableiten, so daß eine Schutzwirkung der Saccharose für die MDH zumindest zweifelhaft erscheint.

Ein Gefrierschutz ließ sich sowohl für die kompatiblen Substanzen als auch für die ebenfalls untersuchten Salze am "Modellenzym" LDH nachweisen. Die kompatiblen Substanzen wirkten hierbei schon in niedrigeren Konzentrationen stabilisierender als die anorganischen Salze. Insgesamt aber ist die Rolle des DMSP hervorzuheben, das zu einer bemerkenswerten, von der Literatur bisher so noch nicht beschriebenen, Stabilisierung bis hin zur Stimulierung des Enzyms beitrug.

5. Schlußbetrachtung

Die grüne Makroalge *A. arcta* ist als Bewohnerin der polaren Gezeitenzonen zum Teil extrem niedrigen Temperaturen bis hin zum Einfrieren ausgesetzt. Sie ist an diese Gegebenheiten gut angepaßt.

Hauptziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob bzw. inwieweit eine Adaptation den Eigenschaften von Schlüsselenzymen und / oder aber der Synthese bestimmter Schutzstoffe zuzurechnen ist. Als Schlüsselenzym sollte zunächst die PK untersucht werden, da diese in der Literatur als besonders kältelabil beschrieben wird. Bei Kälte erwies sich die Aktivität der PK im Verhältnis zur Biomasse als gering, um meßbare Ergebnisse zu erzielen. Aufgrund mangelnder Biomasse mußte auf die nähere Untersuchung dieses Enzyms verzichtet werden, so daß sich die Arbeit im wesentlichen mit den Enzymen MDH und G6P-DH auseinandersetzte. Beide Enzyme zeigten bei Kälte stark verminderte Aktivität. Bei -2 °C erreichte die MDH des antarktischen Isolates 10%, die des arktischen etwa 20% ihrer optimalen Aktivität bei 30 °C. Im Vergleich zur MDH zeigte die G6P-DH bei -2 °C mit 15% (arktisches Isolat) und 20% (antarktisches Isolat) der Optimumsaktivität (30 °C) ähnliche Resultate.

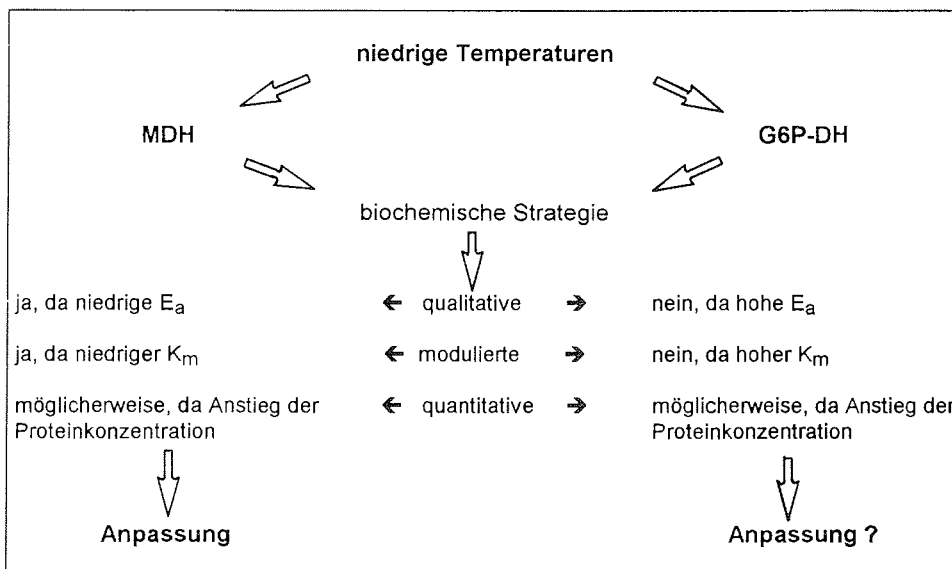


Abb. 23: Schematische Darstellung zum Einfluß niedriger Temperaturen auf die Enzyme MDH und G6P-DH sowie deren biochemische Anpassungsstrategien. E_a = Aktivierungsenergie, K_m = Michaelis-Konstante.

Die Aktivitätsoptima der MDH und G6P-DH bei 30 °C wurden *in vitro* unter Substratsättigung ermittelt, wogegen *in vivo* eher Substratlimitierung herrscht. Eine

Adaptation von *A. arcta* an das natürliche kalte Habitat ist somit durch die *in vitro* festgestellten Optima nur unzureichend zu charakterisieren. Der Nachweis einer möglichen biochemischen Anpassung ist daher nur unter Einbeziehung der kinetischen Parameter (K_m , V_{max} , E_a) möglich. Die MDH benötigte nach Akklimatisation an niedrige Temperaturen eine verminderte Aktivierungsenergie (Abb. 23). Darüber hinaus belegt der gesenkte K_m -Wert eine erleichterte Substratbindungsfähigkeit, die bei nicht-gesättigten Substratbedingungen annähernd zu einem Ausgleich der Katalysegeschwindigkeit führt ($Q_{10} < 1$). Die G6P-DH dagegen zeigte keine der genannten Reaktionen. Für sie kam als Adaptationsmechanismus lediglich eine quantitative Erhöhung der Enzymkonzentration in Frage, was auch für die MDH zutreffen könnte. Ein Hinweis für das Vorliegen einer solchen Strategie könnte in der Steigerung des Gesamtproteingehaltes der Algen mit zunehmender Abkühlung gesehen werden (Abb. 23). Da für *A. arcta* ein Überleben ohne entsprechend leistungsfähige G6P-DH kaum möglich wäre, ist es wahrscheinlich, daß weitere Mechanismen zur Adaptation an das polare Habitat beitragen. In diesem Zusammenhang wird häufig die Synthese bestimmter Schutzstoffe diskutiert. Als solche kommen die von *A. arcta* bei Salzstreß akkumulierten organischen Osmolyte Prolin, Saccharose und DMSP in Betracht. Auch bei Kältestreß wird Prolin quantitativ am stärksten synthetisiert und die Konzentration nimmt mit sinkenden Temperaturen zu. Der DMSP-Gehalt des arktischen Isolates nahm ebenfalls mit abnehmenden Temperaturen zu, während der des antarktischen bei -2 °C geringer war als bei 10 °C . Saccharose war die in geringsten Mengen produzierte Verbindung und blieb unter Kälteeinwirkung bei beiden Isolaten konstant.

Alle drei Substanzen bewirkten bei der G6P-DH eine Senkung des K_m -wertes sowie eine leichte Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} im Vergleich zur Kontrolle (-2 °C , vgl. Abb. 24). Dies kann bei nicht-sättigenden Substratbedingungen den entscheidenden Ausgleich in der Katalysegeschwindigkeit schaffen. DMSP, Prolin und Saccharose sind daher als Schutzstoffe für die G6P-DH zu bezeichnen. Die Wirkung auf die MDH war dagegen uneinheitlich (Abb. 24). Während DMSP und Prolin zu keiner Beeinträchtigung der Enzymaktivität führten, wurde diese mit steigender Saccharosekonzentration inhibiert. Die Hemmung war jedoch bei physiologisch vermuteter Saccharosekonzentration (50 bis 200 mOsmol / kg, vgl. Tab. 5) relativ gering und nahm erst oberhalb einer Konzentration von 200 mOsmol / kg signifikant zu. Die Beeinträchtigung trat nur unter Substratsättigung auf, die *in vivo* vermutlich nicht vorherrscht. *In vivo* kann daher nicht von einer Hemmung der MDH-Aktivität durch Saccharose ausgegangen werden. Die E-S-Affinität der MDH wurde durch Prolin erhöht, durch DMSP und Saccharose dagegen nur unwesentlich beeinflusst. Als Schutzstoff für

Schlußbetrachtung

die MDH ist somit nur Prolin zu klassifizieren. Allerdings ist auch eine Schutzwirkung des DMSP für die MDH wahrscheinlich, da DMSP ohne Chloridanteil *in vivo* zu erheblich besseren Ergebnissen führen dürfte. Lediglich für Saccharose ließ sich keine Schutzwirkung feststellen, wenngleich sie zumindest bei nicht-gesättigten Substratbedingungen keine schädigende Wirkung entfaltet (Abb. 24). Aus diesen Feststellungen läßt sich ableiten, daß die These, wonach die Konzentration von Kälteschutzsubstanzen mit sinkenden Temperaturen steigt, nicht grundsätzlich zutrifft. So zeigt Saccharose bei gleichbleibender Konzentration einen deutlichen Schutz der G6P-DH.

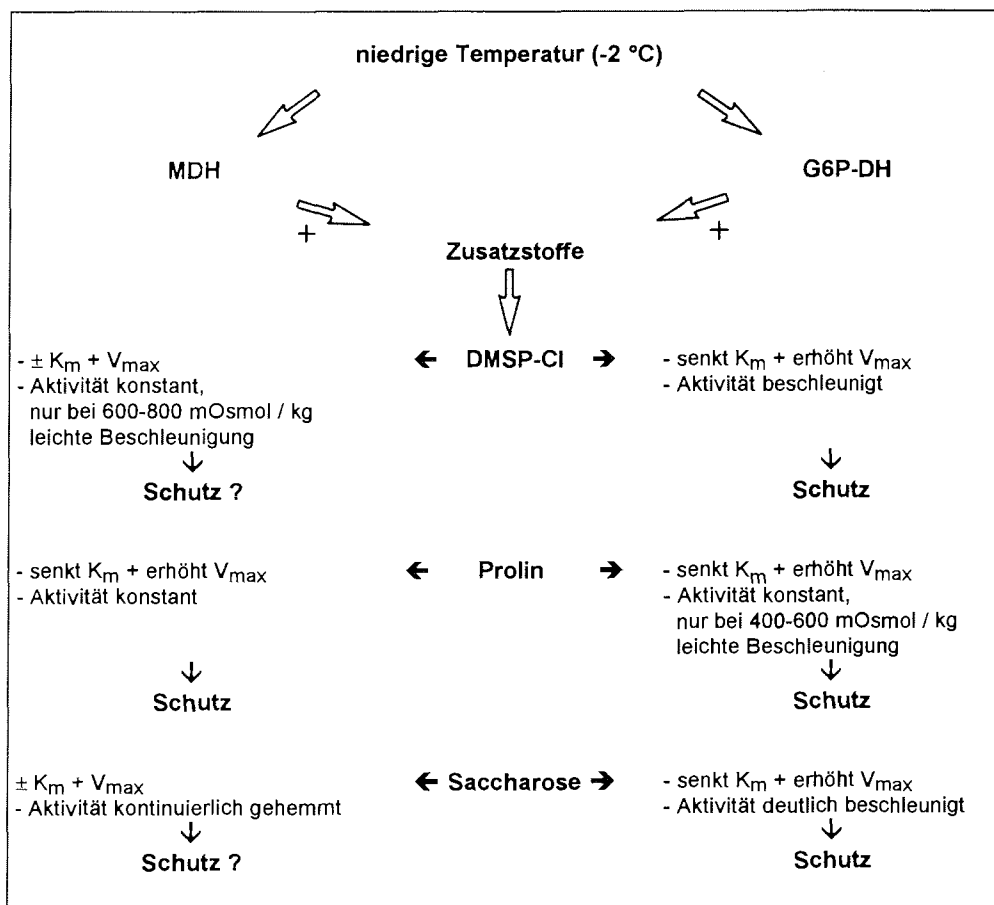


Abb. 24: Schematische Darstellung der Wirkung von DMSP, Prolin und Saccharose auf die Enzyme MDH und G6P-DH *in vitro*. (± geringfügige Änderung; K_m und V_{max} jeweils mit 400 mOsmol / kg des jeweiligen Zusatzstoffes bestimmt)

Neben einem Schutz vor niedrigen Temperaturen konnte anhand der LDH bei physiologisch relevanter Konzentration der Substanzen auch eine kryoprotektive Wirkung belegt werden. Hinsichtlich des Schutzgrades nahm DMSP dabei eine herausragende Stellung ein. DMSP stabilisierte die LDH nicht nur, sondern führte in höheren Konzentrationen sogar zu einer Stimulierung ihrer Aktivität.

Prolin, Saccharose und DMSP sind somit nicht nur als Osmolyte bei Salzstreß, sondern auch als Schutzstoffe gegen die temperaturinduzierten Streßformen Kälte und Gefrieren zu bezeichnen. Dieser Schutz wird in der Aufrechterhaltung einer funktionsfähigen Hydrathülle durch kompatible Substanzen gesehen. Es wird häufig vermutet, daß diese Wirkung auf einheitlichen Prinzipien beruht. Das zunehmend favorisierte "Ausschluß-Modell" sieht als einzige Voraussetzung eines Enzymschutzes den Ausschluß aus der Hydrathülle des jeweiligen Enzyms. In diese Vorstellung ist jedoch das Resultat, daß Saccharose zwar die G6P-DH, nicht aber die MDH schützt, nicht ohne weiteres einzupassen. Die unterschiedliche Wirkung der Saccharose war unter Annahme des "Ausschluß-Modells" zwar unerwartet, kann aber auf spezifische Interaktionen mit der MDH aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit des Enzyms zurückgeführt werden. Solche Interaktionen führen zwar partiell zu einer Bindung zwischen Protein und Substanz, machen aber einen vorwiegenden Ausschluß aus der Hydrathülle nicht völlig unmöglich. Dennoch können diese Bindungen zu einer teilweisen Auffaltung des Proteins führen und dadurch die Schutzwirkung maßgeblich reduzieren oder gar aufheben. Somit ist das Ausschlußverhalten in erheblichem Maße von der Natur des zu schützenden Proteins abhängig. Dennoch kann das "Ausschluß-Modell" als Basis einer Erklärung für die Schutzwirkung von kompatiblen Substanzen gelten. Im Einzelfall könnte der Rückgriff auf andere Modelle und / oder Einbeziehung anderer Gesichtspunkte, wie z.B. der Oberflächenbeschaffenheit (Hydrophobizität, Ladungsverteilung, Hydratation) die Erklärung vervollständigen. Obwohl kein allgemeingültiges Prinzip der Schutzwirkung zu belegen war, bleibt festzuhalten, daß alle drei Substanzen selbst in hohen Konzentrationen zu keiner Beeinträchtigung der Enzyme führten und somit als kompatible Substanzen klassifiziert werden können.

Die Feststellung nun, daß nicht jede dieser Substanzen jedes Enzym in gleichem Maße schützt, war nicht überraschend. Ein generell wirksamer Schutz dieser Substanzen darf hinsichtlich der Komplexität des Stoffwechsels *in vivo* bezweifelt werden. Vielmehr müssen auch mögliche synergetische Effekte, die einen Einfluß auf die Schutzwirkung und / oder Ausschlußverhalten haben können, stärkere Beachtung finden. Solche Effekte können sich zum einen aus dem Zusammenwirken verschiedener Substanzen bei gleicher Streßsituation ergeben, zum anderen können sie auch durch das mehr oder weniger zeitgleiche Wirken

Schlußbetrachtung

unterschiedlicher Streßfaktoren entstehen. Außerdem wäre auch eine Kombination der beider genannten Effekte denkbar. Solche *in vivo* auftretenden Effekte lassen sich *in vitro* nur unzureichend untersuchen und können daher nur vermutet werden. Somit scheint für die Schutzwirkung einer kompatiblen Substanz nicht die einheitliche Wirkungsweise der korrekte Maßstab zu sein, sondern vielmehr die Frage, ob ein Organismus in der Lage ist, für eine spezielle Streßsituation auch den entsprechenden Schutz parat zu haben. Wenn auch die unterschiedlichen Streßfaktoren (Salz, Austrocknung, Gefrieren) ähnliche Auswirkungen auf den Organismus haben, scheint die allgemeine Wirksamkeit einer kompatiblen Substanz weniger im Vordergrund zu stehen als deren Fähigkeit, einer speziellen Situation individuell zu begegnen. Einzige gemeinsame Anforderung an solche Schutzstoffe wäre demnach, daß sie in Situationen, in denen sie nicht schützen, den Metabolismus zumindest nicht belasten dürfen.

6. Literaturverzeichnis

- ACKMAN; R.G., TOCHER C.S., und McLACHLAN J. (1966). Occurrence of dimethyl- β -propiothetin in marine phytoplankton. J.Fish.Res.Board Can. 23: 357-364.
- ADUCCI P., FEDERICO R., CARPINELLI G. und PODO F. (1982). Temperature dependence of intracellular pH in higher plant cells. Planta 156: 579-582.
- AEBI H., BRODBECK U., KOHLER H., LAUBER K., PFLEIDERER G., VON WARTBURG J.P. und WYSS S. (1982). Praktische Biochemie. Karger, Basel.
- AKAHANE T., TSUCHIYA T. und MATSUMOTO J.J. (1981). Freeze denaturation of carp myosin and its prevention by sodium glutamate. Cryobiol. 18: 426-435.
- ALETSEE L. und JAHNKE J. (1992). Growth and productivity of the psychrophilic marine diatoms *Thalassiosira antarctica* Comber and *Nitzschia frigida* Grunow in batch cultures at temperatures below the freezing point of sea water. Polar Biol. 11: 643-647.
- ANDREAE M.O. (1990). Ocean-atmosphere interactions in the global biogeochemical sulfur cycle. Mar. Chem. 30: 1-29.
- ANDREAE M.O. und RAEMDONCK H. (1983). Dimethylsulfide in the surface ocean and the marine atmosphere: a global view. Science 221: 744-747.
- ARAKAWA T., CARPENTER J.F., KITA Y.A. und CROWE J.H. (1990). The basis for certain cryoprotectants: a hypothesis. Cryobiol. 27: 401-415.
- ARAKAWA T. und TIMASHEFF S.N. (1982). Preferential interaction of proteins with salts in concentrated solution. Biochemistry 21: 6545-6552.
- ARAKAWA T. und TIMASHEFF S.N. (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. Arch.Biochem.Biophys. 224: 169-177.
- ARAKAWA T. und TIMASHEFF S.N. (1984). Mechanisms of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. Biochemistry 23: 5912-5923.
- ARAKAWA T. und TIMASHEFF S.N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. Biophys.J. 47: 411-414.
- ARCTIC STATION. Research Station of Natural History in Greenland. Informationsbroschüre über die arktische Station Godhavn. Botanical Central Institute, Copenhagen University, Denmark.
- ASHWOOD-SMITH M.J. und WARBY C. (1972). Protective effect of low and high molecular weight compounds on the stability of catalase subjected to freezing and thawing. Cryobiol. 9: 137-140.
- BACK J.F., OAKENFULL D. und SMITH M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry 18: 5191-5196.

Literatur

- BARNARD W.R., ANDREAE M.O. UND IVERSON R.I. (1984). Dimethylsulfide and *Phaeocystis pouchetii* in the southeastern Bering Sea. *Cont.Shelf Res.* 3: 103-113.
- BAROSS J.A. und MORITA R.Y. (1978). Microbial life at low temperatures: ecological aspects. In: KUSHNER D.J. (Hrsg.): *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press, New York : 9-71.
- BATES S.S., WALDREN R.P. und TEARE I.D. (1973). Rapid determination of free prolin for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- BELVISO S., KIM S.-K., RASSOULZADEGAN R., KRAJKA B., NGUYEN B.C., MIHALOPOULOS N. und BUAT-MENARD P. (1990). Production of dimethylsulfonium propionate (DMSP) and dimethylsulfide (DMS) by a microbial food web. *Limnol.Oceanogr.* 35: 1810-1821.
- BERGMEYER H.U. (1983). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- BERRY J.A. und BJÖRKMAN O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 491-543.
- BIRD C.J. und McLACHLAN J. (1974). Cold-hardiness of zygotes and embryos of *Fucus* (Phaeophyceae, Fucales). *Phycologia* 13: 215-225.
- BISCHOFF B., KARSTEN U., KÜCK K., XIA B. und WIENCKE C. (1994). Preliminary assessment of the β -dimethylsulfoniopropionate (DMSP) content of macroalgae from the tropical Island of Hainan (People`s Republic of China). *Aust.J.Mar. Freshwater Res.* 45: 1329-1336.
- BISCHOFF B. und WIENCKE C. (1993). Temperature requirements for growth and survival of macroalgae from Disko-Island (Greenland). *Helgol.Wiss.Meeresunters.* 47: 167-191.
- BISCHOFF B. und WIENCKE C. (1995). Temperature ecotypes and biogeography of *Acrosiphoniales* (Chlorophyta) with Arctic-Antarctic disjunct and Arctic / cold-temperate distributions. *Br.Phycol.J.* 30: 19-27.
- BISSON M.A. und KIRST G.O. (1995). Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften* 82: 461-471.
- BOROWITZKA L.J. (1985). Glycerol and other carbohydrate osmotic effectors. In: GILLES R. und GILLES-BAILLIEN M. (Hrsg.): *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation*. Springer Verlag, Berlin: 437-453.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteinutilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- BRANDTS J.F., FU J. und NORDIN J.H. (1970). The low temperature denaturation of chymotrypsinogen in aqueous solution and in frozen aqueous solution. In: WOLSTENHOLME G.E.W. und O`CONNOR M. (Hrsg.): *The frozen cell*. Churchill, London: 189-212.

- BROUILLET L. und SIMON J. (1980). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: thermal properties of NAD malate dehydrogenase of two species of *Aster* (Asteraceae) and their hybrid adapted to contrasting habitats. *Can.J.Bot.* 58: 1474-1481.
- BROWN A.D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Rev.* 40: 803-846.
- BROWN L.M. und HELLEBUST J.A. (1978). Sorbitol and prolin as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Can.J.Bot.* 56: 676-679.
- BROWN A.D. und SIMPSON J.R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeast: the role of intracellular polyols. *J.Gen.Microbiol.* 72: 589-591.
- BULL H.B. und BREESE K. (1974). Surface tension of amino acid solutions: a hydrophobicity scale of the amino acid residues. *Arch.Biochem.Biophys.* 161: 665-670.
- BURKE J.J., MAHAN J.R. und HATFIELD J.L. (1988). Cop-specific thermal kinetic windows in relation to wheat and cotton biomass production. *Agron.J.* 80: 553-556.
- CANTONI G.L. und ANDERSON D.G. (1956). Enzymatic cleavage of dimethylpropiothetin by *Polysiphonia lanosa*. *J.Biol.Chem.* 222: 171-177.
- CARPENTER J.F., HAND S.C., CROWE L.M. und CROWE J.H. (1986). Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Arch.Biochem.Biophys.* 250: 505-512.
- CARPENTER J.F. und CROWE J.H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiol.* 25: 244-255.
- CHABOT B.F. (1979). Metabolic and enzymatic adaptations to low temperature. In: UNDERWOOD L.F., TIESZEN L.L., CALLAHAN A.B. und FOLK G.E. (Hrsg.): *Comparative mechanisms of cold adaptation*. Academic Press, NY: 283-301.
- CHALLENGER F. (1959). Aspects of the organic chemistry of sulphur. Butterworths Scientific Publications, London: 33-37.
- CHARLSON R.J., LOVELOCK J.E., ANDREAE M.O. und WARREN S. G. (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo, and climate. *Nature* 326: 655-661.
- CHIRIFE J., FAVETTO G. und FONTAN C.F. (1984). Microbial growth at reduced water activities: some physicochemical properties of compatible solutes. *J.Appl.Bacteriol.* 56: 259-268.
- CHILSON O.P., COSTELLO L.A. und KAPLAN N.O. (1965). Effects of freezing on enzymes. *Fed.Proc.* 24: S55-S65.
- CHU T.M., ASPINALL D. und PALEG L.G. (1974). Stress metabolism. Part 6. Temperature stress and the accumulation of prolin in barley and radish. *Aust.J.Plant Physiol.* 1: 87-97.
- CLAYTON M.N. (1994). Evolution of the antarctic marine benthic algal flora. *J.Phycol.* 30: 897-904.

- CLEGG J.S., SEITZ P., SEITZ W. und HAZLEWOOD C.F. (1982). Cellular response to extreme water loss: the water replacement hypothesis. *Cryobiol.* 19: 306-316.
- CROWE J.H., CARPENTER J.F., CROWE L.M. und ANCHORDOGUY T.J. (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors ? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiol.* 27: 219-231.
- DACEY J.W.H. und WAKEHAM S.G. (1986). Oceanic dimethylsulfide: production during zooplankton grazing on phytoplankton. *Science* 233: 1313-1316.
- DAVIDSON D. und SIMON J.-P. (1981). Thermal adaptation and acclimation of ecotypic populations of *Spirodela poyrhiza* (L.) Schleid. (Lemnaceae): thermostability and apparent activation energy of NAD malate dehydrogenase. *Can.J.Bot.* 59: 1061-1068.
- DAVISON I.R., DUDGEON S.R. und RUAN H.-M. (1989). Effect of freezing on seaweed photosynthesis. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 58: 123-131.
- DAVISON I.R. und DAVISON J.O. (1987). The effect of growth temperature on enzyme activities in the brown alga *Laminaria saccharina*. *Br.Phycol.J.* 22: 77-87.
- DESCOLAS-GROS C. und DE BILLY G. (1987). Temperature adaptation of RuBP carboxylase: kinetic properties in marine Antarctic diatoms. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 108: 147-158.
- DICKSON D.M., WYN JONES R.G. und DAVENPORT J. (1980). Steady state osmotic adaptation in *Ulva lactuca*. *Planta* 150: 158-165.
- DICKSON D.M.J., JONES R.G.W. und DAVENPORT J. (1982). Osmotic adaptation in *Ulva lactuca* under fluctuating salinity regime. *Planta* 155: 409-415.
- DICKSON D.M. und KIRST G.O. (1986). The role of β -dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*. *Planta* 167: 536-543.
- DICKSON D.M.J. und KIRST G.O. (1987). Osmotic adjustment in eukaryotic alga: the role of inorganic ions, quaternary ammonium, tertiary sulphonium and carbohydrate solutes. I. Diatoms and a rhodophyte. *New Phytol.* 106: 657-666.
- DIXON M., WEBB E.C., THORNE C.J.R. und TIPTON K.F. (1979). *Enzymes*. London: Longmann 3rd ed.
- DRING M.J. und BROWN F.A. (1982). Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 8: 301-308.
- DUDGEON S.R., DAVISON I.R. und VADAS R.L. (1989,). Effect of freezing on photosynthesis of intertidal macroalgae: relative tolerance of *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus* (Rhodophyta). *Mar.Biol.* 101: 107-114.
- DUDGEON S.R., DAVISON I.R. und VADAS R.L. (1990). Freezing tolerance in the intertidal red algae *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*: relative importance of acclimation and adaptation. *Mar.Biol.* 106: 427-436.

- DUNTON K.H. (1992). Arctic biogeography: the paradox of the marine benthic fauna and flora. *Trends Ecol.Evol.* 7: 183-189.
- EDWARDS D.M., REED R.H., CHUDEK J.A., FOSTER R. und STEWART W.D.P. (1987). Organic solute accumulation in osmotically-stressed *Enteromorpha intestinalis*. *Mar.Biol.* 95: 583-592.
- EDWARDS D.M., REED R.H. und STEWART W.D.P. (1988). Osmoacclimation in *Enteromorpha intestinalis*: long-term effects of osmotic stress on organic solute accumulation. *Mar.Biol.* 98: 467-476.
- FALKOWSKI P.G. (1977). The adenylate energy charge in marine phytoplankton: the effect of temperature on the physiological state of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve.*J.Exp.Mar.Biol. Ecol.* 27: 37-45.
- FELLER G., NARINX E., ARPIGNY J.L., ZEKHNINI Z., SWINGS J. und GERDAY C. (1994). Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 41: 477-479.
- FISHBEIN W.N. und WINKERT J.W. (1979). Parameter of freezing damage to enzymes. In: FENNEMA O. (Hrsg.): *Proteins at low temperature*. Amer.Chem.Soc. Washington, D.C.: 55-82.
- FOGELQVIST E. (1991). Dimethylsulfide (DMS) in the Weddell Sea surface and bottom water. *Mar.Chem.* 35: 169-177.
- FRANKS F. (1985). *Biophysics and biochemistry at low temperatures*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- FRANKS F. (1986). Molekulare Grundlagen der Kälteresistenz von Lebewesen. *Chemie in unserer Zeit.* 20: 146-155.
- GALINSKI E.A. (1992). *Kompatible Solute aus Bakterien - Gewinnung, Anwendung, Struktur und Funktion*. Habilitationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- GALINSKI E.A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.
- GALINSKI E.A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. In: POOLE R.K. (Hrsg.): *Microbial Physiology*. Academic Press, London 37, 273-328.
- GEKKO K. und TIMASHEFF S.N. (1981). Mechanism of stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20: 4667-4676.
- GEKKO K. und MORIKAWA T. (1981). Preferential hydration of bovin serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures. *J.Biochem.* 90: 39-50.
- GESSNER F. (1970). Temperature: plants. In: KINNE O. (Hrsg.). *Marine Ecology*. 1 Wiley, New York: 363-406.
- GIMMLER H., KAADEN R., KIRCHNER U. und WEYAND A. (1984). The chloride sensitivity of *Dunaliella parva* enzymes. *Z.Pflanzenphysiol.* 114: 131-150.

- GINZBURG M. (1987). *Dunaliella*: a green algae adapted to salt. *Adv.Bot.Res.* 14: 95-193, Academic Press, New York.
- GRAHAM D. und PATTERSON B.D. (1982). Responses of plants of low, non-freezing temperatures: proteins metabolism, and acclimation. *Ann.Rev.PlantPhysiol.* 33: 347-372.
- GRÖNE T. (1991). Untersuchungen zum DMSP-Metabolismus von *Tetraselmis subcordiformis* (Prasinophyceae). Dissertation, Universität Bremen.
- GRÖNE T. und KIRST G.O. (1991). Aspects of dimethylsulfoniopropionate effects on enzymes isolated from the marine phytoplankter *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). *J.Plant Physiol.* 138: 85-91.
- GRÖNE T. und KIRST G.O. (1992). The effect of nitrogen deficiency, methionine and inhibitors of methionine metabolism on the DMSP content of *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). *Mar.Biol.* 112: 497-503.
- GRÖNE T. (1995). Biogenic production and consumption of dimethylsulfid (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the marine epipelagic zone: a review. *J.Mar.Systems* 6: 191-209.
- HANSON A.D., RIVOAL J., PAQUET L. und GAGE D.A. (1994). Biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia biflora* (L.) DC. *Plant Physiol.* 105: 1-8.
- HANES C.S. (1932). Studies on plant amylase. I. The effects of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem.J.* 26: 1406-1421.
- HAZEL J.R. und PROSNER C.L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol.Rev.* 54: 620-677.
- HEBER U. ; SHMITT J.M.; KRAUSE G. H.; KLOSSON J. und SANTARIUS K.A. (1981) Freezing damage to thylakoid membranes *in vitro* and *in vivo*. In: MORRIS G.J. and CLARKE A. (Hrsg.): *Effects of Low Temperatures in Biological Membranes*. Academic Press, London, New York: 263-283.
- HEBER U. und SANTARIUS K.A. (1973). Cell death by cold and heat and resistance to extreme temperature. Mechanisms of hardening and dehardening. In: PRECHT H., CHRISTOPHERSEN J., HENSEL H.und LARCHER W. (Hrsg.): *Temperature and Life*. Springer Verlag, Berlin: 253-267.
- HEBER U. und SANTARIUS K.A. (1976). Water stress during freezing. In: LANGE O.L., KAPPEN L. und SCHULZE E.-D. (Hrsg.): *Water and Plant Life*. Springer Verlag, Berlin: 232-267.
- HEMPEL G. (1987). Die Polarmeere - ein biologischer Vergleich. *Polarforschung* 57: 173-189.
- HERSHKOVITZ N., OREN A. und COHEN Y. (1991). Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matric water stress. *Appl.Environ.Microbiol.* 57: 645-648.

- HINCHA D.K., HEBER U. und SCHMITT J.M. (1990). Proteins from frosthardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage *in vitro*. *Planta* 180: 416-419.
- HOCHACHKA P.W. und SOMERO G.N. (1968). The adaptation of enzymes to temperature. *Comp.Biochem.Physiol.* 27: 659-668.
- HOCHACHKA P.W. und SOMERO G.N. (1980). Strategien biochemischer Anpassung. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- HOCHACHKA P.W. und SOMERO G.N. (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press.
- INNISS W. E. und INGRAHAM J.L. (1978). Microbial life at low temperatures: mechanisms and molecular aspects. In: KUSHNER D.J. (Hrsg.): *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press, New York : 73-99.
- ISHIDA Y. (1968). Physiological studies on the evolution of dimethylsulfide. *Mem.Coll.Agric. Kyoto Univ.* 94: 47-82.
- IVERSON R.L., NEARHOFF F.L. und ANDREAE M.O. (1989). Production of dimethylsulfonium propionate and dimethylsulfide by phytoplankton in estuarine and coastal water. *Limnol.Oceanogr.* 34: 53-67.
- JACKSON A. E. und SEPPELT R.D. (1995). The accumulation of prolin in *Prasiola crispa* during winter in Antarctica. *Physiol.Plant.* 94: 25-30.
- KARSTEN U. und KIRST G.O. (1989a). Intracellular solutes, photosynthesis and respiration of the green alga *Blidingia minima* in response to salinity stress. *Bot.Acta* 102: 123-128.
- KARSTEN U. und KIRST G.O. (1989b). Incomplete turgor pressure regulation in the "terrestrial" red alga, *Bostrychia scorpioides* (Huds.) Mont. *Plant Science* 61: 29-36.
- KARSTEN U., WIENCKE C. und KIRST G.O. (1990a). The β -dimethylsulphonio-propionate (DMSP) content of macroalgae from Antarctica and Southern Chile. *Bot.Mar.* 32: 143-146.
- KARSTEN U., WIENCKE C. und KIRST G.O. (1990b). The effect of light intensity and daylength on the β -dimethylsulphonio-propionate (DMSP) content of green macroalgae from Antarctica. *Plant Cell Env.* 13: 989-993.
- KARSTEN U. (1991). Ökophysiologische Untersuchungen zur Salinitäts- und Temperaturtoleranz antarktischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung des β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)-Stoffwechsels. *Ber.Polarforsch.* 79.
- KARSTEN U., WIENCKE C. und KIRST G.O. (1991a). Growth pattern and β -dimethylsulphonio-propionate (DMSP) content of green macroalgae at different irradiances. *Mar.Biol.* 108: 151-155.
- KARSTEN U., WIENCKE C. und KIRST G.O. (1991b). The effect of salinity change upon the physiology of eu littoral green macroalgae from Antarctica and southern Chile. II. Intracellular inorganic ions and organic compounds. *J.Exp.Bot.* 42: 1533-1539.

- KARSTEN U., WIENCKE C. und KIRST G.O. (1992). Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) accumulation in green macroalgae from polar to temperate regions: interactive effects of lights versus salinity and light versus temperature. *Polar Biol.* 12: 603-607.
- KELLER M.D., BELLOWS W.K. und GUILLARD R.R.L. (1989). Dimethylsulfide production and marine phytoplankton: an additional impact of unusual blooms. In : COOPER E.M., BRICELJ V.M. und CARPENTER E.J. (Hrsg.): *Novel Phytoplankton Blooms*. Coastal and Estuarine Studies. 35: 102-115.
- KETCHUM R.E.B., WARREN R.S., KLIMA L.J., GUTIERREZ F.L. und NABORS M.W. (1991). The mechanism and regulation of prolin accumulation in suspension cell cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. *J.Plant Physiol.* 137: 368-374.
- KIENE R.P. und SERVICE S.K. (1991). Decomposition of dissolved DMSP and DMS in estuarine waters: dependence on temperature and substrate concentration. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 76: 1-11.
- KIENE R.P. und SERVICE S.K. (1991). Decomposition of dissolved DMSP and DMS in estuarine waters: dependence on temperature and substrate concentration. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 76: 1-11.
- KIRST G.O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 41: 21-53.
- KIRST G.O. (1994). Influence of salinity on algal ecosystems. In: WIESSNER W., SCHNEPF E. und STARR R.C. (Hrsg.): *Algae, environment and human affairs*. Biopress Limited, Bristol, England: 123-142.
- KIRST G.O. und WIENCKE C. (1995). Ecophysiology of polar algae. *J.Phycol.* 31: 181-199.
- KORNMANN P. und SAHLING P.H. (1983). *Meeresalgen von Helgoland*. *Helgol.Wiss. Meeresunters.* 29: 28-35.
- KOSTER K.L. und LEOPOLD A. L. (1988). Sugar and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88: 829-832
- KOTTMEIER S.T. und SULLIVAN C.W. (1988). Sea ice microbial communities (SIMCO). 9. Effects of temperature and salinity on rates of metabolism and growth of autotrophs and heterotrophs. *Polar Biol.* 8: 293-304.
- KRISTIANSEN S. (1983). The temperature optimum of nitrate reductase assay for marine phytoplankton. *Limnol.Oceanogr.* 28: 776-780.
- KÜPPERS U. und WEIDNER M. (1980). Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperborea*. *Planta* 148: 222-230.
- LARHER F., HAMELIN J. und STEWART G.R. (1977). L'acide dimethylsulfonium-3 propanoïque de *Spartina anglica*. *Phytochem.* 16: 2019-2020.
- LAPOINTE L., DUBUC M., VAIRINHOS F. und SIMON J.-P. (1989). Thermal effects on kinetic properties of NAD⁺-malate dehydrogenase in two ecotypes of the C₄ grass

- species *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. from sites of contrasting climates. *Funct.Ecol.* 3: 709-717.
- LASCH J. (1987). *Enzymkinetik*. Springer-Verlag Berlin.
- LAURIE S. und STEWART G.R. (1990). The effects of compatible solutes on the heat stability of glutamine synthetase from chickpeas grown under different nitrogen and temperature regime. *J.Exp.Bot.* 41: 1415-1422.
- LEE J.C., GEKKO N. und TIMASHEFF S.N. (1979). Measurement of preferential solvent interaction by densimetric techniques. In: HIRS C.H.W. und TIMASHEFF S. N. (Hrsg.): *Methods in enzymology*. Academic Press N.Y., 61: 26-48.
- LEE J.C. und TIMASHEFF S.N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. *J.Biol.Chem.* 256: 7193-7201.
- LEHNINGER A.L. (1975). *Biochemistry*. 2nd ed. Worth, New York
- LI W.K.W., SMITH J.C. und PLATT T. (1984). Temperature response of photosynthetic capacity and carboxylase activity in Arctic marine phytoplankton. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 17: 237-243.
- LIBBERT K. und GALINSKI E.A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 37: 61-65.
- LOBBAN C.S.; HARRISON P.J. und DUNCAN M.J. (1985). *The physiological ecology of seaweeds*. Cambridge University Press, Cambridge.
- LOVELOCK J.E. (1988). *The ages of Gaia*. Oxford University Press, Oxford.
- LOW P.S. (1985). Molecular Basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. In: GILLES R. und GILLES-BAILLIEN M. (Hrsg.). *Transport processes, iono- and osmoregulation*. Springer Verlag, Berlin: 470-477.
- LÜNING K. (1985). *Meeresbotanik. Verbreitung, Ökophysiologie und Nutzung der marinen Makroalgen*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- MacDONALD J.A., MONTGOMERY J.C. und WELLS R.M.G. (1987). Comparative physiology of antarctic fishes. *Adv.Mar.Biol.* 24, 322-388.
- MACKAY M.A., NORTON R.S. und BOROWITZKA L. J. (1984). Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. *J.Gen.Microbiol.* 130: 2177-2191.
- MADIN K.A.C. und CROWE J.H. (1975). Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. *J. Exp. Zool.* 193: 335-342.
- MANETAS Y., PETROPOULOU Y. und KARABOURNIOTIS G. (1986). Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase of C₄-halophytes. *Plant Cell Env.* 9: 145-151.
- MATRAI P.A. und KELLER M.D. (1993). Dimethylsulfide in a large-scale coccolithophore bloom in the Gulf of Maine. *Cont.Shelf Res.* 29: 118-124.

Literatur

- McCONVILLE M.J. (1985). Chemical composition and biochemistry of sea ice microalgae. In: HORNER R.A. (Hrsg.): *Sea Ice Biota*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 105-130.
- McNAUSHTON S.J. (1972). Enzyme thermal adaptations: the evolution of homeostasis in plants. *Am.Nat.* 106: 165-172.
- MONASTERSKY R. (1987). The plankton-climate connection. *Science New* 132: 362-365.
- MORRIS I. und FARRELL K. (1971). Photosynthetic rates, gross pattern of carbon dioxide assimilation and activities of ribulose diphosphate carboxylase in marine algae grown at different temperatures. *Physiol Plant.* 25: 372-377.
- MORTIMER C.E. (1980). *Chemie. Das Basiswissen der Chemie in Schwerpunkten*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- NGUYEN B.C., BELVISO S. und MIHALOPOULOS N. (1988). Dimethyl sulfide production during natural phytoplankton blooms. *Mar.Chem.* 24: 133-141.
- NIKOLOPOULOS D. und MANETAS Y. (1991). Compatible solutes and *in vitro* stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. *Phytochem.* 30: 411-413.
- NISHIGUCHI M.K. und SOMERO G.N. (1992). Temperature- and concentration-dependence of compatibility of the organic osmolyte β -dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Cryobiol.* 29: 118-124.
- NOTHNAGEL J. (1995). Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros sp.* und *Navicula sp.* unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin. *Ber.Polarforsch.* 161.
- OLANCZUK-NEYMANN K.M. und VOSJAN J.H. (1977). Measuring respiratory electron system activity in marine sediment. *Neth.J.Sea Res.* 11: 1-13.
- ÖQUIST G. (1983). Effects of low temperature on photosynthesis. *Plant Cell Env.* 6: 281-300.
- PACKARD T.T., DEVOL A.H. und KING F.D. (1975). The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton. *Deep-Sea Res.* 22: 237-249.
- PALEG L.G., DOUGLAS T.J., VAN DAAL A. und KEECH D.B. (1981). Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust.J.Plant Physiol.* 8: 107-114.
- PALEG L.G., STEWART G.R. und STARR R. (1985). The effect of compatible solutes on proteins. *Plant and Soil* 89: 83-94.
- PAQUET L., RATHINASABAPATHI B., SAINI H., ZAMIR L., GAGE D.A.; HUANG Z.-H. und HANSON A.D. (1994). Accumulation of the compatible solute 3-dimethylsulfoniopropionate in sugarcane and its relatives, but not other gramineous crops. *Aust.J.Plant Physiol.* 21: 37-48.

- PATTERSON B.D. und GRAHAM D. (1987). Temperature and metabolism. In: DAVIES D.D. (Hrsg.): *The Biochemistry of Plants*. A Comprehensive Treatise, 12, Physiology of metabolism. Academic Press, New York: 153-199.
- PLATT T., HARRISON W.G., IRWIN B., HORNE E.P. und GALLEGOS C.L. (1982). Photosynthesis and photoadaptation of marine phytoplankton in the Arctic. *Deep-Sea Research* 29: 1159-1170.
- POLLARD A. und WYN JONES R.G. (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144: 291-298.
- PON N.G. und BONDAR R.J.L. (1967). A direct spectrophotometric assay for pyruvate kinase. *Analytical Biochem.* 19: 272-279.
- POTVISON C., SIMON J.-P. und BLANCHARD M.-H. (1983). Thermal properties of NAD malate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase in two genotypes of *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae) from contrasting environments. *Plant.Sci.Lett.* 31: 35-47.
- RAVEN J.A. und GEIDER R.J. (1988). Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110: 441-461.
- REED R.H. (1983a). Measurement and osmotic significance of β -dimethylsulfonio-propionate in marine macroalgae. *Mar.Biol.Letters* 4: 173-181
- REED R.H. (1983b). The osmotic responses of *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy from marine and estuarine sites: evidence for incomplete recovery of turgor. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 68: 169-193.
- REED R.H., RICHARDSON D.L., WARR S.R.C. und STEWART W.D.P. (1984). Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J.Gen.Microbiol.* 130: 1-4
- REED R.H., BOROWITZKA L.J., MacKAY M.A., CHUDEK J.A., FOSTER R., WARR S.R.C., MOORE D.J. und STEWART W.D.P. (1986). Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* 39: 51-56.
- REES AP T.; BURELL M.M.; ENTWISTLE T.G.; HAMMOND J.B.W.; KIRK D. und KRUGER N.J. (1988): Effects of low temperature on the respiratory metabolism of carbohydrates by plants. *Great Britain Society for Experimental Biology*: 377 - 393.
- REEVES R.B. (1977). The interaction of body temperature and acid-base in ectothermic vertebrates. *Ann.Rev.Physiol.* 39: 559-586.
- REICHARDT W. und DIECKMANN G. (1985). Kinetics and trophic role of bacterial degradation of macro-algae in Antarctic coastal water. In: SIEGFRIED W.R., CONDY P.R. und LAWS R.M. (Hrsg.): *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 115-122.
- RHODES D. und HANSON A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 44: 357-384.

- RICHTER D.F.E. (1987). Untersuchungen zum D-Mannitolmetabolismus in *Platymonas subcordiformis* Hazen: Der Nachweis der beteiligten Enzyme und der Abbau von Reservestärke nach osmotischer Belastung. Dissertation, Universität Bremen.
- RICHTER D.F.E. und KIRST G.O. (1987). D-mannitoldehydrogenase and D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Platymonas subcordiformis*: some characteristics and their role in osmotic adaptation. *Planta* 170: 528-534.
- ROSAS A., ALBERDI M., DELSENY M. und MEZA-BOSSA L. (1986). A cryoprotective polypeptide isolated from *Nothofagus dombeyi* seedlings. *Phytochem.* 25: 2497-2500.
- RUDOLPH A.S. und CROWE J.H. (1986). A calorimetric and infrared spectroscopic study of the stabilizing solute proline. *Biophys.J.* 50: 423-430.
- RUTTLOFF H., HUBER J., ZICKLER F. und MANGOLD K.-H. (1978). Industrielle Enzyme. VEB Fachbuchverlag, Leipzig.
- SANTARIUS K.A. (1991). Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VII. The effect of bovine serum albumin. *Biochem.Physiol.Pflanz.* 187: 149-162.
- SANTARIUS K.A. (1992). Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiol.Plant.* 84: 87-93.
- SCHEIBE R., GEISLER A. und FICKENSCHER K. (1989). Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: K_m shift upon light modulation and reduction. *Arch.Biochem.Biophys.* 274: 290-297.
- SCHLEE D. (1986). Ökologische Biochemie. Springer-Verlag Berlin: 88-102
- SCHOBERT B. (1977). The anomalous colligative properties of prolin. *Naturwissenschaften* 64: 386.
- SCHOBERT B. (1979). A near-infrared spectroscopic investigation of water in solution with prolin, glycine betaine, glycerol and albumin. *Z.Naturforsch.* 34: 699-703.
- SCHOBERT B. und TSCHESCHE H. (1978). Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochem.Biophys.Acta* 541: 270-277.
- SCHWAB K.B. und GAFF D.F. (1990). Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. *J.Plant Physiol.* 137: 208-215.
- SHIKAMA K. und YAMAZSKI I. (1961). Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature* 190: 83-84.
- SHOMER-ILAN A., BEER S. und WAISEL Y. (1979). Biochemical basis of ecological adaptation. In: GIBBS M. und LATZKO M. (Hrsg.). *Photosynthesis II*. *Encycl.Plant Physiol.* N.S. 6. Springer-Verlag, Berlin: 190-201.
- SIEBURTH J.M. (1961). Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of marine animals. *J.Bacteriol.* 82: 72-79.

- SIMON J.-P. (1979a). Differences in thermal properties of NAD malate dehydrogenase in genotypes of *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae) from maritime and continental sites. *Plant Cell Env.* 2: 23-33.
- SIMON J.-P. (1979b). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: latitudinal variations of thermal properties of NAD malate dehydrogenase in *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae). *Oecologia* 39: 273-287.
- SIMON J.-P. (1979c). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level : speed of acclimation for apparent energy of activation of NAD malate dehydrogenase in *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae). *Plant Cell Env.* 2: 35-38.
- SIMON J.-P. (1979d). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: temperature-dependent substrate binding ability of NAD malate dehydrogenase in four populations of *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae). *Plant Science Letters* 14: 113-120.
- SIMON J.-P., CHAREST C. und PELOQUIN M.J. (1985). Thermal adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: thermostability of NAD malat dehydrogenase in three species of *Viola*. *J.Ecol.* 73: 397-406.
- SIMON J.-P., POTVIN C. und BLANCHARD M.-H. (1983). Thermal adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: kinetic properties of NAD malate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase in two genotypes of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Oecologia* 60: 143-148.
- SIMON J.-P., ROBERT G. und VEZEAU M.-C. (1984). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase of population of a weedy C₄ grass species, *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Photosynthetica* 18: 391-401.
- SIMON J.-P. und VAIRINHOS F. (1991). Thermal stability and kinetic properties of NADP⁺-malate dehydrogenase isomorphs in two populations of the C₄ weed species *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass) from sites of contrasting climates. *Physiol Plant.* 83: 216-224.
- SMITH R.E.H., STAPLEFORD L.C. und RIDINGS R.S. (1994). The acclimated response of growth, photosynthesis, composition, and carbon balance to temperature in the psychrophilic ice diatom *Nitzschia seriata*. *J.Phycol.* 30: 8-16.
- SOSINSKA A. und MALESZEWSKI S. (1978). Alanine metabolism in leaves of rape plants treated with low temperature. *Z.Pflanzenphysiol.* 88: 55-59.
- SOMERO G.N. (1978). Temperature adaptation of enzymes: optimization through structure-function compromises. *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 9: 1-29.
- SOMERO G.N. (1981). pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar.Biol.Let.* 2: 163-178.

- SOMERO G.N. (1986). Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am.J.Physiol.* 251: R197-R213.
- SOMMER C., THONKE B. und POPP M. (1990). The compatibility of D-Pinitol and 1D-1-O-methyl-muco-inositol with malate dehydrogenase activity. *Bot. Acta* 103: 270-273.
- STEIN J.R. (1973). *Handbook of phycolgical culture methods and growth measurments*. Cambridge Univ. Press., Cambridge.
- SUELTER C.H. (1990). *Experimentelle Enzymologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- TAMIYA T., OKAHASHI N., SAKUMA R., AOYAMA T., AKAHANE T. und MATSUMOTO J.J. (1985). Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiol.* 22: 446-456.
- TERRI J.A. (1980). Adaptation of kinetic properties of enzymes to temperature variability. In: TURNER N.C. und KRAMER P.J. (Hrsg.). *Adaptation of Plants to Water and Temperature Stress*. John Wiley and Sons, New York: 251-260.
- THOMPSON P.A., HARRISON P.J. und WHYTE J.N.C. (1992). Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J.Phycol.* 28: 488-497.
- TILLMANN M.M., BAUMANN M.E.M. und ALETSEE L. (1989). Distribution of carbon among photosynthetic end products in the bloom-forming Arctic diatom *Thalassiosira antarctica* Comber. *Polar Biol.* 10: 231-238.
- TIMASHEFF S.N. (1978). Thermodynamic examination of the self-association of brain tubulin to microtubules and other structures. In: CATSIMOOLAS N. (Hrsg.). *Physical Aspects of Protein Interactions*. Elsevier North-Holland, New York: 219-273.
- TIMASHEFF S.N. (1982). Preferential interactions in protein-water-cosolvent systems. In: FRANKS F. und MATHIAS S. (Hrsg.). *Biophysics of Water*. John Wiley and Sons, New York: 70-72.
- TING T.P., FUHR I., CURRY R. und ZSCHOCH W.C. (1975). Malate dehydrogenase isozymes in plants: preparation, properties, and biological significance. In: MARKER C.L. (Hrsg.). *Isozymes, Vol. II. Physiological funktion*. Academic Press, New York: 369-384.
- TURNER L.B. und POLLOCK C.J. (1993). The effects of temperature and pH on the apparent Michaelis constant of glutathione reductase from maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Env.* 16: 289-295.
- VAIRAVAMURTHY A., ANDREAE M.O. und IVERSON R.L. (1985). Biosynthesis of dimethylsulfide and dimethylpropiothetin by *Hymenomonas carterae* in relation to sulfur source and salinity variations. *Limnol.Oceanogr.* 30: 59-70.
- VAN DIGGELEN J., ROZEMA J., DICKSON D.M. und BROEKMAN R. (1986). β -3-dimethylsulphoniopropionate, prolin and quaternary ammonium compounds in *Spartina anglica* in relation to sodium chloride, nitrogen and sulphur. *New Phytol.* 103: 573-586.

- VAN DEN HOEK C., JAHNS H.M. und MANN D.G. (1993). Algen. George Thieme Verlag, Stuttgart.
- VAN OPPEN M., OLSEN J.L., STAM W.T., VAN DEN HOEK C. und WIENCKE C. (1993). Arctic-Antarctic disjunction in the benthic seaweeds *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) and *Desmarestia viridis/willii* (Phaeophyta) are of recent origin. Mar.Biol. 115: 381-386.
- VETTER Y.A. und SHARP J.H. (1993). The influence of light intensity on dimethylsulfide production by a marine diatom. Limnol.Oceanogr. 38: 419-425.
- VINCENT W.F. (1988). Microbial Ecosystems of Antarctica. Cambridge University Press, Cambridge.
- VON WILLERT D.J. (1974). Der Einfluß von NaCl auf die Atmung und Aktivität der Malatdehydrogenase bei einigen Halophyten und Glykophyten. Oecologia 14: 127-137.
- VOSJAN J.H. und OLANCZUK-NEYMANN K.M. (1991). Influence of temperature on respiratory ETS-activity of micro-organisms from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Neth.J.Sea Res. 28: 221-225.
- VROMAN H.E. und BROWN J.R.C. (1963). Effect of temperature on the activity of succinic dehydrogenase from the livers of rats and frogs. J.Comp.Physiol. 61: 129-131.
- WANZEK M. (1994). Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf Wachstum, Photosynthese, Respiration und ausgewählte Inhaltsstoffe der antarktischen Diatomeen *Entomoneis kufferathii* Manguin und *Nitzschia lecointei* van Heurck. Dissertation, Universität Bielefeld.
- WARR S.R.C., REED R.H. und STEWART W.D.P. (1984). Osmotic adjustment of cyanobacteria: the effects of NaCl, KCl, sucrose and glycine betaine on glutamine synthetase activity in a marine and a halotolerante strain. J.Gen.Microbiol. 130: 2169-2175.
- WARR S.R.C., REED R.H. und STEWART W.D.P. (1987). Low-molecular-weight carbohydrate biosynthesis and the distribution of Cyanobacteria (Bluegreen algae) in marine environments. Br.Phycol.J. 22: 175-180.
- WARR S.R.C., REED R.H. und STEWART W.D.P. (1988,). The compatibility of osmotica in cyanobacteria. Plant Cell Env. 11: 137-142.
- WEGMANN K. (1986). Osmoregulation in eukaryotic algae. FEMS Microbiol. Rev. 39: 37-43.
- WEST, E.S., Todd W.R., Mason H.S. und Van Bruggen J.T. (1966). Textbook of Biochemistry, 4th ed. Macmillan, New York.
- WHITE R.H. (1982). Analysis of dimethyl sulfonium compounds in marine algae. J.Mar.Res. 40: 529-536.
- WHITTAM J.H. und ROSANO H.L. (1973). Effects of the freeze-thaw process on α -amylase. Cryobiol. 10: 240-243.

Literatur

- WIENCKE C. (1990a). Seasonality of brown macroalgae from Antarctica - a long-term culture study under fluctuating Antarctic daylengths. *Polar Biol.* 10: 589-600.
- WIENCKE C. (1990b). Seasonality of red and green macroalgae from Antarctica - a long-term culture study under fluctuating Antarctic daylengths. *Polar Biol.* 10: 601-607.
- WIENCKE C. (1995). Biologie antarktischer Makroalgen. In: HEMPEL I. und HEMPEL G. (Hrsg.). *Biologie der Polarmeere*. Gustav Fischer Verlag Jena. 275-281.
- WIENCKE C., BARTSCH I., BISCHOFF B., PETERS A.F. und BREEMANN A.M. (1994). Temperature requirements and biogeography of Antarctic, Arctic and amphiequatorial seaweeds. *Bot.Mar.* 37: 247-259.
- WIENCKE C. und TOM DIECK I. (1990). Temperature requirements for growth and temperature tolerance of macroalgae endemic to the Antarctic region. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 59: 157-170.
- WINTER U. und KIRST G.O. (1990). Salinity response of a freshwater charophyte, *Chara vulgaris*. *Plant Cell Env.* 13: 123-134.
- WITHER L.A. und KING P.J. (1979). Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 64: 675-678.
- WIGGENS P.M. (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiol.Rev.* 54: 432-449.
- WRIGHT P.J. und REED R.H. (1985). The effects of osmotic stress on intracellular hexitols in the marine brown alga *Himantalia elongata*. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 93: 183-190.
- YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND S.C., BOWLUS R.D. und SOMERO G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.
- ZUBER H. (1969). Das Leben bei höheren Temperaturen. *Naturwiss.Rdsch.* 22: 16-22.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, auf deren Unterstützung ich während der ganzen Arbeit zählen konnte.

Besonders gedankt sei Herrn Prof. Dr. G.O. Kirst für die interessante Themenstellung, die Freiheit, das Thema nach eigenen Vorstellungen umzusetzen sowie für seine wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. U. Karsten möchte ich für die Unterstützung bei der thematischen Einarbeitung sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Für die nette Kooperation, das Überlassen von Algenmaterial sowie die anregenden Diskussionen danke ich Herrn Dr. habil. C. Wiencke und Frau Bettina Bischoff. Herrn C. Wiencke möchte ich darüber hinaus für seine Bereitschaft danken, diese Arbeit zu begutachten. Ein weiterer Dank gebührt Frau Christina Langreder, die durch ständige Bereitstellung des benötigten Meerwassers die Kultivierung der Algen ermöglichte.

Im besonderen bedanke ich mich bei Frau Roswitha Ulmke für ihre vielfältige organisatorische und methodische Unterstützung sowie für ihre Bereitschaft, Teile der Arbeit zu korrigieren und dafür, daß sie immer ein paar aufmunternde Worte für mich hatte.

Auch erinnere ich mich gerne an die freundliche Aufnahme durch die Mitarbeiter der AG Kirst und die mit ihnen geführten, kürzeren oder auch längeren Diskussionen und Unterhaltungen, die das Arbeiten abwechslungsreicher gestalteten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Doris Meyerdieks und Rita Haase für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre anregende Kritik bedanken. Doris sei gerade in der letzten Phase für ihre freundschaftliche und aufmunternde Unterstützung ganz besonders gedankt.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung der Sachmittel für das Forschungsvorhaben "Biologische und physiologische Bedeutung von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) und dessen Biosynthese in polaren Makroalgen" (Ki 207/14), die diese Arbeit ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die mich insbesondere zum Ende dieser Arbeit seelisch aufbauten und mir meine schlechten Launen nicht verübelt haben.

Anhang

Anhang

Tab.I: MDH-Aktivität ($\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$) aus Extrakten von *A. arcta* der Arktis und Antarktis in Abhängigkeit von der Temperatur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4).

Temperatur °C	Arktis		Antarktis	
	0°C-Kultur	10°C-Kultur	0°C-Kultur	10°C-Kultur
-2	4,80 \pm 0,37	3,23 \pm 0,20	0,92 \pm 0,07	0,73 \pm 0,04
0	4,76 \pm 0,37	3,98 \pm 0,14	1,16 \pm 0,04	0,91 \pm 0,08
5	6,35 \pm 0,16	5,10 \pm 0,22	1,57 \pm 0,05	1,48 \pm 0,14
10	8,73 \pm 0,29	5,93 \pm 0,15	2,40 \pm 0,05	2,26 \pm 0,13
15	9,18 \pm 1,23	8,02 \pm 0,62	3,71 \pm 0,19	3,39 \pm 0,08
20	12,46 \pm 0,49	10,4 \pm 0,56	4,38 \pm 0,12	5,30 \pm 0,11
25	-	-	6,04 \pm 0,07	7,61 \pm 0,14
30	15,33 \pm 0,58	16,10 \pm 1,10	6,52 \pm 0,13	9,82 \pm 0,24
40	8,78 \pm 0,49	9,02 \pm 0,51	2,85 \pm 0,15	8,16 \pm 0,26

Tab.II: G6P-DH-Aktivität (nmol NADP / min \cdot mg Protein) aus Extrakten von *A. arcta* aus Arktis und Antarktis in Abhängigkeit von der Temperatur. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4).

Temperatur °C	Arktis		Antarktis	
	0°C-Kultur	10°C-Kultur	0°C-Kultur	10°C-Kultur
-2	4,01 \pm 0,30	5,75 \pm 0,94	15,96 \pm 0,46	8,86 \pm 0,53
0	4,61 \pm 0,30	10,36 \pm 0,26	18,40 \pm 1,39	9,44 \pm 0,30
5	8,02 \pm 0,68	15,10 \pm 0,31	31,04 \pm 1,21	12,43 \pm 0,61
10	10,89 \pm 0,53	24,41 \pm 0,31	43,96 \pm 1,58	20,83 \pm 1,67
15	15,36 \pm 0,45	32,29 \pm 0,52	61,52 \pm 1,21	26,47 \pm 0,76
20	21,10 \pm 1,29	38,75 \pm 1,35	71,84 \pm 0,74	32,91 \pm 0,91
25	-	43,54 \pm 1,98	83,55 \pm 1,49	38,09 \pm 0,15
30	21,79 \pm 0,98	34,06 \pm 0,73	72,30 \pm 2,32	39,59 \pm 0,45
40	3,78 \pm 0,39	4,01 \pm 0,36	6,13 \pm 0,19	15,54 \pm 0,53

Tab.III: LDH-Aktivität ($\mu\text{mol NADH}/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$) nach Gefrieren im flüssigem Stickstoff unter Zusatz anorganischer Salze. Die Grundaktivität der LDH ohne Gefrieren und Zugabe von Substanzen wurde als Kontrolle angegeben. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=4$)

Konzentration mOsmol/kg	NaCl	KCl	NH ₄ Cl	KBr
0	30,34 \pm 2,41	32,50 \pm 1,64	16,75 \pm 1,49	10,80 \pm 0,69
50	37,46 \pm 1,85	38,19 \pm 1,64	21,19 \pm 0,92	15,47 \pm 2,83
100	52,20 \pm 2,41	57,59 \pm 1,72	14,97 \pm 1,03	17,15 \pm 0,42
200	38,53 \pm 2,50	37,11 \pm 2,55	12,21 \pm 0,36	12,48 \pm 0,23
400	35,60 \pm 0,97	23,88 \pm 12,41	19,23 \pm 0,52	6,28 \pm 0,23
600	47,59 \pm 2,28	27,46 \pm 1,51	23,98 \pm 1,28	6,13 \pm 0,84
1200	75,73 \pm 4,91	56,64 \pm 29,05	35,37 \pm 1,11	16,69 \pm 1,38
1800	104,83 \pm 3,92	110,56 \pm 17,72	62,28 \pm 2,09	30,63 \pm 2,60
Kontrolle nicht gefroren (100%)	101,38 \pm 1,03	147,72 \pm 4,96	73,44 \pm 0,52	84,38 \pm 5,05

Tab. IV: LDH-Aktivität ($\mu\text{mol NADH}/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$) nach Gefrieren im flüssigem Stickstoff unter Zusatz organischer Substanzen. Die Grundaktivität der LDH ohne Gefrieren und Zugabe von Substanzen wurde als Kontrolle angegeben. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=4$)

Konzentration mOsmol/kg	DMSP*Cl	DMSP*Br	Prolin	Saccharose
0	18,40 \pm 2,72	29,31 \pm 2,78	20,66 \pm 2,16	18,69 \pm 3,62
50	16,76 \pm 0,75	53,42 \pm 2,54	57,61 \pm 2,63	23,52 \pm 1,36
100	17,28 \pm 1,97	62,81 \pm 7,14	81,03 \pm 5,63	49,67 \pm 5,16
200	17,79 \pm 0,98	42,51 \pm 2,54	57,32 \pm 2,72	75,73 \pm 7,75
400	79,34 \pm 3,29	55,99 \pm 1,74	61,36 \pm 4,27	108,92 \pm 4,18
600	109,59 \pm 3,29	85,65 \pm 7,11	62,96 \pm 4,21	49,95 \pm 4,21
1200	-	194,29 \pm 13,16	65,25 \pm 1,28	-
1400	160,52 \pm 12,02	-	-	55,96 \pm 3,29
2000	-	266,22 \pm 10,55	-	-
Kontrolle nicht gefroren (100%)	105,31 \pm 3,89	134,50 \pm 12,21	137,93 \pm 3,24	129,58 \pm 10,28

Folgende Hefte der Reihe „Berichte zur Polarforschung“ sind bisher erschienen:

- * **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“,
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR
- Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“,
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS 'Meteor'“,
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzänge
zusammengestellt von Norbert Klages
- Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungs-
schiffes 'Meteor'“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern
- Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“,
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- * **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS 'John Biscoe', February 1982“,
by G. Hempel and R. B. Heywood
- * **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen 'Eiswarte')“,
zusammengestellt von Gode Gravenhorst
- Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS 'Polarsirkelel'
(Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei
zusammengestellt von R. Schneppenheim
- Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“,
by D. L. Cram and J.-C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmidt, M. Mall, R. Kresse, T. Schwinghammer
- * **Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“,
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass
- Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982
zusammengestellt von Dieter Adelung
- Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS 'John Biscoe', February 1982 (II)“,
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski
- Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS 'Polarstern'“,
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundscheppnetzänge und Liste der Probenahme an Robben
und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- * **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS 'Polarbjörn' 1982/83“ (Sommerkampagne zur
Atka-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS 'Polarstern' (Kapstadt, 20. Januar 1983 –
Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrtleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“,
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS 'Polarstern' 1982/83“,
herausgegeben von Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar
and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12.-16. May 1983, edited by S. B. Schnack
- Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV 'Walther Herwig' and RV 'Meteor'“ –
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages
- Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein
- Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“,
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski
- Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der 'Polarstern'-Reise ARKTIS I, 1983“,
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede
- Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS 'Polarstern' 1983/84“,
Bericht von den Fahrtabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer
- Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS 'Polarstern' 1983/84“,
Bericht vom Fahrtabschnitt 4, Punta Arenas-Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Kohnen
- Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS 'Polarstern' 1984, mit Beiträgen des FS 'Valdivia'
und des Forschungsflugzeuges 'Falcon 20' zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“,
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel
- Heft Nr. 21/1985** – „Euphausiid larvae in plankton samples from the vicinity of the Antarctic Peninsula,
February 1982“, by Sigrid Marschall and Elke Mizdalski